



HAL
open science

Caractérisation in vitro des comportements immunomodulateurs différentiels d'une bactérie probiotique *Lactobacillus rhamnosus* Lcr 35 et d'un pathogène vaginal, *Gardnerella vaginalis*

Thomas Bertran

► **To cite this version:**

Thomas Bertran. Caractérisation in vitro des comportements immunomodulateurs différentiels d'une bactérie probiotique *Lactobacillus rhamnosus* Lcr 35 et d'un pathogène vaginal, *Gardnerella vaginalis*. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAS025 . tel-04682051

HAL Id: tel-04682051

<https://theses.hal.science/tel-04682051v1>

Submitted on 30 Aug 2024

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.

***ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Immunologie

Soutenue le 10 juillet 2017

Par

Thomas BERTRAN

***Caractérisation in vitro des comportements immunomodulateurs
différentiels d'une bactérie probiotique, Lactobacillus rhamnosus
Lcr35, et d'un pathogène vaginal, Gardnerella vaginalis***

Président : Pr. Florence Fenollar

**Rapporteurs : Dr. Corinne Grangette
Pr. Christian Drouet**

**Membres : Pr. Pascale Gueirard
Dr. Jean-Marc Chatel**

Directeur de thèse : Dr. Bertrand Evrard

**Laboratoire d'Immunologie, Equipe ECREIN, UNH-UMR 1019
Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université Clermont Auvergne
28, place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand**

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Immunologie

Soutenue le 10 juillet 2017

Par

Thomas BERTRAN

***Caractérisation in vitro des comportements immunomodulateurs
différentiels d'une bactérie probiotique, Lactobacillus rhamnosus
Lcr35, et d'un pathogène vaginal, Gardnerella vaginalis***

Président : Pr. Florence Fenollar

**Rapporteurs : Dr. Corinne Granette
Pr. Christian Drouet**

**Membres : Pr. Pascale Gueirard
Dr. Jean-Marc Chatel**

Directeur de thèse : Dr. Bertrand Evrard

**Laboratoire d'Immunologie, Equipe ECREIN, UNH-UMR 1019
Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université Clermont Auvergne
28, place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand**

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le docteur Corinne Grangette ainsi que le professeur Christian Drouet d'avoir accepté de lire et de juger mon travail de thèse

Je tiens à formuler un immense MERCI à Bertrand EVRARD pour m'avoir accueilli depuis le stage de fin d'année de master 2 et pendant ces 3 ans de thèse au sein de ce beau laboratoire d'Immunologie. Merci de m'avoir encadré et guidé tout au long de ce travail. Merci pour toute ta passion autour de l'immuno, pour le partage de ton savoir et pour tout ce que tu m'as appris. Merci pour toutes ces discussions autour du ballon rond et ovale, ainsi que de toutes ces petites choses qui font la vie. Enfin bref, je pense que je peux te dire merci pour tout et je suis très heureux de t'avoir eu en tant que directeur de thèse... Et ce n'est pas fini.

Merci à Arlette TRIDON, maintenant heureuse retraitée, d'avoir accepté d'être, pour quelques mois, ma directrice de thèse.

Un grand merci à Patrick, qui profite pleinement de sa retraite depuis quelques mois. Merci pour ton partage de connaissance et pour tes très bonnes relectures d'anglais. Sur un plan plus personnel, tu m'as aidé à voir différemment le monde qui nous entoure et grâce à un lobbying féroce a fait de moi un fidèle AMAPIen.... Le bio c'est la vie, par contre, je ne me suis toujours pas mis au vélo ! En fait en arrivant à la fin de ce manuscrit il s'avère que si finalement...

Merci à Sophie et Marjolaine, pour leur présence quotidienne, donnant vie au labo. Pour tous ces petits blablas qui pimentent la vie d'une université. Sophie, merci pour ton très bon café ! Bu quotidiennement de façon si ponctuelle que ça en ferait pâlir un horloger suisse. De très bons moments passés où j'ai appris énormément de choses grâce à des tutoriels très précis sur : comment créer une buche de Noël maison, comment faire une bonne soupe de betterave..... et j'en oublie beaucoup. Marjolaine merci pour tes conseils lors des différentes manip et pour la rédaction de ce manuscrit.

Merci à l'équipe de bactério pour leur accueil et pour m'avoir permis de cultiver mes petites bactéries, point de départ de tout ce travail. Merci pour tout leur conseil, je pense à Christiane, Damien, Nicolas, Rosyne.

Sur un plan plus personnel :

Je tiens à saluer et à remercier la bande à Pascal. Une petite bande de joyeux lurons très éclectiques musicalement, amateurs de bons mets, bons vivants et une joie de vivre à toute épreuve... Pourvu que ça dure.

Merci à tous mes amis doctorants et anciens doctorants, aux amis du foot, du rugby et aux amis de la Barrique.

Une pensée aux amis d'enfance restés dans notre belle Normandie...

Merci à Caro qui il y a quelques années m'a fait rencontrer tous ces mangeurs de chocolatine, amateurs de féria... Zimzou, Rafou, Pud, Matou, Le Boz, Clara, Léa, et maintenant Latiatia et chacha.

Merci à margaux, qui m'a accompagné pendant ces longs mois d'écriture et qui me rend heureux au quotidien.

Enfin, merci à toute ma famille et surtout à mes parents sans qui je ne serai pas là... Merci d'être venu me voir régulièrement et d'avoir fait toute cette route certains week-ends de déménagement et d'anniversaires ou juste même pour dire bonjour.

Abréviations

A. vaginae : *Atopobium vaginae*

AGCC: Acides Gras à Courtes Chaînes

AMM: Autorisation de mise sur le marché

AP-1: Activator Protein 1

AP1: Adaptateur du réseau Trans Golgi

AP2 : Adaptateur de la membrane plasmique

B. : *Bifidobacterium*

Batf3: Basic leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3

BDCA: Blood Dendritic Cells Antigen

BLNK: B cell linker

BTK: Bruton's Tyrosine kinase

CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain

cDC : Cellules Dendritiques conventionnelles

CDC2 : Cell Division Cycle 2

CDP: Common Dendritic Cell progenitors

CLA-1 : Cutaneous Lymphocyte Antigen 1

CLIP : Class II-associated Li peptide

CLP : Précurseurs Lymphoïdes Communs

CLR: C-type Lectine Receptor

CMB: CARMA1/Bcl10/MALT1

CMF : Cytométrie en Flux

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMP : Précurseurs myéloïdes communs

CPA : Cellules Présentatrices d' Antigènes

CRAC: Calcium Release Activated calcium Chanel

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocytes-Associated protein 4

DAG: Diacylglycerol

DAMP: Danger-Associated molecular Patterns

DC : Cellules Dendritiques

DC-SIGN: DC-Specific ICAN-3-Grabbing Non-integrin

DCAL-1: DC-associated lectin-1
DCIR: DC-ImmunoReceptor
Dectin: DC-associated C-type lectin
DN : Double Négatif
DP : Double Positif
E. coli : Escherichia coli
ESL-1 : E-Selectin Ligand 1
FcR γ : Récepteur du fragment constant des IgG
FoxP3: Forkhead box P3
Ft3L : Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
G. vaginalis: *Gardnerella vaginalis*
Gads: Grb2-related Adaptor Downstream of Shc
GATA-3: Trans-acting T-cell-specific transcription factor
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GRAS: Generally Recognized as safe
Grb2 : Growth factor receptor-Bound protein 2
H₂O₂: Péroxyde d'hydrogène
HLA-DM: Human Leukocyte Antigen- antigen DM
HLA-DR: Human Leukocyte Antigen- antigen D Related
HSP: Heat-Shock Protein
IBS: Syndrôme de l'Intestin Irritable
ICAM-1: IntraCellular Adhesion Molecule 1
ICOS: Inducible Costimulator
IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN: Interferon
Ig : Immunoglobuline
IKK: I κ B Kinase
IL: Interleukine
IP3: Inositol-1,4,5-triphosphate
IPS-1: Interferon- β promoter stimulator 1
IRAK: IL-1 Receptor Associated Kinase
IRF: Interferon Regulatory factor
IST : Infection Sexuellement Transmissible
ITAM: immunoreceptor family Tyrosine-based Activation Motif

JNK: c-jun N-terminal Kinase
KOH: Hydroxyde de potassium
L. reuteri : *Lactobacillus reuteri*
LAT: Linker for Activation of T cells
LC : Cellules de Langherans
LCV: Liquide Cervico-Vaginale
LFA-1 : Leukocyte Function-associated Antigen 1
LOX-1: Lectin-type oxidized LDL receptor 1
LPS : Lipopolysaccharyde
LRR : Leucine Rich Repeats
Ly : Lymphocytes
Ly Tfh: Lymphocytes T folliculaires helper
Ly Th: Lymphocytes T helper
M-CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor
M. hominis: *Mycoplasma hominis*
MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAMP: Microbes-Associated Molecular patterns
MAPK: Mitogen-Activated protein Kinase
MCT1: Monocarboxylate Transporter 1
MDA-5: Menanoma Differentiaion-Associated gene-5
cDC : Cellules Dendritiques myéloïdes
MDP: Macrophage Dendritic Progenitors
MFI: Mean Fluorescent Intensity
MICL: Myeloid Inhibitory C-type Lectin receptor
MINCLE: Macrophage-Inducible C-type Lectin
MLR : Réaction Leucocytaire Mixte
moDC : Cellules Dendritiques dérivées de monocytes
MR: Récepteur au Mannose
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
MUC1: Mucine 1
MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene
NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells
NK: Natural Killer
NLR: Nod-Like Receptor

NO: oxide nitrique

P. bivia : *Prevotella bivia*

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PD-1: Program Death-1

pDC : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes

PH: Pleckstrin Homology

PHA : Phytohemagglutinine A

Pi3K: Phosphoinositide 3 Kinase

PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PKC-θ: Protein Kinase C Théta

PLCγ: Phospholipase C gamma

PRR: Pattern Recognition Receptor

PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand 1

RasGRP: Ras Guanyl-releasing Protein 1

RE: Réticulum Endoplasmique

RIP-1: Receptor-Interacting Protein 1

RIPK2: Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 2

RLR: Retinoic acid-inducible gene I Like Receptor

RORc: RAR-related Orphan Receptor c

S. boulardii: *Saccharomyces boulardii*

SFB: Segmented Filamentous bacteria

SR-A: Scavenger Receptor de classe A

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

SYK: Spleen tyrosine Kinase

T-bet: T-bos transcription factor

TAB-2: TAK-1 Binding protein

TAK-1 TGF-β Activated Kinase 1

TCR: Récepteur des cellules T

TGF-β: Transforming Growth Factor-Béta

TIR: Toll/IL-1R

TIRAP: TIR Associated Protein

TLR: Toll-Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRAF-6: TNF Receptor Associated Factor 6

TRAM: TRIF-Related Adaptor Molecule

Treg : T régulateur

TRIF: TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β

TTL : Test de transformation lymphoblastique

VB: Vaginose Bactérienne

VIH : Virus d'Immunodéficience Humain

Résumé

La vaginose bactérienne (VB) est une infection génitale basse considérée comme une dysbiose de la flore vaginale, avec diminution des lactobacilles protecteurs et colonisation par une flore polymicrobienne anaérobie, au sein de laquelle *Gardnerella (G.) vaginalis* tient un rôle prépondérant. Les probiotiques, dont le *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35, trouvent une bonne indication dans cette pathologie, en permettant de restaurer la flore vaginale et de diminuer le taux de récurrence des VB, problème récurrent survenant après traitement antibiotique du fait de la persistance d'une altération de la flore. Cependant, l'effet de ces bactéries bénéfiques sur le système immunitaire, bras armé de l'organisme dont le but est de nous défendre contre un grand nombre d'attaques extérieures, notamment infectieuses, est mal connu. Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle critique dans ce système en orchestrant les réponses immunitaires adaptatives, tolérogènes ou inflammatoires. A l'état immature, ces cellules assurent la surveillance et la protection des muqueuses, notamment intestinales et vaginales, par la reconnaissance de produits microbiens, les PAMP via leurs récepteurs membranaires appelés les PRR. Une fois l'antigène microbien capté, les DC subissent un processus de maturation et s'activent, permettant ainsi la polarisation lymphocytaire T CD4⁺ et la génération des sous-populations effectrices Th1, Th2 et Th17 ou tolérogènes, les T régulateurs. L'objectif de ce travail était donc d'étudier *in vitro*, sur une large gamme de concentrations, les propriétés immunomodulatrices différentielles de *G. vaginalis* et du Lcr35 sur les réponses des DC et lymphocytaire T afin de mieux caractériser les effets propres à chaque souche et de confirmer ou non la pertinence, d'un point de vue immunologique, d'utiliser ce probiotique dans le traitement de la vaginose bactérienne. Par microscopie électronique, nous avons montré que *G. vaginalis* réduisait les capacités d'internalisation des DC en formant des amas, induisant une faible maturation de ces cellules et une faible sécrétion de cytokines anti- et pro-inflammatoires, en testant un large panel par technologie Luminex. De même, sur les lymphocytes T, *G. vaginalis* induisait peu de prolifération et sécrétion de cytokines. Prises ensemble, nos données indiquent que *G. vaginalis* possède *in vitro* des propriétés immunomodulatrices peu intenses contre les DC et les lymphocytes T, induisant une réponse inflammatoire de bas grade, qui pourrait, de manière intéressante, bien concorder avec la clinique atypique de la VB, par nature peu inflammatoire. Au contraire, le Lcr35 est fortement internalisé par les DC conduisant à une maturation dose-dépendante et une sécrétion significative de cytokines essentiellement pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α ...). La prolifération lymphocytaire est significativement augmentée aux faibles concentrations de Lcr35, avec un pic à 10⁵ CFU/mL associé à une production d'IFN- γ , cytokine pro-Th1 et à une activation maximum de l'IDO. Le Lcr35 semble ainsi posséder des propriétés immunostimulatrices importantes et pourrait ainsi induire une réponse pro-inflammatoire, pro-Th1. Pour conclure, ce profil pourrait donc potentiellement être efficace pour lutter localement contre les effets de *G. vaginalis*, en restaurant une réponse inflammatoire au niveau vaginal de meilleure qualité. Cette hypothèse, que nous avons dénommée « effet Booster » reste à confirmer dans des études complémentaires à la fois *in vitro*, chez l'animal, et cliniques. Dans un futur proche, nous avons ainsi prévu de réaliser de nouvelles expériences, dans lesquelles nous étudierons l'effet de ces deux bactéries dans un modèle de polarisation autologue à partir de DC et de lymphocytes CD4⁺ naïfs, les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans les résultats observés, l'effet de la co-incubation des deux bactéries sur ces mêmes cellules et enfin l'effet de la composante épithéliale grâce à des modèles Transwell® associant les cellules épithéliales aux cellules immunitaires.

Abstract

Bacterial vaginosis (BV) is a low genital infection considered as vaginal flora dysbiosis, with protective *Lactobacillus* decreased and an anaerobic poly-microflora colonization, within *Gardnerella (G.) vaginalis* as a major role. Probiotics, *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 included, have a good indication in this pathology, allowing vaginal flora restoration and decreased BV recurrence rate, one of the major problem of this dysbiosis that appears after an antibiotic treatment due to flora alteration persistence. However, bacterial effects on immune system, which goal is to defend against lots of attacks, infectious ones included, is scarcely known. Dendritic cells (DC) play a critical role in this system orchestrating adaptive immune response, tolerogenic or inflammatory ones. At the immature states, DCs monitor and protects mucosae (especially intestinal and vaginal ones) recognizing microbial products called PAMP, via their membrane receptors, called PRR. Once, the microbial antigen captured, DCs are activated and start a maturation process, which permits CD4⁺ T cells polarization and effectors T cells, Th1, Th2 and Th17 or tolerogenic T cells, Treg, generation. The main objective of this work was to study *in vitro*, over a wide range of concentrations, *G. vaginalis* and Lcr35 immunomodulatory properties on DCs and T cells response (Lymphoblastic transformation test and mixed leucocyte reaction) in order to better characterize specific strains effects and to confirm, in an immunological perspective, the relevance of using this probiotic in BV treatment. By Electron microscopy, we showed that *G. vaginalis* diminished DCs internalization capacity by forming clusters, causing a slight maturation of these cells and also a slight anti- and pro-inflammatory cytokines secretion by Luminex technology. Similarly, about T cells, *G. vaginalis* induced few proliferation and cytokines secretion. Altogether, our data suggests that *in vitro G. vaginalis* possesses weak immunomodulatory properties against DCs and T cells, inducing a low grade inflammatory response, which interestingly, might be tied in to the atypical clinical signs of BV, which being almost non-inflammatory is a specificity. On the contrary, Lcr35 is well internalized by DC causing a dose-dependent maturation and a significant essentially pro-inflammatory (IFN- γ , TNF- α ...) cytokines secretion. Lymphocytic proliferation, is significantly increased at low Lcr35 concentrations reaching a peak at 10⁵ CFU/mL which is associated with IFN- γ production, a pro-Th1 cytokine. Thus, Lcr35 seems to have important immunostimulatory properties and might induce a pro-inflammatory and pro-Th1 response and a maximum IDO activity. To conclude, this profile might potentially be locally efficient against *G. vaginalis* effects, restoring a better quality vaginal inflammatory response. This hypothesis, we named “booster effect” has to be confirmed with *in vitro*, animals model and *in vivo* complementary studies. Some complementary new experiments have been planned in the near future, in which we will study the effect of these two bacteria in an autologous polarization model from DCs and naïve CD4⁺ T cells, intracellular signalization involved in previous results, the effect of these two bacteria co-incubation over these cells and finally the effect of the epithelial component through the Transwell® model which associates epithelial to immune cells.

Table des matières

Avant-propos	1
Revue de littérature.....	4
Chapitre 1 : le système immunitaire adaptatif, de la cellule dendritique à la réponse T.....	5
1. Les cellules dendritiques, diversité et classification.....	5
1.1. Ontogénie des cellules dendritiques.....	6
1.2. Sous-populations de cellules dendritiques	7
1.2.1. Les DC classiques.....	8
1.2.1.1 Les cellules myéloïdes.....	8
1.2.1.2. Les DC plasmacytoïdes	10
1.2.2. Les cellules de Langerhans	11
1.2.3. Les DC dérivées de monocytes.....	11
1.3. Le recrutement des cellules dendritiques dans les tissus non lymphoïdes	13
1.3.1. Du sang jusqu'aux tissus	13
1.3.2. Les chimiokines.....	14
1.4. Reconnaissance des profils moléculaires associés aux bactéries	15
1.4.1. Les Toll-Like Receptors	16
1.4.1.1. Description des Toll-Like Receptors humains	16
1.4.1.2. Voies de signalisation et transduction du signal.....	17
1.4.2. Les Récepteurs de type lectine-C.....	18
1.4.2.1. Modulation par les CLR de la réponse induite par les TLR	19
1.4.2.2. Signalisation induite par les CLR indépendamment des TLR.....	19
1.4.3. Les NOD-Like receptors.....	20
1.4.4. Les RIG-I-Like Receptors	21
1.4.5. La capture des antigènes.....	21
1.5. Migration et maturation des DC suite à la reconnaissance d'un danger.....	22
1.5.1. Modifications structurelles accompagnant la maturation des DC.....	22
1.5.2. L'apprêtement antigénique	23
1.5.3. Migration des cellules dendritiques	24
2. Les lymphocytes T	25
2.1. Le développement des Ly T.....	25
2.2. Le signal 1 : Activation des Lymphocytes T.....	27
2.2.1. La structure du TCR	27
2.2.2. Le modèle de « kinetic segregation » et la synapse immunologique.....	28
2.2.3. Signalisation et voies de transduction du signal	30
2.2.3.1. Initiation de la signalisation.....	30
2.2.3.2. La voie calcique	31
2.2.3.3. Voie de la PKC.....	31
2.2.3.4. Voie des MAPK	31
2.3. Le signal 2 induit par les molécules de costimulation.....	32
2.3.1. Les molécules de la famille B7-CD28.....	32
2.3.2. Les molécules de la famille TNF/TNF-R	34
2.3.3. Le CD40/CD40L	34
2.3.4. La voie de stimulation de la PI3K	35
2.3.5. L'expansion clonale : Interaction IL-2/IL-2R.....	35
2.4. Signal 3 et polarisation lymphocytaire T	36
2.4.1. Les Ly T effecteurs.....	37

2.4.1.1. Le paradigme Th1/Th2	37
2.4.1.2. Les Lymphocytes Th1	37
2.4.1.3. Les Lymphocytes Th2	38
2.4.1.4. Les Ly Th17	39
2.4.2. Les Ly T régulateurs	40
2.4.3. Plasticité lymphocytaire.....	42
2.4.4. Autres sous-populations issues de la lignée lymphoïde	44
Chapitre 2 : Les probiotiques	48
1. Généralités.....	48
1.1. Historique.....	48
1.2. Les différents genres, espèces et souches de probiotiques	49
2. Mécanismes d'action des probiotiques.....	51
2.1. Mécanismes d'action bactériologiques des probiotiques	51
2.2. Les mécanismes d'action immunologiques.....	54
2.2.1. Reconnaissance des probiotiques par les PRR.....	54
2.2.2. Effet des probiotiques sur les cellules dendritiques	58
2.2.3. Expansion clonale et prolifération lymphocytaire	61
2.2.4. Orientation de la réponse lymphocytaire T par les probiotiques	62
2.2.5. Effets des probiotiques sur les autres cellules de l'immunité	64
2.3. Effets bénéfiques des probiotiques dans différentes situations pathologiques.....	66
2.3.1. Les maladies infectieuses	66
2.3.2. Le syndrome de l'intestin irritable.....	68
2.3.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	68
2.3.4. Les maladies allergiques.....	69
2.3.5. Autres pathologies	71
2.4. Le <i>L. rhamnosus</i> Lcr35	73
2.4.1. Caractéristiques du Lcr35	73
2.4.2. Effets bactériologiques bénéfiques du Lcr35.....	74
2.4.3. Effets immunologiques du Lcr35	75
2.4.3.1. Immunomodulation des moDC par le Lcr35	75
2.4.3.2. Immunomodulation observée <i>in vivo</i> par le Lcr35	76
Chapitre 3 : L'appareil génital féminin	78
1. La physiologie vaginale.....	78
1.1. La flore commensale vaginale	79
1.1.1. Composition de la flore commensale vaginale	79
1.1.2. Rôle protecteur de la flore commensale vaginale	80
1.1.2.1. La sécrétion de composés antimicrobiens	80
1.1.2.2. Capacité d'adhésion à l'épithélium vaginal	81
1.2. La muqueuse épithéliale vaginale et immunité innée.....	82
1.2.1 Les cellules épithéliales vaginales sont un premier rempart de protection face aux infections ..	82
1.2.2. Les cellules de l'immunité innée au niveau vaginal	83
1.2.2.1. Classification des sous-populations de DC vaginales	83
1.2.2.2. Autres cellules de l'immunité innée vaginale.....	86
1.2.3. Les cellules composant la réponse immunitaire adaptative vaginale.....	88
1.2.3.1. La réponse lymphocytaire T CD4 vaginale	88
1.2.3.2. La réponse humorale vaginale.....	90
2. La vaginose bactérienne	91
2.1. La vaginose bactérienne est une dysbiose de la flore vaginale	91
2.2. <i>G.vaginalis</i> et son rôle dans l'apparition de la vaginose bactérienne	92
2.2.1. Mécanismes bactériologiques de <i>G. vaginalis</i>	93
2.2.2. Facteurs de virulence de <i>G. vaginalis</i> et rôle dans l'étiologie de la vaginose bactérienne	93
2.3. Les réactions immunitaires associées à la vaginose bactérienne.....	95

2.3.1. Activation du système immunitaire par le liquide cervico-vaginal.....	95
2.3.1.1. Détection par les PRR et réponse cytokinique	95
2.3.1.2. Réponse apportée par les cellules dendritiques	97
2.3.1.3. Réponse apportée par les lymphocytes.....	98
2.3.2. Réponse spécifique de certaines bactéries associées à la vaginose.....	99
2.3.2.1. <i>Gardnerella vaginalis</i>	99
2.3.2.2. <i>Atopobium vaginae</i>	99
2.3.2.3. <i>Prevotella bivia</i>	100
2.3.2.4. <i>Mycoplasma hominis</i>	100
2.4. Les facteurs de risque de la vaginose bactérienne.....	100
2.4.1. Les relations sexuelles	100
2.4.2. Le mode de vie	101
2.5. Symptômes et diagnostic de la vaginose.....	102
2.6. Complications de la vaginose bactérienne	103
2.6.1. Le risque d'accouchement prématuré.....	103
2.6.2. Le risque de maladie inflammatoire pelvienne	104
2.6.3. Le risque d'infection par le virus du SIDA.....	104
2.7. Traitement de la vaginose bactérienne	105
2.8. Vaginose bactérienne et traitement probiotique	106
2.9. Vaginose bactérienne et Lcr35.....	107
Objectifs du travail	109
Travaux personnels	112
Article n°1	113
Slight pro-inflammatory immunomodulation properties of dendritic cells by <i>Gardnerella vaginalis</i>: “The invisible man” of bacterial vaginosis?	113
Les principaux points à retenir de cette étude (Figure 32)	128
Article n°2	129
Dose-dependent immunomodulatory effects of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lcr35 on human dendritic cells and T cells	129
Les principaux points à retenir de cette étude (Figure 33)	156
Résultats complémentaires	157
Discussion générale	159
Conclusion et perspectives	181
Références bibliographiques	183
Annexes	240

Liste des figures

Figure 1. Ontogénie des cellules dendritiques humaines	6
Figure 2. Renouvellement des cellules de Langherans en conditions inflammatoires.....	7
Figure 3. Diapédèse, recrutement des leucocytes dans les tissus.....	13
Figure 4. Voies de signalisation activées par les TLR	17
Figure 5. Modulation de la réponse TLR-induite par le DC-SIGN.....	19
Figure 6. Mécanismes d'entrée des fragments bactériens dans les DC et activation des récepteurs NOD.....	20
Figure 7. Formation du CMH de classe II et capture des antigènes.....	23
Figure 8. Développement des lymphocytes T, des thymocytes doubles négatifs aux T CD4 et CD8	26
Figure 9. Interaction DC-lymphocyte T au sein de la synapse immunologique	29
Figure 10. Interaction entre le CMH de classe II portant un peptide antigénique et le complexe TCR/CD3/CD4 et initiation de la signalisation intracellulaire	30
Figure 11. Signal TCR et initiation de la voie calcique, de la voie du NF- κ B et des MAPK à partir de la phosphorylation des protéines ZAP-70 et LAT	30
Figure 12. Interactions entre les molécules de costimulation portées par les DC et leurs ligands à la surface des lymphocytes T	32
Figure 13. Expansion clonale dépendante de l'IL-2 et de la voie mTOR.....	35
Figure 14. Polarisation des lymphocytes T naïfs après stimulation cytokinique par les DC en quatre sous-populations lymphocytaire, les Th1, Th2, Th17 et Treg.....	36
Figure 15. Effets antagonistes des cytokines sécrétées par les sous-populations lymphocytaires effectrices sur les autres sous-populations	40
Figure 16. Quatre mécanismes d'actions des lymphocytes Treg	41
Figure 17. Plasticité lymphocytaire entre les lymphocytes Th1 et Th17	43
Figure 18. Equivalence entre les cellules lymphoïdes innées et leurs homologues de l'immunité adaptative, les lymphocytes T	46
Figure 19. Mécanismes d'action des probiotiques	51
Figure 20. Interactions entre les probiotiques et les DC au niveau de la muqueuse intestinale	54
Figure 21. Efficacité potentielle des probiotiques dans le traitement de différentes pathologies dysimmunitaires en fonction des sous-populations lymphocytaires induites	66
Figure 22. Schéma de l'appareil génital féminin.....	78

Figure 23. Représentation schématique de la muqueuse vaginale	78
Figure 24. Cinq groupes de communautés bactériennes vaginales de femmes américaines.	79
Figure 25. Représentation des communautés bactériennes vaginales parmi des groupes ethniques de femmes américaines	79
Figure 26. Mécanismes d'action bactériologiques des lactobacilles vaginaux pour lutter contre la flore pathogène	80
Figure 27. Profil des métabolites sécrétés en fonction de la communauté bactérienne vaginale	80
Figure 28. Quatre types d'adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales et inhibition des pathogènes	81
Figure 29. Sous-populations de cellules dendritiques et de macrophage décrites dans la muqueuse vaginale	83
Figure 30. Constitution de la flore vaginale saine, à l'état intermédiaire et de la flore vaginale de femmes ayant une vaginose bactérienne déclarée	91
Figure 31. Représentation des différentes phases de la réponse immunitaire induite par <i>G. vaginalis</i> et/ou le Lcr35 étudiées dans nos travaux	111
Figure 32. Récapitulatif des résultats obtenus après nos expérimentations <i>in vitro</i> sur <i>G. vaginalis</i>	128
Figure 33. Récapitulatif des résultats obtenus après nos expérimentations <i>in vitro</i> sur le Lcr35	156
Figure 34. Effets du Lcr35 sur la maturation des DC infectées par <i>G. vaginalis</i>	157
Figure 35. Analyse de l'effet additif ou synergique de la co-incubation de <i>G. vaginalis</i> et du Lcr35	158
Figure 36. Proposition de concept d'effet Booster du système immunitaire du Lcr35 en présence de <i>G. vaginalis</i>	176

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des phénotypes humain et murin des principales cellules dendritiques connues.....	8
Tableau 2. Les chimiokines et leurs récepteurs	14
Tableau 3. Les TLR et leurs ligands	16
Tableau 4. Répertoire de TLR des DC myéloïdes, plasmacytoïdes et des monocytes	17
Tableau 5. Représentation du calcul du score de Nugent après observation microscopique du prélèvement vaginal	102
Tableau 6. Etudes cliniques double bras, traitement antibiotique vs traitement antibiotique combiné à une cure de probiotiques	106
Tableau 7. Etudes cliniques simple bras, pour étudier les bénéfices de la prise de probiotiques dans le traitement de la vaginose bactérienne	107
Tableau 8. Etudes cliniques analysant l'effet du Lcr35 sur la flore vaginale de femmes ayant une vaginose bactérienne	108

Avant-propos

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle majeur dans l'orchestration de la réponse immunitaire adaptative en induisant de la tolérance ou de l'inflammation. Les DC immatures résident dans les muqueuses des tissus périphériques et dans le sang où, elles surveillent l'environnement *via* de nombreux récepteurs nommés PRR (Pattern Recognition Receptor). Il existe de nombreux PRR comme les TLR, les CLR et les NLR qui reconnaissent des composés microbiens présents sur leur surface comme des sucres, mais aussi au sein des microorganismes comme de l'ADN ou de l'ARN, appelés plus généralement des MAMP (Microbes-Associated Molecular Pattern). Cette stimulation antigénique conduit à la maturation des DC, déterminée par la modification phénotypique de la cellule, avec diminution de la quantité des PRR (DC-SIGN, TLR...) et augmentation de la quantité des molécules de co-stimulation (CD86, CD83...) à leur surface. L'activation des DC se fait par plusieurs MAMP se fixant sur différents PRR, ce qui module leur différenciation et qui, dans un deuxième temps détermine la polarisation des lymphocytes T (Ly T) en, Th1, Th2, Th17 ou T régulateur (Treg). L'un des facteurs majeurs de cette polarisation est la sécrétion de cytokines par les DC. La production d'IL-12, induit une polarisation vers les Th1, la sécrétion d'IL-4 vers les Th2, la synthèse d'une combinaison d'IL-1 β , d'IL-6 d'IL-23 et de TGF- β vers les Th17, et la production d'IL-10 ou de TGF- β par les DC induit des Ly Treg.

Des muqueuses comme celles de l'intestin ou du vagin sont continuellement exposées à des centaines voire des milliers d'espèces bactériennes commensales faisant parties des flores intestinales et vaginales. Pourtant, dans des conditions physiologiques, il n'y a pas ou peu d'inflammation induite à la barrière épithéliale. Le système immunitaire, dont les DC, qui peuvent être en contact direct avec les bactéries grâce au prolongement de leurs dendrites entre les cellules épithéliales, est capable de distinguer les bactéries commensales, des pathogènes, et d'induire une réponse tolérogène. Parmi ces bactéries commensales il existe des lactobacilles, connus pour avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine qui sont utilisés comme probiotique. Dans le but de comprendre les effets que peuvent avoir ces probiotiques, il existe de nombreuses études ayant pour sujet la réponse immunitaire induite par des lactobacilles. Chaque souche a des effets différents. Ceci peut s'expliquer entre autre par une composition différente de leur membrane (MAMP), agissant ainsi sur différents PRR, et modulant la réponse des DC de façon spécifique. La réponse des DC est aussi modulée par la concentration bactérienne à leur contact. En effet, les effets *in vivo* des probiotiques sont généralement observés après une consommation quotidienne, suggérant alors un effet important de la dose

ingérée. Le Lcr35 est un *Lactobacillus rhamnosus* produit à Aurillac, commercialisé depuis plus de 50 ans et utilisé comme probiotique à la fois, dans la sphère intestinale pour lutter contre les diarrhées post-antibiotique, mais aussi dans la sphère vaginale pour lutter contre les récurrences de vaginose bactérienne. Cela fait plusieurs années que le laboratoire d'Immunologie des Facultés de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand s'intéresse aux réponses du système immunitaire vis-à-vis du Lcr35.

Plus récemment, le laboratoire a commencé à s'intéresser à l'utilisation du Lcr35 dans la vaginose bactérienne et dans la compréhension de cette pathologie. Elle correspond à une modification de la flore normale composée essentiellement de lactobacilles en une flore polymicrobienne anaérobie dont *G. vaginalis* joue un rôle majeur. Cette modification de la flore est appelée dysbiose. Il existe peu de connaissances concernant la réponse immunitaire induite par cette dysbiose. *G. vaginalis* étant la bactérie la plus abondante au niveau vaginal lors d'une vaginose bactérienne, nous avons décidé d'étudier la réponse immunitaire associée à cette bactérie, en parallèle de l'étude sur le Lcr35. Ceci, dans le but de comprendre si les effets bénéfiques du Lcr35 dans le traitement secondaire de cette pathologie peuvent être dus à une réponse adaptée du système immunitaire.

Durant ma thèse j'ai donc étudié le comportement immunomodulateur du Lcr35 et de *G. vaginalis*. Pour cela, nous avons développé des modèles expérimentaux *in vitro*, impliquant les cellules effectrices du système immunitaire, les DC et les Ly T, ce qui nous a permis de déterminer le caractère pro- ou anti-inflammatoire des réponses générées par ces deux bactéries.

Dans une première partie introductive, nous allons d'abord détailler les différentes étapes de la réponse immunitaire, depuis la capture des micro-organismes par les DC jusqu'à la production des sous-populations de Ly T engendrées. Ensuite, l'accent sera mis sur les probiotiques, leur grande diversité, les effets connus sur le système immunitaire ainsi que les pathologies dans lesquels ils sont utilisés, tout en faisant une partie dédiée au Lcr35. Enfin, le dernier chapitre de cette revue de la littérature sera dédié à la muqueuse vaginale, la flore et les cellules immunitaires qui la composent en condition physiologique et lors de la vaginose bactérienne.

La deuxième partie exposera les résultats obtenus au cours de cette thèse au travers de deux articles. Le premier article publié en 2016 avait pour but d'analyser les effets de *G. vaginalis* sur les DC et sur la prolifération lymphocytaire. Il est intitulé "*Slight pro-inflammatory immunomodulation properties of dendritic cells by Gardnerella vaginalis: The "invisible man" of bacterial vaginosis*" et a été publié dans la revue "*Journal of Immunology*

Research” (Bertran et al., 2016). Le second, bientôt soumis a eu pour but d’identifier les effets *in vitro* du Lcr35 sur les DC ainsi que sur la réponse lymphocytaire.

La troisième partie consistera en une discussion générale du travail accompli, avant de conclure et de développer quelques perspectives intéressantes.

Revue de littérature

Chapitre 1 : le système immunitaire adaptatif, de la cellule dendritique à la réponse T

1. Les cellules dendritiques, diversité et classification

Les premières cellules dendritiques (DC) ont été observées par Paul Langerhans en 1868 au niveau de la peau (Langerhans, 1868). Ces cellules portent aujourd'hui son nom. Cent ans plus tard, Steinman et Cohn découvrent des cellules semblables dans la rate de souris. Ces cellules ont une forme particulière avec de longs prolongements cytoplasmiques qu'ils appellent dendrites, permettant de les différencier des monocytes et des macrophages et sont dès lors appelées cellules dendritiques (Steinman and Cohn, 1973) (Steinman and Cohn, 1974). Ils découvrent que les DC sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles ayant un rôle majeur dans la mise en place de la tolérance aux antigènes du soi et dans la défense du corps humain contre les infections. Il a donc nécessité plus de 100 ans pour découvrir la fonctionnalité des cellules découvertes par P. Langerhans. Les DC sont rares, elles représentent 1 à 2 % des leucocytes totaux et se retrouvent dans tous les compartiments de l'organisme. En effet, elles sont retrouvées dans le sang, la lymphe, le thymus, la moelle osseuse, les organes lymphoïdes secondaires mais aussi dans le derme, l'épiderme, dans les muqueuses et dans les organes comme le cœur, les poumons, les reins et l'intestin. Elles ont un rôle primordial dans la réponse immunitaire de par leur capacité à capter les antigènes et à induire une réponse spécifique des lymphocytes T (Ly T). Les DC immatures ont le rôle de sentinelles, dispersées dans la peau et les muqueuses, surveillant le microenvironnement et captant une multitude d'antigènes grâce à un grand nombre de récepteurs, alors que les DC matures ont pour rôle de dégrader les antigènes captés et de présenter les peptides antigéniques générés aux Ly T. Il existe différentes lignées de DC, les DC myéloïdes ou conventionnelles (cDC ou cDC) sont généralement opposées aux DC plasmacytoïdes (pDC). Cette classification fera l'objet du paragraphe suivant. Durant les vingt dernières années, il a été difficile de caractériser ces différentes sous-populations de DC et de proposer une classification claire et consensuelle. Cette classification ne fait d'ailleurs toujours pas l'objet d'un consensus. En effet, certaines de ces DC ont des localisations et des fonctions différentes mais expriment des mêmes marqueurs de surface. Cette classification des sous-populations de DC est très changeante en fonction des nouvelles découvertes et reste un sujet d'actualité pour de nombreuses équipes de recherche. Beaucoup d'études ont été effectuées sur les marqueurs des sous-populations de DC chez la souris. Il y en a eu beaucoup moins chez l'Homme, cependant le parallèle entre les sous-

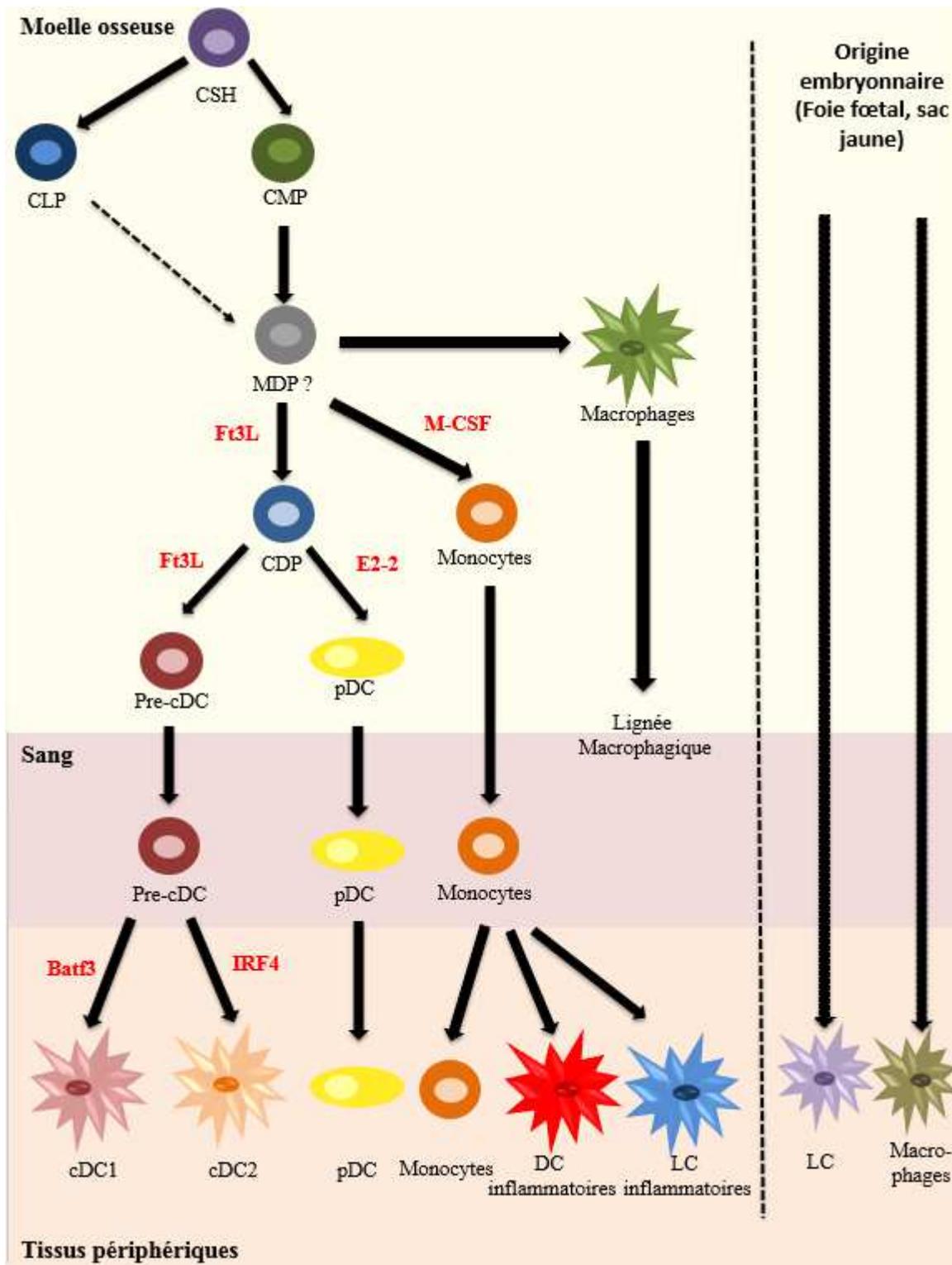


Figure 1. Ontogénie des cellules dendritiques humaines.

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques ; CLP : Précurseur Lymphoïde Commun ; CMP : Précurseur Myéloïde Commun ; MDP : Précurseur des Macrophages et des cellules Dendritiques ; CDP : Précurseur Commun aux cellules Dendritiques ; cDC : Cellules Dendritiques conventionnelles ; pDC : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes ; LC : Cellules de Langerhans.

populations de DC murines et humaines commence à être connu tout en restant incomplet (Segura, 2016). Néanmoins, comme dans ce travail, nous n'avons pas développé de modèles animaux, les sous-populations majeures de DC seront décrites chez l'humain et seulement comparées phénotypiquement avec celles de la souris. Les sous-populations seront tout d'abord brièvement présentées en fonction de leur localisation au sein de l'organisme puis plus précisément en fonction de leur phénotype.

1.1. Ontogénie des cellules dendritiques

L'ontogénie des DC a beaucoup évolué depuis une dizaine d'années, et beaucoup d'interrogations à ce sujet restent en suspens. Les DC ont une demi-vie courte et sont constamment renouvelées, comment sont-elles donc produites ?

Il y a trois niveaux de précurseurs pour aboutir à des DC (Figure 1). Les précurseurs précoces sont dérivés de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ce sont les précurseurs myéloïdes communs (CMP) et les précurseurs lymphoïdes communs (CLP). Tous deux, s'ils sont Ft3L⁺ (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) peuvent engendrer des DC. Cependant, les CLP ne participent que faiblement au renouvellement des DC périphériques. Dans la lignée myéloïde, le précurseur intermédiaire commun aux DC, est le MDP (Macrophage Dendritic Progenitors) (Fogg et al., 2006; Schraml and Reis e Sousa, 2015). Cependant, bien qu'accepté par une majorité de la communauté scientifique, ce précurseur commun est remis en question (Sathe et al., 2014). En effet, d'après cette étude il existerait deux précurseurs intermédiaires, un pour la lignée des macrophages et l'autre pour les cDC et pDC. A l'inverse, une étude datant de 2015 a pu montrer grâce à de la transcriptomique que des caractéristiques du lignage des cDC étaient présentes dans le transcriptome des MDP (Schlitzer et al., 2015a). Au cours du développement, il y a séparation entre la lignée monocyttaire et la lignée dendritique sous l'action respective de M-CSF et de Ft3L. Le nouveau précurseur de la lignée dendritique est le CDP (Common Dendritic cell Progenitors). Ce précurseur peut seulement se différencier en pDC et en pré-cDC sous l'action de Ft3L. Le CDP est donc le premier précurseur situé dans la moelle osseuse dédié uniquement à la formation de pDC et de cDC. A cet instant les monocytes, pDC et pré-cDC passent dans la circulation sanguine. La différenciation finale des pré-cDC se fait au niveau périphérique. Le pré-cDC aboutit alors à 2 lignées distinctes les cDC/CD1c⁺ (ou cDC2) et les cDC/CD141⁺ (ou cDC1) (Breton et al., 2015). Ces trois lignées se différencient de leur

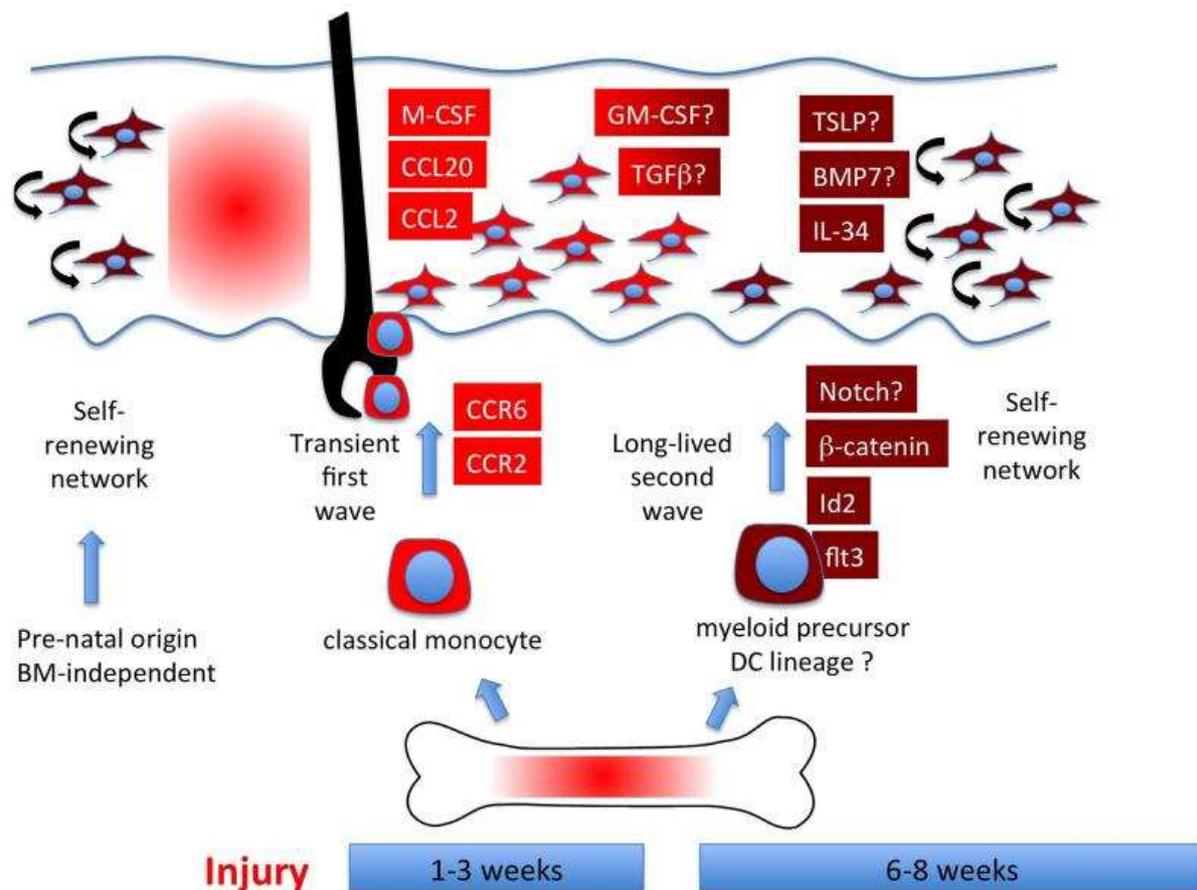


Figure 2. Renouveau des cellules de Langerhans en conditions inflammatoires.

(D'après Collin and Milne, 2016). Le recrutement transitoire des monocytes de manière CCR2 et CCR6 dépendante est tributaire de la présence de M-CSF. Il est suivi par une repopulation du réseau de LC à long terme dépendante d'Id2 à partir d'un précurseur non caractérisé. Flt3 et la β-caténine sont aussi impliqués dans cette repopulation à long terme des LC.

précurseur grâce à trois facteurs de transcription, E2-2 (pDC), IRF4 (cDC2) et Batf3 (cDC1)(Cisse et al., 2008; Poulin et al., 2012; Schlitzer et al., 2013).

Les monocytes, en condition d'inflammation peuvent se différencier en DC inflammatoires (Guilliams et al., 2014; Liu et al., 2009; Merad et al., 2013). Ces cellules générées *in vivo* lors d'une inflammation sont phénotypiquement proches des cellules dendritiques dérivées de monocytes générées *in vitro* (Briseño et al., 2016). Les cellules de Langerhans (LC) proviennent d'une lignée différente des pDC et cDC. Pour certains auteurs, les LC ont une origine embryonnaire (tout comme certains macrophages des tissus) et ne dériveraient pas de progéniteur des DC (Schuster et al., 2012). Ces cellules plutôt proches des macrophages seraient capable de s'auto-renouveler durant toute la vie en absence d'inflammation sous contrôle du TFG- β (Kanitakis et al., 2011; Kel et al., 2010). Cependant, lors d'une inflammation, il pourrait y avoir deux vagues de reconstitution des LC : la première à partir de monocytes, la deuxième plus tardive à partir d'un précurseur des DC (Collin and Milne, 2016) (Figure 2).

1.2. Sous-populations de cellules dendritiques

Les DC sont principalement situées dans trois localisations, à savoir le sang, les tissus non lymphoïdes et les tissus lymphoïdes. Dans ces trois localisations, sont retrouvées des DC exprimant les mêmes marqueurs membranaires (détaillés dans la partie suivante) mais n'ayant pas les mêmes fonctions (Tableau 1).

- Les DC du sang, sont souvent immatures et considérées comme des précurseurs des DC retrouvées dans les tissus et les organes lymphoïdes secondaires. Les DC ont d'abord été identifié dans le sang grâce aux BDCA (Blood Dendritic Cell Antigen). Il existe les BDCA 1, 2, 3 et 4 caractéristiques de sous-populations de DC. Les BDCA 1 sont les cDC2, les BDCA3 sont les cDC1 et les BDCA 2 et 4 sont les pDC.

- Les DC des tissus non lymphoïdes correspondent aux DC actives ayant comme précurseur les DC du sang. Elles sont dites migratoires, elles captent les antigènes dans les tissus et migrent vers les ganglions lymphatiques les plus proches. Il existe des sous-populations caractéristiques des tissus dans lesquels elles sont présentes. Par exemple, au niveau de la peau on distingue les LC des DC dermiques.

Tableau 1. Comparaison des Phénotypes humain et murin des principales cellules dendritiques.

Cellules	Marqueurs d'identification humains	Équivalents murins	Localisation
 cDC1	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD123 ^{low} CD141 ⁺ (BDCA3) XCR1 ⁺ CLEC9A ⁺ TLR 3 et 10 ⁺⁺ TLR 1-2-6-8 ⁺	CD8 ⁺ CD103 ⁺ Batf3 ⁺ CD205 ⁺ Langerine ⁺ XCR1 ⁺ CLEC9A ⁺	Sang Ganglions lymphatiques (migratoires et résidentes) Tissus périphériques
 cDC2	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD123 ^{low} CD1c ⁺ (BDCA1) CD1a ⁺ Sirpa ⁺ CX3CR1 ⁺ TLR 1 à 8 ⁺	CD11b ⁺ IRF4 ⁺ CD24 ⁺ CD4 ⁺ Sirpa ⁺ CX3CR1 ⁺	Sang Ganglions lymphatiques (migratoires et résidentes) Tissus périphériques
 pDC	CD123 ⁺ CD11c ⁻ CD303 ⁺ (BDCA2) CD304 ⁺ (BDCA4) TLR 7 et 9 ⁺	SiglecH BSTLy6c2	Sang Ganglions lymphatiques (résidentes) Tissus périphériques lors d'une inflammation
 LC	CD207 ⁺ E-cadhérine ⁺ CD1a ^{low}	F4/80 CD205	Ganglions lymphatiques (migratoires) Tissus périphériques

- Les DC résidentes sont présentes dans les tissus lymphoïdes. Dans ces tissus, sont retrouvées à la fois les DC migratoires venant faire la présentation d'antigène ainsi que les DC résidentes. Les deux types de DC sont souvent difficiles à séparer.

Dans ces tissus, les sous-populations de DC présentes sont en partie différentes en fonction des conditions homéostasiques ou inflammatoires de l'organisme. De plus, lors d'une inflammation, il y a l'apparition d'une nouvelle sous-population, dérivée de monocytes, les DC inflammatoires.

1.2.1. Les DC classiques

1.2.1.1 Les cellules myéloïdes

Les cDC sont CD11c⁺ CD123^{low}, CD123 étant un marqueur spécifique des pDC. Les monocytes expriment aussi le CD11c⁺ mais les cDC n'expriment ni le CD14, ni le CD16, exprimé par les monocytes. Il existe deux types de cellules myéloïdes, les CD1c⁺ (BDCA1 ou cDC2) et les CD141⁺ (BDCA3 ou cDC1). Dans le sang, la stratégie de sélection de ces deux sous-types de cellules myéloïdes est la suivante, elles sont lin⁻/HLA-DR⁺/CD11c⁺/CD123^{low}/CD1c⁺ DC ou, lin⁻/HLA-DR⁺/CD11c⁺/CD123^{low}/CD141⁺ DC. Ces sous-populations humaines correspondent respectivement aux sous-populations CD11b⁺/IRF4⁺ DC et CD8⁺/CD103⁺/Batf3⁺ DC murines (Bachem et al., 2010; Schlitzer et al., 2013). Ces deux sous-types de DC sont retrouvés dans le sang où elles sont présentes sous forme immature et seraient les précurseurs des DC actifs retrouvés dans les tissus et les organes lymphoïdes secondaires.

Les CD1c⁺ cDC (cDC2) :

Au niveau du derme, elles expriment le marqueur CD1a, sont migratoires et capables de stimuler des Ly T naïfs (Angel et al., 2006). Elles se différencient des cellules de Langerhans (LC) par une plus forte expression en CD1a et l'absence d'expression de la Langherine (CD207) et de l'E-cadhérine (Klechevsky et al., 2008). Elles sont plus activées en termes d'expression de CD80, CD83, CD86 et CD40 que leur précurseur sanguine.

Au niveau de l'intestin, elles sont CD103⁺ Sirpα⁺ (Watchmaker et al., 2014).

Cette sous-population de DC est l'équivalent humain des sous-populations bien connues chez la souris : CD11b⁺/IRF4⁺ DC (Bachem et al., 2010; Schlitzer et al., 2013).

Dans les ganglions lymphatiques, elles prennent le nom de cellules interdigitées de la zone T. Ce sont souvent des cellules ayant migrées des tissus non lymphoïdes. Les amygdales

et la rate contiennent aussi des cDC2 ce qui signifie que certaines cDC2 sont résidentes et proviennent directement du sang.

Ces DC sont très bien équipées en PRR (Pattern Recognition Receptor), à la fois TLR (Toll-Like Receptor) (TLR 1-8) et récepteurs de type lectine C (CLR) (Hémont et al., 2013) (Cf chapitre 1.4). Grâce à cela, elles peuvent reconnaître une grande variété d'antigènes, qu'ils soient d'origine bactérienne, fongique, virale... Elles stimulent de façon efficace les Ly T CD4 naïfs mais ont une capacité moindre que les CD141⁺ à faire de la présentation croisée aux Ly T CD8 (Bachem et al., 2010). En condition homéostasique, les cDC2 activent les Ly T CD4 *via* le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II et les orientent vers un profil tolérogène mais aussi de type Th17 (Coombes et al., 2007; Watchmaker et al., 2014). Dû à la grande plasticité de ces sous-populations lymphocytaires, les cDC2 ont un rôle dans la régulation intestinale de l'homéostasie Treg/Th17 (Schlitzer et al., 2015a). Lors d'une infection les cDC2 sont spécialisées dans la réponse aux pathogènes extracellulaires qui requière des Th17 et des Th2 (Persson et al., 2013; Schlitzer et al., 2013). Les cDC2 produisent très peu de Th1 et ont peu d'efficacité contre les infections virales (Benlahrech et al., 2015).

Les CD141⁺ cDC (cDC1) :

Au départ identifiées dans le sang, les CD141⁺ (cDC1) sont tout comme les cDC2 retrouvées dans les tissus non lymphoïdes, les ganglions lymphatiques mais aussi les amygdales, la rate et la moelle osseuse. Elles peuvent donc être à la fois migratoires et résidentes.

Cette sous-population de DC est l'équivalent humain des sous-populations bien connues chez la souris : CD8⁺/CD103⁺/Batf3 DC (Bachem et al., 2010; Schlitzer et al., 2013).

Du fait de leur nombre limité, 0,1% des cellules mononucléées, elles sont difficiles à identifier. Elles expriment moins de TLR que les cDC2. Elles expriment très fortement, les TLR 3 et 10, plus faiblement les TLR 1-2-6-8 mais n'expriment pas les TLR 4-5-7-9 (Hémont et al., 2013). Par analogie avec ce qui est observé dans les modèles murins, les cDC1 sont capable *via* le CMH de classe I de faire de la présentation croisée avec les Ly CD8. L'axe XCR1 et XCR1-Ligand joue un rôle majeur régulateur dans le maintien de l'homéostasie intestinale en stimulant la production de Ly Treg naturel au niveau thymique (Lei et al., 2011; Ohta et al., 2016). En condition inflammatoire, la génération de Th1/Th17 est plus importante. La réponse majeure de ces DC, et la sécrétion de ces cytokines qui s'ensuit, se fait *via* le TLR 3, suggérant un rôle important dans l'immunité antivirale : Le TLR 3 reconnaissant l'ARN virale double brin (Cf

1.4.1.). Elles expriment aussi d'autres récepteurs, comme les CLR, le CLEC9A, XCR1, ce qui leur permet de fixer les cellules abimées ou nécrotiques et de les présenter aux Ly T CD8. De plus, les cDC1 induisent la sécrétion d'IL-12 et sont de très bons inducteurs de Th1. Ils ont donc un rôle important dans la lutte contre les bactéries intracellulaires et les infections virales grâce à leur effet cytotoxique (Farache et al., 2013; Hildner et al., 2008; Jongbloed et al., 2010).

1.2.1.2. Les DC plasmacytoïdes

Les pDC ont été découvertes en 1999, depuis, les études portant sur cette population ont augmenté de façon exponentielle (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Elles diffèrent des cDC de par leur morphologie, elles sont petites, rondes avec un large cytoplasme et une absence de dendrites. Elles changent de morphologie en mûrissant après stimulation de leurs récepteurs. Les pDC sont CD11c⁻ (en opposition avec les cDC) et expriment les marqueurs CD123 (récepteur à l'IL-3), CD303 (BDCA2) et CD304 (BDCA4) (Dzionek et al., 2000). En condition homéostasique, les pDC sont peu nombreuses dans les tissus mais sont très présentes dans le sang, les ganglions lymphatiques et organes lymphoïdes secondaires. Dans cet état, les pDC ont pour rôle principal de sécréter de l'IFN de type I (Liu, 2005). L'IFN de type I est pléiotrope ; il permet d'inhiber la réplication virale, d'augmenter la réponse immunitaire innée (DC, NK...) et la réponse immunitaire spécifique (CD4, CD8, LyB...). Les pDC expriment moins de TLR que les cDC mais expriment très fortement et sont majoritairement activées par les TLR 7 et 9 qui sont intracellulaires, en réponse aux acides nucléiques viraux et du soi ainsi qu'aux motifs CpG de l'ADN bactérien (Gilliet et al., 2008; Lande et al., 2007). Lors d'une inflammation, peu de pDC migrent du site d'inflammation vers les ganglions lymphatiques pour activer les Ly T naïfs (GeurtsvanKessel et al., 2008). Cependant, une fois activée, lors d'une inflammation, les pDC changent de conformation et de fonction pour devenir des CPA capable de stimuler des Ly T naïfs (Soumelis and Liu, 2006). C'est pourquoi certains auteurs affirment que le rôle d'APC tenu par les pDC viendrait d'une différenciation des pDC en cDC, bien que certains les considèrent comme des pDC à part entière (Liou et al., 2008; Lombardi and Khaiboullina, 2014). Ce sujet est encore largement discuté. Après activation des TLR, elles sont capables de capturer, digérer et présenter les antigènes (essentiellement viraux) *via* le CMH de type II et le CMH de type I (Tel et al., 2012; Villadangos and Young, 2008). Elles activent donc à la fois les Ly T CD4 (de façon moins efficace que les cDC1) et les Ly T CD8, permettant de lutter

contre une infection virale. Les pDC sont aussi capables d'induire de la tolérance (Goubier et al., 2008; Kohli et al., 2016).

1.2.2. Les cellules de Langerhans

Les LC sont des DC immatures présentes dans l'épiderme et dans l'épithélium stratifié des muqueuses, gingivale, génitale et de la cornée (Collin and Milne, 2016). Elles expriment des molécules très spécifiques qui les différencient nettement des autres sous-populations de DC. Ces molécules sont un CLR, le CD207 (la langerhine), l'E-cadhérine (molécule d'adhésion) et possèdent des structures cytoplasmiques uniques appelées granules de Birbeck (Romani et al., 2010; Tang et al., 1993; Valladeau et al., 2000). Toutes les autres sous-populations de DC sont CD207⁻. Elles expriment aussi le CD1a mais à une moindre mesure que les cDC1 dermiques. Les LC peuvent aussi migrer et induire une réponse spécifique en présentant les peptides captés aux Ly T. Elles ont un rôle tolérogène important au niveau des muqueuses au contact de bactéries commensales, tout en conservant leur capacité à répondre en cas de présence de pathogènes. Les LC sont sécrétrices de cytokines induisant une réponse de type Th2 (Klechevsky et al., 2008). Tout comme les cDC2, elles se retrouvent dans la zone T (paracortex) dans les ganglions lymphatiques. Comme nous l'avons vu précédemment, les LC auraient une origine embryonnaire et seraient apparentées aux macrophages (Schuster et al., 2012). Cependant, lors d'une inflammation, les monocytes ainsi que les cDC2 du sang, peuvent être des précurseurs des LC lorsqu'ils sont stimulés par les facteurs connus pour différencier les LC (Milne et al., 2014; Seré et al., 2012).

1.2.3. Les DC dérivées de monocytes

Les DC inflammatoires :

Les DC inflammatoires ne sont pas présentes à l'état d'homéostasie mais apparaissent suite à une infection ou à une inflammation. Ces DC inflammatoires n'ont pas la même ontogénie que les cDC et pDC et n'ont pas de précurseurs communs. En effet, dans ces conditions, sous l'influence de cytokines comme le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating factor) et l'IL-4, les monocytes sanguins peuvent se différencier en DC inflammatoires et se diriger vers la zone d'inflammation. Sur le site d'infection les DC

inflammatoires captent les antigènes et du fait de l'expression de CCR7 migrent dans les ganglions lymphatiques où elles peuvent jouer leur rôle de CPA (Qu et al., 2014). Elles ont de nombreuses propriétés, elles peuvent stimuler les Ly T CD4 naïfs et induire des Ly Th1, faire de la présentation croisée avec les Ly T CD8 et sécréter un grand nombre de cytokines (León et al., 2007).

Les DC dérivées de monocytes, moDC, in vitro :

Dans le but d'étudier les DC *in vitro*, il est possible d'induire la différenciation de monocytes en moDC. Cela peut s'effectuer de deux manières, la première étant de stimuler les monocytes par du GM-CSF et de l'IL-4 *in vitro*. Ce modèle est très utilisé pour la recherche sur les DC humaines. Ce sont les cellules que nous utilisons dans nos modèles. Les monocytes ont cet avantage d'être abondantes dans le sang et représentent environ 10% des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). De plus, les DC sont peu nombreuses dans le sang périphérique et il était difficile de les isoler. Différents kits de sélection sont maintenant commercialisés. Les moDC ont bien des caractéristiques de DC car elles expriment les marqueurs CD11c, CD1c, HLA-DR, CD40, CD1a, CD206, CD209, CD86, CCR7... (Dauer et al., 2003; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Elles peuvent stimuler des réponses de type Th1, Th2, Th17 et Treg en fonction des stimuli (Estrada-Capetillo et al., 2013; Nakano et al., 2009; Plantinga et al., 2013). L'IL-4 semble requis pour induire une présentation croisée optimale des moDC générées par l'ajout de GM-CSF. Des monocytes au contact de GM-CSF seul induit des macrophages dérivées de monocytes. L'IL-4 induit une augmentation de l'expression des facteurs de transcription Batf3 et IRF4, qui, *in vivo* sont responsables de la différenciation des pré-cDC en cDC1 et cDC2, respectivement (Briseño et al., 2016) Selon l'environnement créé *in vitro*, il est possible de produire des moDC engendrant des réponses tolérogènes ou inflammatoires en ajoutant dans le milieu de culture de l'IL-10 ou de l'IFN- γ , respectivement. Il est aussi possible de produire des moDC à partir de GM-CSF et d'IL-15. Les réponses sont alors différentes. Ce type de moDC sont plus efficaces pour activer les lymphocytes T cytotoxiques qui expriment des taux plus élevés d'IFN- γ , de granzyme B et de perforine (Dubsky et al., 2007).

CD14⁺ :

Les cellules CD14⁺ ont pendant longtemps étaient nommées DC CD14⁺. Depuis quelques années, leur classification en DC est controversée et certains auteurs proposent de les classer en macrophage (McGovern et al., 2014). Dans tous les cas ce sont des cellules dérivées

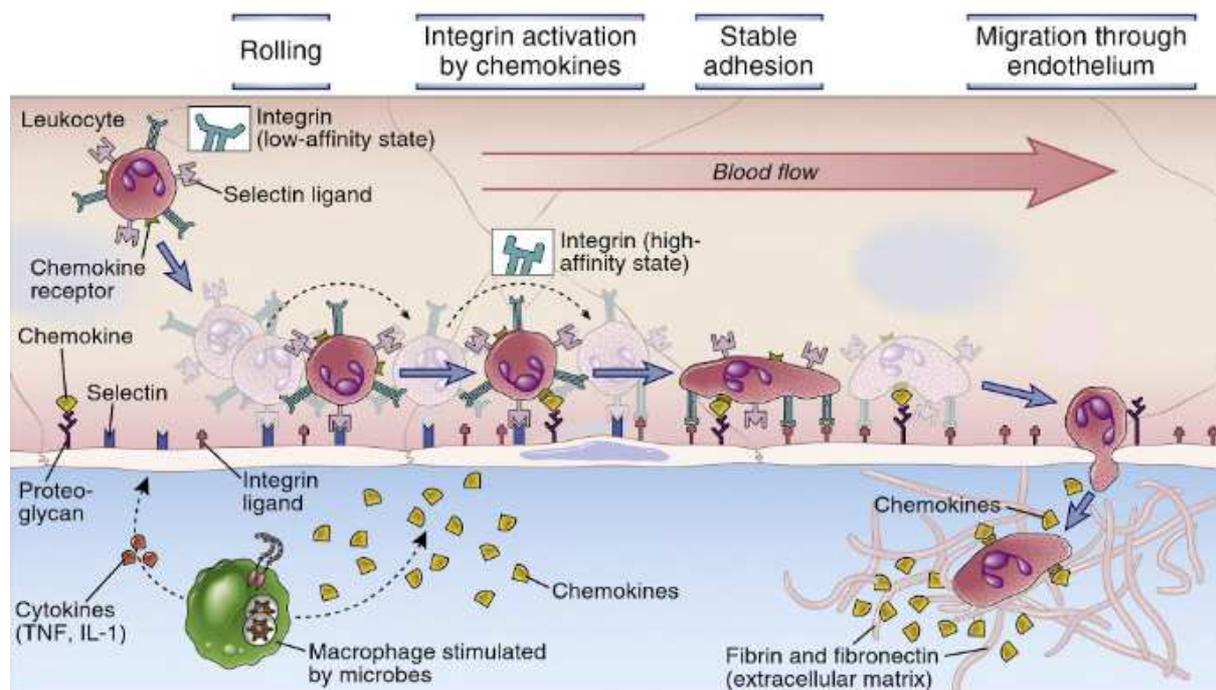


Figure 3. Diapédèse, recrutement des leucocytes dans les tissus (D'après Abbas et al., 2014).

Au site de l'infection les cellules de l'immunité innée étant entrées en contact avec des micro-organismes produisent du TNF et de l'IL-1 qui activent les cellules endothéliales les plus proches pour produire des sélectines, les ligands des intégrines et des chimiokines. La faible interaction entre les leucocytes et les sélectines ralentit les cellules dans le courant sanguin. Les chimiokines présentes à la surface des cellules endothéliales se lient à leurs récepteurs sur les leucocytes ce qui résulte en l'activation des intégrines de haute affinité avec leur ligand. Les leucocytes à l'arrêt au plus proche de l'infection traversent l'épithélium.

de monocytes ayant un phénotype intermédiaire entre les monocytes et les macrophages. Cependant, elles ne sont pas comparables aux DC dérivées de monocytes en contexte inflammatoires qui elles, sont proches des moDC utilisées dans nos modèles *in vitro*. Elles sont présentes en petite quantité dans beaucoup de tissus non-lymphoïdes comme le derme. Elles expriment aussi le CD11c (comme les cDC) mais n'expriment ni le CD1c, ni le CD141. Les DC CD14⁺ dermiques stimulent moins efficacement les Ly T naïfs que les LC (ce qui est un argument en faveur de leur classification en macrophage) (Klechevsky et al., 2008). Elles ont une forte capacité à capter des antigènes et induisent l'apparition de Ly Th folliculaires (Caux et al., 1997; Klechevsky et al., 2008). La formation de Ly Th folliculaires induit la différenciation des Ly B en plasmocytes à IgM (King et al., 2008). De plus, elles sécrètent fortement du CXCL13 qui est chimio-attractant pour les Ly B (Klechevsky et al., 2008). Enfin, les DC CD14⁺ peuvent être tolérogènes grâce à leur capacité à sécréter d'importantes quantités de la cytokine immuno-régulatrice IL-10 (Schlitzer et al., 2015b).

1.3. Le recrutement des cellules dendritiques dans les tissus non lymphoïdes

Les DC ont un rôle majeur dans la défense de l'organisme tant au niveau de l'immunité innée qu'adaptative. Pour que les DC immatures expriment leur rôle de sentinelles de l'environnement, il faut qu'elles soient adressées dans les différents tissus non lymphoïde, comme la muqueuse intestinale. Pour cela, elles sont attirées par des chimiokines leur permettant de se diriger vers ces tissus. Le recrutement des DC et la sécrétion de chimiokine se passent aussi bien, en condition homéostatique pour effectuer leur rôle de surveillance, qu'en condition inflammatoire pour l'adressage des DC inflammatoires dans la zone de l'inflammation. Dans les sous-paragraphes suivants, l'exemple sera pris d'une situation d'inflammation ou d'infection.

1.3.1. Du sang jusqu'aux tissus

Le recrutement des DC dans les tissus se fait en trois étapes (Figure 3). Tout d'abord, il y a un phénomène de "rolling". Lors d'une inflammation, il y a sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL-6) par les cellules du microenvironnement touchées par l'inflammation. Les cellules endothéliales à proximité de l'inflammation expriment alors les sélectines CD62P (P-selectin), CD62E (E-selectin). Les DC immatures possèdent à leur surface

Tableau 2. Les chimiokines et leurs récepteurs.

Récepteurs de chimiokines	Chimiokines	Nom	Rôle principal
CC Receptor			
CCR1	CCL3	MIP-1 α	Recrutement de leucocytes
	CCL5	RANTES	Recrutement de leucocytes
	CCL7	MCP-3	Recrutement de leucocytes
	CCL9	MIP-1 γ	Recrutement de DC
	CCL14	HHC-1	
	CCL15	MIP-1 δ	Recrutement de leucocytes
	CCL16	HHC-4	Recrutement de Lymphocytes et de monocytes
CCR2	CCL2	MCP-1	Recrutement de leucocytes
	CCL7	MCP-3	Recrutement de leucocytes
	CCL12	MCP-5	Recrutement de leucocytes
	CCL13	MCP-4	Recrutement de leucocytes
	CCL16	HHC-4	Recrutement de Lymphocytes et de monocytes
CCR3	CCL5	RANTES	Recrutement de leucocytes
	CCL7	MCP-3	Recrutement de leucocytes
	CCL8	MCP-2	Recrutement de leucocytes
	CCL13	MCP-4	Recrutement de leucocytes
	CCL15	MIP-1 δ	Recrutement de leucocytes
	CCL24	Eotaxin-2	Recrutement PN éosinophiles, basophiles et Th2
CCR4	CCL17	TARC	Recrutement des Ly T
	CCL22	MDC	Recrutement de NK et de Ly T
CCR5	CCL3	MIP-1 α	Recrutement de leucocytes
	CCL4	MIP-1 β	Recrutement des Ly T, DC, monocytes et NK, corécepteur du VIH
	CCL5	RANTES	Recrutement de leucocytes
	CCL8	MCP-2	Recrutement de leucocytes
	CCL14	HHC-1	
CCR6	CCL20	MIP-3 α	Migration des DC dans les tissus, recrutement des Ly Th17
CCR7	CCL19	MIP-3 β /ELC	Migration des DC et des Ly T dans le paracortex des ganglions lymphatiques
	CCL21	SLC	Migration des DC et des Ly T dans le paracortex des ganglions lymphatiques
CCR8	CCL1	I-309	Recrutement de monocytes et migration des cellules endothéliales
	CCL18	DC-CK1	Homing de DC et de Ly
CCR9	CCL25	TECK	Recrutement de Ly dans l'intestin
CCR10	CCL27	CTACK	Recrutement de Ly T au niveau de la peau
	CCL28	MEC	Homing de Ly T et B dans les muqueuses
CXC Receptor			
CXCR1	CXCL6	GCP-2	Recrutement des PN neutrophiles
	CXCL8	IL-8	Recrutement des PN neutrophiles
CXCR2	CXCL1	GRO α	Recrutement des PN neutrophiles
	CXCL2	GRO β	Recrutement des PN neutrophiles
	CXCL3	GRO γ	Recrutement des PN neutrophiles
	CXCL5	ENA-78	Recrutement des PN neutrophiles
	CXCL6	GCP-2	Recrutement des PN neutrophiles
	CXCL7	NAP-2	Recrutement des PN neutrophiles
	CXCL8	IL-8	Recrutement des PN neutrophiles
	CXCL9	Mig	Recrutement des Ly T effecteurs
CXCR3	CXCL10	IP-10	Recrutement des Ly T effecteurs
	CXCL11	I-TAC	Recrutement des Ly T effecteurs
	CXCL4	PF4	Aggrégation plaquettaire
CXCR3B	CXCL10	IP-10	Recrutement des Ly T effecteurs
CXCR4	CXCL12	SDF-1 $\alpha\beta$	Recrutement de leucocytes, corécepteur du VIH
CXCR5	CXCL13	BCA-1	Migration des Ly B et des Ly T fh dans les follicules
CXCR6	CXCL16		Recepteur scavenger de macrophages
CXCR7	CXCL11	I-TAC	Recrutement des Ly T effecteurs
XC Receptor			
XCR1	XCL1	Lymphotactine	Recrutement de ly T et de NK
XCL1	XCL2	SM-1 β	Recrutement de ly T et de NK
CX₃C Receptor			
CX3CR1	CX3CL1	Fractalkine	Recrutement de Ly T, NK, de monocytes et activation des Ly T cytotoxiques et des NK

des ligands des sélectines (PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1), ESL-1 (E-Selectin ligand 1) et CLA-1 (Cutaneous Lymphocyte Antigen 1)). Il y a alors une interaction faible entre les sélectines et leur ligand permettant de ralentir les DC présentes dans la circulation sanguine. Elles "roulent" donc à la surface des cellules endothéliales, c'est le phénomène de "rolling".

Les cellules de l'immunité innée présentes dans le tissu du foyer inflammatoire, ainsi que d'autres cellules de l'environnement sécrètent alors des chimiokines, qui sont des cytokines chimio-attractantes, au niveau de la zone d'infection. Elles passent dans la circulation et se fixent sur des protéoglycanes présents sur les cellules endothéliales, ce qui crée un gradient de concentration de ces chimiokines. Les DC inflammatoires suivent ce gradient de concentration grâce à leurs récepteurs de chimiokine. Cette étape permet aussi la modification de la conformation des intégrines LFA-1 (Leukocyte Function-associated Antigen 1), présentes sur les DC qui étaient alors inactives. LFA-1 se déplie et devient prêt à interagir avec son ligand ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule 1 ou CD54). ICAM-1 est exprimé par les cellules endothéliales les plus proches du foyer inflammatoire du fait de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules du microenvironnement proche de l'infection. Cette interaction est de forte affinité, ce qui induit l'arrêt de la cellule dans la circulation sanguine au plus proche du site d'infection. Ainsi, la diapédèse, c'est-à-dire la migration à travers les cellules endothéliales vers les tissus peut se produire (Abbas et al., 2014). Cette étape est identique pour tous les leucocytes migrant sur un site d'infection et ne sera pas rappeler dans le chapitre sur les Ly T.

1.3.2. Les chimiokines

Elles forment un groupe de cytokines possédant des pouvoirs chimiotactiques et pouvant agir sur un grand nombre de leucocytes. Elles sont sécrétées par les cellules de l'environnement dans les tissus proches d'un site infectieux ou inflammatoire ainsi que par les cellules de l'immunité innée de ce même tissu. Il existe entre 40 et 50 chimiokines différentes. Un grand nombre attirent les DC dans les tissus en condition homéostatique permettant un fort renouvellement, mais également les DC inflammatoires, lors d'une infection ou d'une inflammation. Dans l'heure suivant l'infection, les DC inflammatoires commencent à s'accumuler au site d'infection. Les DC immatures expriment un grand nombre de récepteurs de surface de ces chimiokines. La plupart de ces récepteurs ont la capacité de reconnaître plusieurs chimiokines (Banchereau et al., 2000) (tableau 2). Cette redondance fonctionnelle en

fait un système robuste (Mantovani, 1999). Le CCR6 (C-C Chemokine Receptor 6) est très exprimé par les DC immatures (et les lymphocytes) et joue un rôle primordial dans l'acheminement de ces cellules dans les muqueuses, plus particulièrement la muqueuse intestinale que ce soit en condition homéostatique ou inflammatoire. Le ligand MIP-3 α (Macrophage Inflammatory Protein 3 α), autrement appelé CCL20 (C-C Chemokine ligand) se fixe sur CCR6. Le CCL20 est sécrété dans les plaques de Peyer et surexprimé en condition inflammatoire (Charbonnier et al., 1999; Cook et al., 2000; Dieu-Nosjean et al., 1999; Greaves et al., 1997; Power et al., 1997). L'acheminement des DC vers un tissu est appelé le "homing" ou adressage et le couple CCR6/CCL20 est primordial pour l'adressage des DC immatures dans les tissus alors que le couple CCR7/CCL19-CCL21 permet l'adressage des DC ayant captées un antigène vers les ganglions lymphatiques. Dans ces tissus lymphoïdes, elles peuvent alors présenter les antigènes dégradés en peptides aux Ly T naïfs, qui grâce au couple CCR6/CCL20 migreront à leur tour dans les tissus.

Une fois dans les muqueuses, les DC immatures surveillent l'environnement, rencontrent, reconnaissent et captent les antigènes, comme nous allons le décrire dans les paragraphes suivants.

1.4. Reconnaissance des profils moléculaires associés aux bactéries

Les DC immatures ont un rôle de sentinelle surveillant l'environnement et reconnaissent globalement le "soi" du "non soi" infectieux. En tant que sentinelles, les DC immatures possèdent une batterie complète de récepteurs de l'immunité innée, les PRR (pattern recognition receptor). Ils regroupent plusieurs familles, qui seront décrites ultérieurement, comme les TLR (Toll-like receptor), les CLR (C-type Lectin receptor), mais aussi les NLR (NOD-Like Receptor) et les RLR (Retinoic acid-inducible gene I (RIG I) Like Receptor). Les DC immatures scrutent l'environnement grâce à leurs PRR, et reconnaissent des signaux de danger, les DAMP (Danger-Associated Molecular Patterns). Ces signaux de danger peuvent être des produits de stress cellulaires et tissulaires émis par des cellules infectées par des bactéries, des virus, des cellules en nécrose ou en train de se différencier en tumeur (Matzinger, 1994). Ces signaux sont essentiellement des protéines comme l'acide urique, les HSP (Heat-Shock Protein) et des acides nucléiques (Lotze and Tracey, 2005; Shi et al., 2003). Les PRR reconnaissent aussi des structures partagées par des bactéries, très conservées au cours du temps connues sous le nom de MAMP (Microbes-Associated Molecular Patterns) pour les micro-

Tableau 3. Les TLR et leurs ligands.

TLR	Composés microbiens	Espèces
TLR1/2	Triacyl lipopeptides	Bactéries et mycobactéries
TLR2	PG	Bactéries à Gram +
	Porines	Neisseria
	Lipoarabinomannane	Mycobactéries
	Phospholipomannane	Candida albicans
	Glucuronoxylomannane	Cryptococcus neoformans
	tGPI-mutine	Trypanosoma
	Hemagglutinine	Measles virus
	ND	HCMV, HSV1
TLR3	ARN double brin	Virus
TLR4	LPS	Bactéries à Gram -
	Mannane	Candida albicans
	Glucuronoxylomannane	Cryptococcus neoformans
	Glycoinostolphospholipides	Trypanosoma
	Protéines de l'enveloppe	RSV, MMTV
	Heat-shock Protein 60,70	Hôte
	Fibrinogène	Hôte
TLR5	Flagelline	Bactéries flagellées
TLR6/2	Diacyl lipopeptides	Mycoplasme
	LTA	Streptococcus du groupe B
	Zymosan	Saccharomyces cerevisiae
TLR7 et TLR8	ARN simple brin	Virus
TLR9	ADN-CpG	Bactéries et mycobactéries
	Hemozoine	Plasmodium
TLR10	Pas de ligand spécifique connu	

organismes en général et PAMP (Pathogen-Associated molecular Patterns), pour les bactéries pathogènes. La première hypothèse de l'existence de ces motifs uniques aux micro-organismes et absents des cellules eucaryotes a été émise en 1989 par C. Janeway Jr (Janeway, 1989). Les PRR étant en très grand nombre sur les DC, et les PAMP en grand nombre sur les pathogènes, il y a de nombreux contacts DC-pathogènes, activant simultanément plusieurs PRR. Cette combinaison d'activation permet d'orienter le système immunitaire vers une réponse spécifique au pathogène reconnu *via* l'induction de signaux intracellulaires.

1.4.1. Les Toll-Like Receptors

1.4.1.1. Description des Toll-Like Receptors humains

Les TLR sont les PRR les mieux caractérisés à ce jour. Les récepteurs « Toll » ont initialement été découverts par Jules Hoffmann grâce à ses travaux sur la drosophile. Chez l'Homme, des homologues ont été identifiés à la fin des années 1990 et ont été nommés Toll-Like Receptors (Medzhitov et al., 1997). Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires caractérisées par un domaine extracellulaire contenant un grand nombre de motifs riches en leucine (LRR) et un domaine de signalisation cytoplasmique, homologue au récepteur de l'IL-1 (IL-1R), appelé le domaine Toll/IL-1R (TIR) (Bowie and O'Neill, 2000). Chez l'Homme, il existe 10 TLR, nommés TLR 1-10. Les TLR 1-2-4-5-6-10 sont localisés à la surface des cellules alors que les TLR 3-7-8-9 sont intracellulaires et localisés dans des endosomes (Chaturvedi and Pierce, 2009; Takeda and Akira, 2005). Chaque TLR a une spécificité quant à son profil de reconnaissance (Tableau 3). Les TLR membranaires reconnaissent principalement les lipides et lipoprotéines alors que les TLR intracellulaires reconnaissent essentiellement de l'ADN et de l'ARN viral qui doit être internalisé dans les endosomes (Akira et al., 2006). Le TLR 2 est un récepteur important qui a un large champ de reconnaissance. Cette capacité est due au fait qu'il est retrouvé sous forme d'hétérodimère avec les TLR1 et TLR6. Dans ce travail, nous sommes intéressés au TLR 2 car il reconnaît les bactéries à Gram positif comme les lactobacilles, tels qu'utilisés dans nos expériences. Les différentes sous-populations de DC n'expriment pas les mêmes TLR, ce qui explique en partie les différentes fonctions qu'ont ces sous-populations. Les pDC expriment fortement les TLR intracellulaires 7 et 9 et expriment très faiblement les TLR1-6-10, ce qui leur confère un intérêt dans la lutte contre les infections virales de par leur capacité à reconnaître l'ADN viral ainsi que l'ARN simple brin. Les cDC expriment les TLR1-2-3-4-5-6-7-8-10. Les LC expriment les TLR1-2-3-5-6-10, ce qui leur permet de lutter contre une large gamme de bactéries, de champignons et dans une moindre

Tableau 4. Répertoire de TLR des DC myéloïdes, plasmacytoïdes et des monocytes (D'après Ito et al., 2005).

	pDC/IPCs (putative lymphoid DC precursors)	Blood CD11c+mDCs (immature myeloid DCs)	Monocytes (myeloid DC precursors)
TLR1	+	+	++
TLR2	-	+	++
TLR3	-	+	-
TLR4	-	+	++
TLR5	-	+	+
TLR6	+	+	+
TLR7	++	-	-
TLR8	-	++	++
TLR9	++	-	-
TLR10	+	+	-

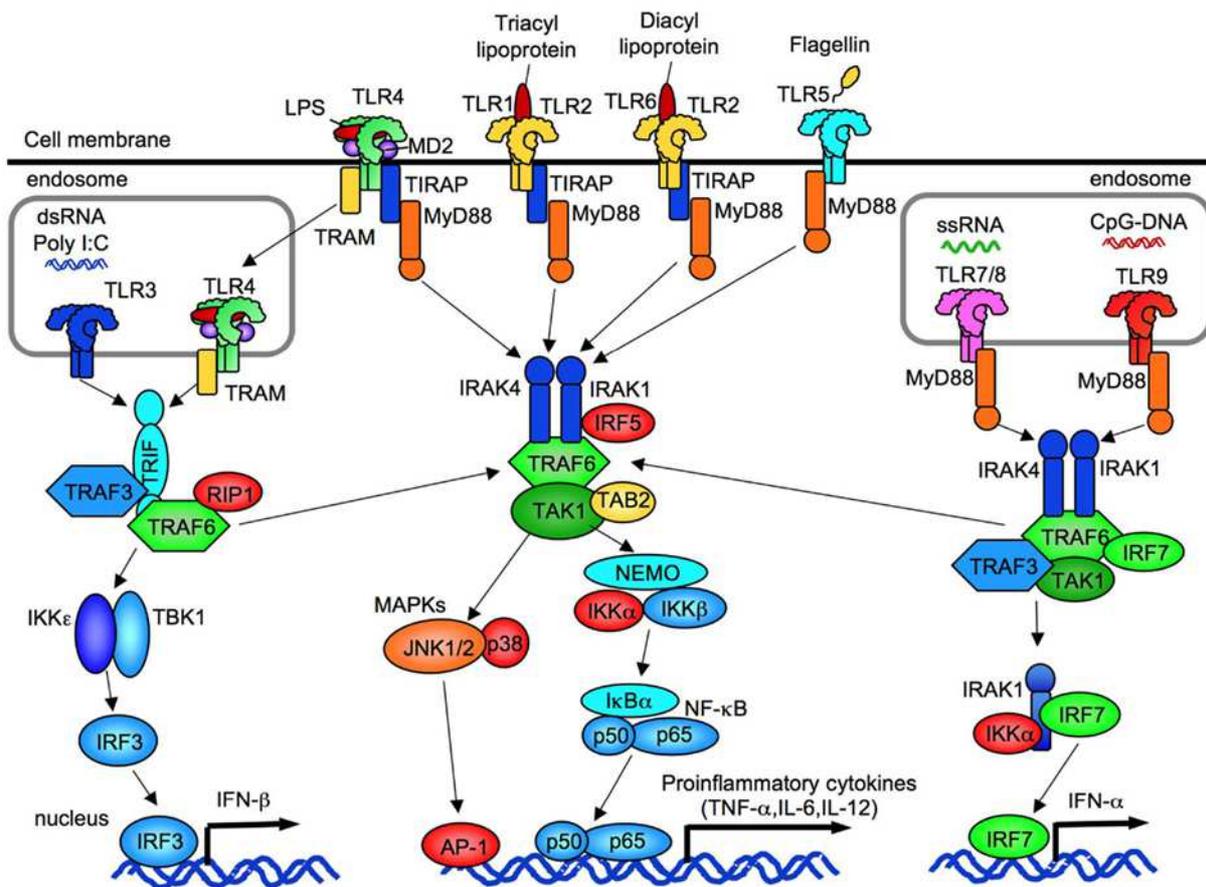


Figure 4. Voies de signalisation activées par les TLR (D'après Yang and Seki, 2012).

mesure que les pDC, des virus grâce à la reconnaissance des ARN viraux double brins. Enfin, les monocytes expriment les TLR1-2-3-4-5-6-8 (Flacher et al., 2006; Ito et al., 2005; Schreiber et al., 2010) (Tableau 4). Ces sous-populations de DC apportent une complémentarité permettant une réponse adaptée du système immunitaire à la nature du danger.

1.4.1.2. Voies de signalisation et transduction du signal

La reconnaissance des composés microbiens par les TLR induit une cascade de signalisation activant certains gènes luttant contre l'infection. Le domaine TIR des TLR est essentiel pour le recrutement de molécules adaptatrices induisant la cascade de signalisation. Ces molécules sont au nombre de quatre, (i) MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene), (ii) TRIF1 (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β), (iii) TIRAP (TIR associated protein) et (iv) TRAM (TRIF-related adaptor molecule). MyD88 et TRIF sont responsables de l'activation de deux voies distinctes, on parle alors de voies de signalisation MyD88-dépendantes ou -indépendantes. MyD88 est recrutée par tous les TLR sauf le TLR 3. Le TLR 4 peut activer les deux voies (Figure 4).

Pour les TLR 2 et 4, la molécule adaptatrice TIRAP est nécessaire pour le recrutement de MyD88, mais pas pour les TLR 5 7/8 et 9. MyD88 recrute alors IRAK-4 (IL-1 Receptor Associated Kinase 4) qui phosphoryle IRAK-1 qui devient actif. Ces deux kinases se lient à TRAF-6 (TNF Receptor Associated factor 6) qui devient polyubiquitiné et activé. TRAF-6 peut alors interagir avec TAB-2 (TAK-1 binding protein) et TAK-1 (TGF- β Activated Kinase 1). TAK-1 permet l'activation de deux voies, la voie du NF- κ B et la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Dans la première voie, TAK-1 phosphoryle IKK (I κ B Kinase) qui une fois phosphorylée, phosphoryle I κ B qui se détache alors du NF- κ B, permettant aux sous-unités p50 et p65 du NF- κ B de transloquer dans le noyau pour se fixer sur le promoteur de gènes cibles. Dans la deuxième voie, TAK-1 active la voie des MAPK aboutissant à la formation d'AP-1 (Activator Protein 1). AP-1 est transloqué dans le noyau et tout comme NF- κ B va jouer son rôle de facteur de transcription et induire la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1...).

Pour les TLR 7-8 et 9, MyD88 n'a pas besoin de TIRAP pour son recrutement. Le début de la voie de signalisation est la même que celle citée précédemment jusqu'à TRAF-6. TRAF-6 peut à la fois, activer les voies de signalisation précédentes (NF- κ B et AP-1), ou être associé avec IRF-7 (Interferon Regulatory Factor 7) et IRAK-1. IRF-7 est alors transloqué dans le noyau et

active la sécrétion d'IFN- α . Cette seconde voie se déroule essentiellement dans les pDC qui expriment fortement les TLR 7 et 9.

Enfin, il existe une voie distincte, MyD88-indépendante et qui concerne essentiellement le TLR 3 mais aussi, comme cité précédemment, le TLR4, qui associé à TRAM peut être internalisé et ne pas s'associer à MyD88. La molécule adaptatrice essentielle est TRIF. TRIF peut, par l'intermédiaire de RIP-1 (Receptor-Interacting Protein 1) ubiquitiner TRAF-6 et activer les voies NF- κ B et AP-1 ou phosphoryler IRF-3 *via* IKK ϵ . IRF-3 peut alors se transloquer dans le noyau et activer la sécrétion d'IFN- β (Akira and Takeda, 2004; Yang and Seki, 2012).

1.4.2. Les Récepteurs de type lectine-C

Contrairement aux TLR, les CLR ne sont pas seulement activateurs de la réponse immunitaire, ils ont avant tout une activité endocytique importante. La famille des CLR comprend actuellement 15 membres, tous ne sont pas exprimés sur les mêmes cellules, ne reconnaissent pas les même PAMP, n'induisent pas la même signalisation et par conséquent n'ont pas le même effet sur la réponse immunitaire (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Les CLR les plus étudiés sont le DC-SIGN (DC-Specific ICAM3-Grabbing Non-integrin), le MR (Récepteur au Mannose), les Dectin-1 et 2 (DC-associated C-type lectin 1-2) et MINCLE (Macrophage-Inducible C-type Lectin). Les CLR possèdent des domaines de reconnaissance des hydrates de carbone, permettant de lier spécifiquement des sucres complexes comme le mannose, le fucose et les glucanes ainsi que les N-acétyl-Glucosamine (Zelensky and Gready, 2005). Ces sucres complexes sont des composants de la paroi des micro-organismes. Grâce à cela, les CLR peuvent reconnaître la plupart des pathogènes bactériens, viraux, fongiques et parasitaires (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). La reconnaissance des pathogènes par les CLR induit l'internalisation du pathogène, sa dégradation, la présentation des antigènes aux Ly T et l'activation de voies de signalisation. Les CLR modulent la réponse immunitaire de façon dépendante du CLR activé, (i) ils ont la capacité de moduler la réponse induite par l'activation des TLR ou (ii) ou indépendamment des TLR.

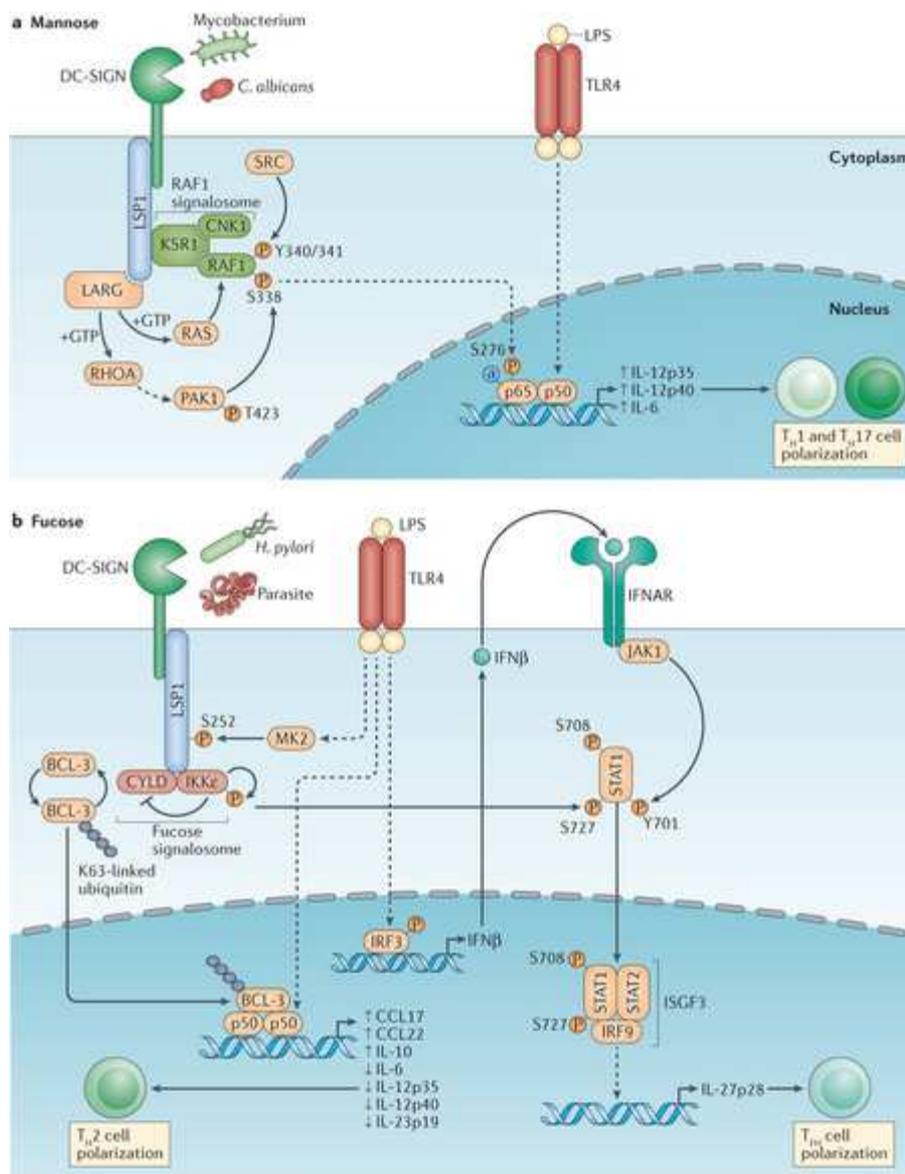


Figure 5. Modulation de la réponse TLR-induite par le DC-SIGN (D'après Geijtenbeek and Gringhuis, 2016).

(a) Modulation de la réponse induite par le TLR 4 après captation du mannose présent à la surface de mycobactérie ou de levure. (b) modulation de la réponse induite par le TLR 4 après captation du fucose présent à la surface de bactérie comme *Helicobacter pilori* ou de parasites.

1.4.2.1. Modulation par les CLR de la réponse induite par les TLR

Les CLR modulant la signalisation induite par les TLR sont le DC-SIGN, BDCA2 (CD303), DCIR (DC immunoreceptor) et MICTL (Myeloid inhibitory C-type lectin receptor). Ces CLR n'induisent pas de réponse immunitaire par eux-mêmes mais modulent les voies de signalisation induites par d'autres PRR. Prenons comme premier exemple le DC-SIGN. Selon le sucre reconnu, il peut augmenter ou inhiber l'activité de NF- κ B induite par les TLR 2-3-4, en fonction du pathogène reconnu (Geijtenbeek and Gringhuis, 2016). En effet, l'interaction DC-SIGN-mannose, simultanément à l'interaction des pathogènes avec les TLR 2 et 4, résulte en l'activation de RAF1 (de la voie des MAPK) aboutissant à la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF- κ B (Figure 5). Ceci a pour effet d'augmenter la sécrétion de cytokines de la famille de l'IL-12 et IL-6 induite par les TLR (Gringhuis et al., 2007). Lorsque le DC-SIGN entre en contact avec du fucose, il se forme un fucose signalosome qui se fixe sur IKK, empêchant le NF- κ B de jouer son rôle de facteur de transcription pour l'IL-12 (Gringhuis et al., 2014). Dans un second temps, cette signalisation induit une augmentation de la sécrétion d'IL-10 (Conde et al., 2015). Le deuxième exemple concerne le récepteur BDCA2, présent uniquement sur les pDC. Son activation permet la mobilisation de calcium après une cascade de phosphorylation impliquant SYK (Spleen Tyrosine Kinase), BTK (Bruton's Tyrosine kinase), BLNK (B Cell Linker) et la PLC γ 2 (Phospholipase C γ 2). Cette mobilisation de calcium inhibe la production d'IFN de type I, de TNF- α et d'IL-6 induite par le TLR 9. Cette inhibition se fait par l'activation de la calcineurine qui interagit avec MyD88, l'empêchant de s'associer à TLR 9 (Kang et al., 2007).

1.4.2.2. Signalisation induite par les CLR indépendamment des TLR

Les CLR Dectin-1, Dectin-2 et MINCLE ne vont pas inhiber la réponse immunitaire mais plutôt l'activer. La reconnaissance de champignons par la Dectin-1 entraîne deux cascades de signalisation passant par RAF-1 (comme pour le DC-SIGN) et par SYK. L'activation de ces voies permet au NF- κ B de se fixer sur les promoteurs de plusieurs cytokines comme l'IL-6, l'IL-12, l'IL-1 β et l'IL-10. Les Dectin-2 et MINCLE, tout comme le BDCA2 sont couplés au FcR γ qui contient une séquence ITAM (Immunoreceptor family Tyrosine-based Activation Motif). La fixation du ligand sur les Dectin-2 et MINCLE entraîne la phosphorylation des séquences ITAM du FcR γ et le recrutement de SYK (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). La cascade de signalisation reste largement inconnue mais active le NF- κ B et entraîne la sécrétion

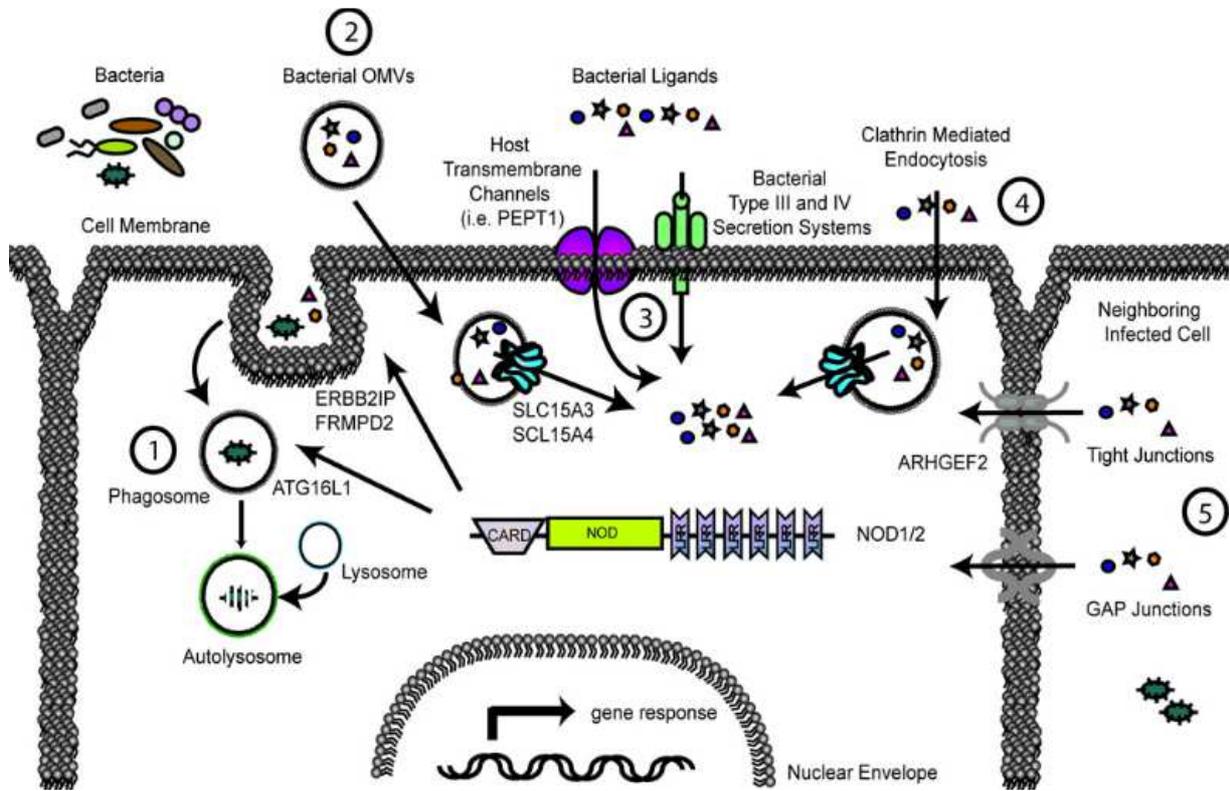


Figure 6. Mécanismes d'entrée des fragments bactériens dans les DC et activation des récepteurs NOD (D'après Caruso et al., 2014).

Internalisation des peptidoglycane par de multiples voies comme celle de la (1) phagocytose et la dégradation bactérienne qui s'en suit. (2) Absorption de peptidoglycane dérivée de la membrane extracellulaire des bactéries. (3) Transport à travers la membrane épithéliale *via* des canaux grâce à la sécrétion bactérienne de molécules formant des pores, (4) par endocytose ou (5) à partir de cellules voisines.

de TNF et d'IL-6. La différence de réponse entre le BDCA2 et ces deux CLR, résulte probablement du fait que BDCA2 soit exprimé sur les pDC alors que les Dectin-2 et Mincle sont exprimés par les cDC.

1.4.3. Les NOD-Like receptors

Les protéines NOD (Nucleotidic-binding oligomerization domain) 1 et 2 font parties de la famille des NLR (NOD-Like Receptors) et sont des PPR bien caractérisés. NOD 1 est le premier membre de la famille NLR à avoir été découvert en 1999 (Inohara et al., 1999). Il contient un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), un domaine NOD et un domaine LRR (Leucine Rich Repeats). Deux ans plus tard fut découvert NOD 2 qui contient un domaine CARD supplémentaire (Ogura et al., 2001). NOD 2 est plus représenté dans les cellules de la lignée myéloïde que NOD 1, qui lui est plutôt présent dans les lignées non myéloïdes. Ils reconnaissent des fragments de la paroi de nombreuses bactéries et induisent une réponse pro-inflammatoire par l'activation de signaux intracellulaires. NOD 1 et 2 sont présents non pas à la surface des DC mais dans le cytosol permettant la surveillance interne des infections bactériennes. Ils reconnaissent à la fois les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les mécanismes selon lesquels les fragments bactériens entrent dans la cellule sont mal connus, mais plusieurs voies ont été rapportées (Caruso et al., 2014) (Figure 6). Ils ont un rôle crucial dans l'autophagie induite par les bactéries en interagissant avec ATG16L1. NOD 1 et 2 recrutent ATG16L1 au site d'entrée de la bactérie dans la cellule et permet la formation d'autophagosome autour des bactéries invasives. Il a été montré qu'une dérégulation de cet axe NOD 2-ATG16L1 pouvait favoriser l'apparition de la maladie de Crohn (Travassos et al., 2010).

Une fois les ligand fixés, NOD s'oligomérisent et recrute RIPK-2 (Receptor-Interacting serine/threonine-Protein kinase 2) qui forme un complexe avec IKK (Inohara et al., 1999). Ce complexe permet le recrutement et l'activation de TAK-1 qui active la voie des MAPK et la translocation de NF- κ B dans le noyau. NOD 1 et 2 coopèrent avec les TLR lors d'une infection bactérienne, surtout avec le TLR 4 (Burberry et al., 2014).

1.4.4. Les RIG-I-Like Receptors

Les RLR sont au nombre de deux, RIG-I et MDA-5 (Melanoma Differentiation-associated gene-5). Ils sont localisés dans le cytoplasme des cDC et reconnaissent l'ARN viral. Cette reconnaissance induit la stimulation d'IFN de type I (Kato et al., 2006) *via* le recrutement de IPS-1 qui s'associe avec TRAF3. Cette association permet le regroupement de TBK-1 et IKK qui phosphoryle les deux facteurs IRF-3 et IRF-7, décrits précédemment, induisant la sécrétion d'IFN de type I. En parallèle, la reconnaissance des ARN viraux induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires *via* le NF- κ B (Takeuchi and Akira, 2010).

1.4.5. La capture des antigènes

Les DC immatures ont de grandes capacités d'internalisation des antigènes du milieu environnant par toutes les modalités d'endocytose : l'endocytose médiée par récepteur, la macropinocytose, la micropinocytose et la phagocytose.

L'endocytose médiée par récepteur a un rôle très important dans la capture des antigènes. Les DC immatures expriment de nombreux récepteurs endocytiques. Elles expriment tout d'abord un grand nombre de récepteurs du fragment Fc des Immunoglobulines G (IgG) (FcR). Les FcR permettent l'internalisation des complexes immuns et des antigènes opsonisés (Regnault et al., 1999). Les DC expriment aussi des récepteurs du complément CR3 et CR4 qui jouent un rôle dans la reconnaissance des antigènes opsonisés par iC3b et C3dg, mais aussi des cellules apoptotiques avec la participation de récepteurs scavengers LOX-1, CD36 et SR-A (Bajtay et al., 2006; Morelli et al., 2003). Comme mentionné précédemment, les CLR ont une activité endocytique importante. Les moDC expriment un grand nombre de CLR comme le DC-SIGN, le MR, le CD205, le BDCA2, la dectin-1, le DCIR, le DCAL-1 et C-LEC. Les LC au contraire en expriment peu, essentiellement le CD207 et le CD205.

La macropinocytose est un phénomène permanent d'endocytose non spécifique, où les DC internalisent des antigènes solubles extracellulaires d'environ 1 μ m de diamètre aboutissant à la formation de vésicules. Elle est comparée à la micropinocytose qui correspond à l'internalisation de petites vésicules de l'ordre de 80 nm. Dans le cytoplasme, les vésicules éclatent libérant les différents antigènes et les éléments de la membrane sont recyclés. Les DC sont particulièrement efficaces car elles sont capables de prélever 40% de leur volume chaque heure pour capter le plus d'antigènes extracellulaires solubles possibles (Norbury, 2006;

Sallusto et al., 1995). Pendant une période inflammatoire, due à la présence de composés microbiens, la macropinocytose est stimulée pour favoriser la capture d'antigène. Cette stimulation permet secondairement d'augmenter la présentation de peptides antigéniques par les molécules du CMH (West et al., 2004). Cette augmentation de l'internalisation par macropinocytose ne dure pas dans le temps.

Enfin, les DC partagent avec les macrophages la capacité de phagocyter de manière non spécifique, ou médiée par les récepteurs cités précédemment, FcR, CR3, CR4, pour les antigènes opsonisés, et le CD36, le DC-SIGN et le MR pour les antigènes non opsonisés (Sabatté et al., 2007).

Lorsque les DC deviennent matures, elles perdent cette capacité endocytique, notamment pour les endocytoses médiées par récepteur, car il y a une internalisation des récepteurs (Guermontprez et al., 2002).

1.5. Migration et maturation des DC suite à la reconnaissance d'un danger

Comme ceci vient d'être développé dans les paragraphes précédents, les DC immatures sont primordiales dans la reconnaissance et la captation des antigènes dans les tissus périphériques. La mise en jeu des PRR et l'intégration des signaux qui s'en suit entraîne l'activation des DC. Cette activation entraîne la maturation et la migration des DC dans le paracortex (zone T) des ganglions lymphatiques où il y aura présentation des antigènes captés aux Ly T naïfs. Les DC passent alors de sentinelles immatures reconnaissant les antigènes à des DC matures activant les Ly T naïfs.

1.5.1. Modifications structurelles accompagnant la maturation des DC

La maturation correspond à un ensemble de modifications structurelles et morphologiques avec réarrangement du cytosquelette des DC (Trombetta and Mellman, 2005). Il y a alors une diminution du nombre de dendrites qui deviennent plus grosses. Comme nous l'avons vu, les DC immatures expriment à leur surface un très grand nombre de PPR. La maturation entraîne une perte de la capacité de reconnaissance antigénique et d'endocytose des DC, sauf pour les pDC qui ne perdent pas totalement cette capacité (Young et al., 2008). A l'inverse, les molécules du CMH de classe II vont passer des lysosomes vers la membrane

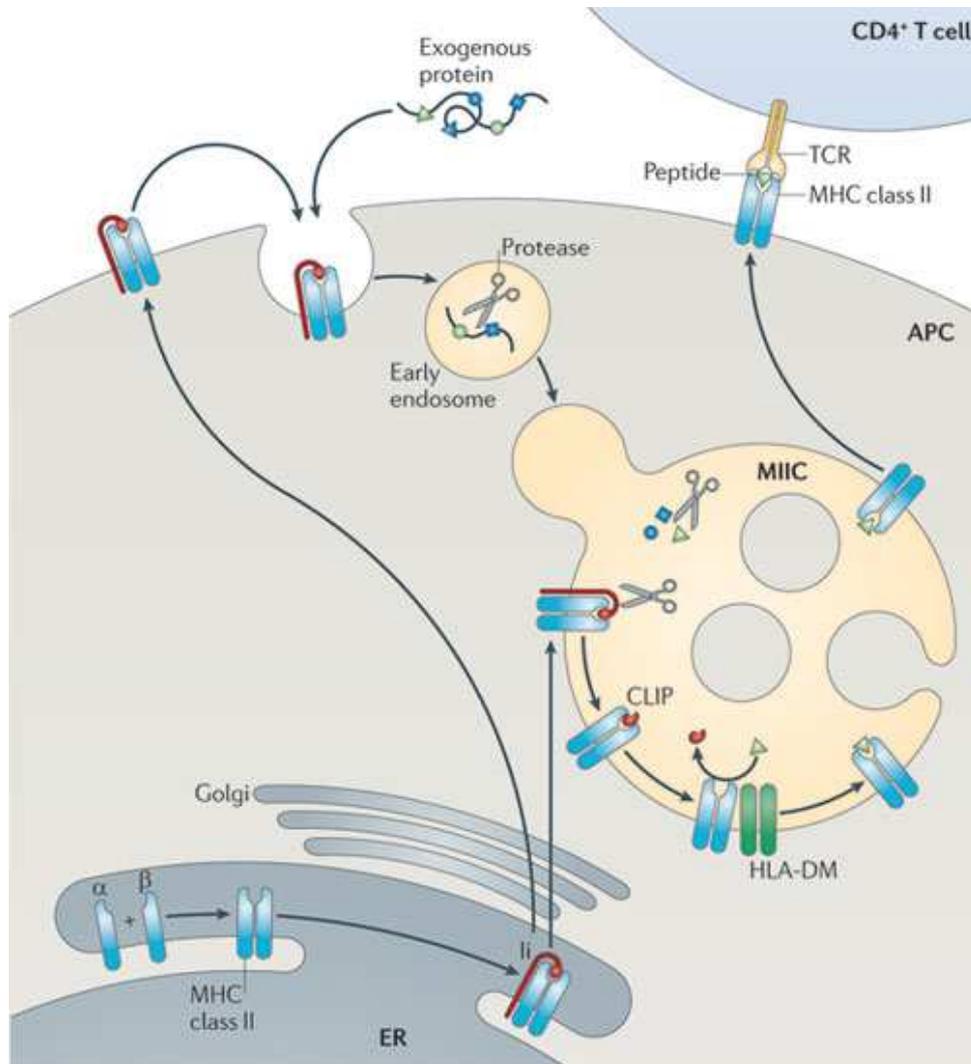


Figure 7. Formation du CMH de classe II et capture des antigènes (D'après Neefjes et al., 2011).

plasmique (Cf 1.5.2.). Dans le même temps, il y a une surexpression membranaire des molécules de costimulation (CD80 et CD86), des molécules d'adhésion aux Ly T (CD48 et LFA-3) et une modification des récepteurs de chimiokines présents sur la membrane, notamment une augmentation de l'expression de CCR7, permettant la migration vers les ganglions lymphatiques (Trombetta et al., 2003).

Dans les deux parties suivantes, nous allons nous intéresser en détail à deux étapes clés, préalables à la présentation antigénique, l'apprêtement antigénique et la modification des CCR.

1.5.2. L'apprêtement antigénique

Après internalisation, les DC dégradent les antigènes en peptides et associent ces peptides à des molécules du CMH pour présenter ce complexe CMH-peptides à la membrane cellulaire : c'est l'apprêtement antigénique. Les molécules dites endogènes, c'est-à-dire, le produit de dégradation de protéines intracellulaires générées dans le cytosol (ex : protéines virales) sont associées au CMH de classe I. A l'inverse, le CMH de classe II s'associe avec des molécules dites exogènes, c'est-à-dire, des fragments de protéines extracellulaires (ex : bactéries) générés dans un compartiment intracellulaire (endosome). La présentation croisée consiste en le fait que le CMH de classe I peut aussi présenter des molécules d'origine exogènes. Le CMH de classe I est ubiquitaire alors que le CMH de classe II est exprimé par les CPA professionnelles (DC, macrophages et Ly B). Ici, nous nous intéresserons essentiellement au CMH de classe II et à l'apprêtement des antigènes exogènes, car comme nous le verrons ultérieurement, ceci est en lien direct avec notre travail (Figure 7). Le CMH de classe II se forme dans le Réticulum Endoplasmique (RE), par l'assemblage de deux chaînes, α et β . Une fois hétérodimérisé, le CMH de classe II commence à quitter le RE *via* l'appareil de Golgi. La fixation de la chaîne invariante li accélère ce processus. Les adaptateurs AP1 (Adaptateur du réseau Trans Golgi) et AP2 (Adaptateur de la membrane plasmique) reconnaissent les motifs de li (Hofmann et al., 1999). Li dirige donc le CMH de classe II dans des endosomes tardifs appelés compartiment du CMH de classe II (MIIC) de deux façons. Directement à partir du Golgi (AP1 dépendant), ou par endocytose de la membrane plasmique (AP2 dépendant) puis passage dans des endosomes précoces (Dugast et al., 2005; McCormick et al., 2005). La région CLIP (Class II-associated Li peptide) provenant de la dégradation de li empêche la fixation de peptides sur le CMH de classe II. Les peptides proviennent d'antigène comme des bactéries qui sont internalisées comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, pour se retrouver dans

des endosomes précoces. Ces endosomes fusionnent avec un lysosome pour former un endosome tardif dans lequel il y a une acidification du pH ainsi que l'action de protéases comme les cathepsines pour cliver les antigènes en petits peptides (Honey and Rudensky, 2003; Hsing and Rudensky, 2005). Les peptides ont alors une taille maximum de 20 acides aminés. HLA-DM est requis, comme molécule chaperonne pour enlever le fragment CLIP du sillon peptidique du MHC. Le peptide peut alors se fixer dans ce sillon peptidique, c'est l'apprêtement antigénique. Le MHC est alors transporté vers la membrane plasmique grâce à un réseau d'actine de myosine et de tubuline, où il pourra être exprimé à la membrane et présenter le peptide antigénique au TCR (Récepteur des Cellules T) (Neefjes et al., 2011).

1.5.3. Migration des cellules dendritiques

La migration des DC en cours de maturation vers les ganglions lymphatiques, comme pour le recrutement dans une muqueuse ou sur un site inflammatoire est conditionnée par la sécrétion de chimiokines. A l'état immature, les DC expriment un grand nombre de récepteurs de chimiokines qui sont totalement bouleversés par la reconnaissance et la capture d'un antigène. Les récepteurs comme CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 et CCR8 vont voir leur expression diminuer et à l'inverse, CCR7 devient prépondérant et permet l'adressage des DC matures vers la zones T des ganglions lymphatiques, de même pour CXCR4 (Kabashima et al., 2007; Sallusto, 1998). De nombreuses études ont montré que l'absence d'expression de CCR7 à la surface des DC matures empêchait cette migration (Ohl et al., 2004). Les ligands de CCR7 sont CCL19 et CCL21 et le ligand de CXCR4 est CXCL12. CCR7 joue un rôle majeur dans le « homing » des DC matures vers les ganglions lymphatiques pour la globalité des sous-populations de DC alors que CXCR4 joue un rôle pour les DC dermiques et les LC. En suivant le gradient de ces chimiokines sécrétées dans les zones T des ganglions lymphatiques, les DC alors matures se retrouvent dans la même zone que les Ly T naïfs qui possèdent les mêmes récepteurs de chimiokines. Les Ly T naïfs sont des Ly T matures n'ayant jamais rencontré d'antigène, ceci sera développé dans la deuxième partie de ce chapitre. La rencontre entre ces deux cellules est donc favorisée au niveau de la zone T où les deux cellules vont pouvoir interagir. Trois signaux vont alors être générés. Le signal 1 correspond à la reconnaissance spécifique du peptide présenté par le CMH de classe II par le TCR du Ly T. Ce signal permet l'activation du Ly T naïf. Le signal 2 correspond à l'interaction entre les molécules de costimulation des DC matures et leur ligand présents sur les Ly T. Ce signal permet de moduler

le signal 1, soit pour l'amplifier, soit pour l'inhiber. Enfin, le signal 3 correspond à la sécrétion par les DC, de cytokines spécifiques, adaptées à l'antigène capté permettant d'induire différentes sous-populations de Ly T CD4. Il y a trois populations effectrices ou « helper » (Ly Th), Th1, Th2 et Th17 et une population régulatrice, les Treg (T régulateur).

Les trois signaux mentionnés dans ce paragraphe seront détaillés dans la partie suivante qui se focalise sur la réponse lymphocytaire et particulièrement, la réponse des Ly T CD4. Nous nous focalisons sur les Ly T CD4, car ils correspondent aux sous-populations que nous avons étudiées dans nos travaux. Nous présenterons dans la partie suivante, leur développement dans le thymus, puis l'importance du TCR et des corécepteurs dans l'initiation et la propagation de la réponse lymphocytaire T. L'étude des différentes sous-populations induites spécifiquement par les DC, finaliseront cette partie.

2. Les lymphocytes T

Les Ly T sont les cellules centrales de la réponse immunitaire adaptative. Après leur différenciation à partir de cellules souches hématopoïétiques et la sélection thymique, les Ly T naïfs formés dans le thymus se retrouvent dans la circulation sanguine pour rejoindre la zone T des organes lymphoïdes secondaires (paracortex). C'est dans cette zone T que les Ly T naïfs peuvent entrer en interaction avec des DC matures qui leur présentent un peptide antigénique *via* le CMH. Cette interaction induit une réponse spécifique de l'antigène rencontré en polarisant les Ly T naïfs en sous-population de Ly T « helpers » CD4⁺ ou « cytotoxiques » CD8⁺. La réponse apportée sera alors adaptée à la nature du danger générant un continuum de réponses immunitaires allant des plus inflammatoires aux plus tolérogènes.

2.1. Le développement des Ly T

Au sein de la moelle osseuse, les cellules multipotentes, que sont les CSH, sont les cellules à l'origine de la production des lymphocytes. Les CSH donnent dans ce cas un progéniteur lymphoïde commun (PLC). Le PLC quitte alors la moelle osseuse vers la circulation pour rejoindre le thymus, siège de sa différenciation en Ly T naïfs. Il y a une première étape de prolifération des PLC dans les couches les plus externes de la corticale. Un stock de thymocytes immatures doubles négatifs (DN) CD4⁻CD8⁻ est constitué dans le thymus

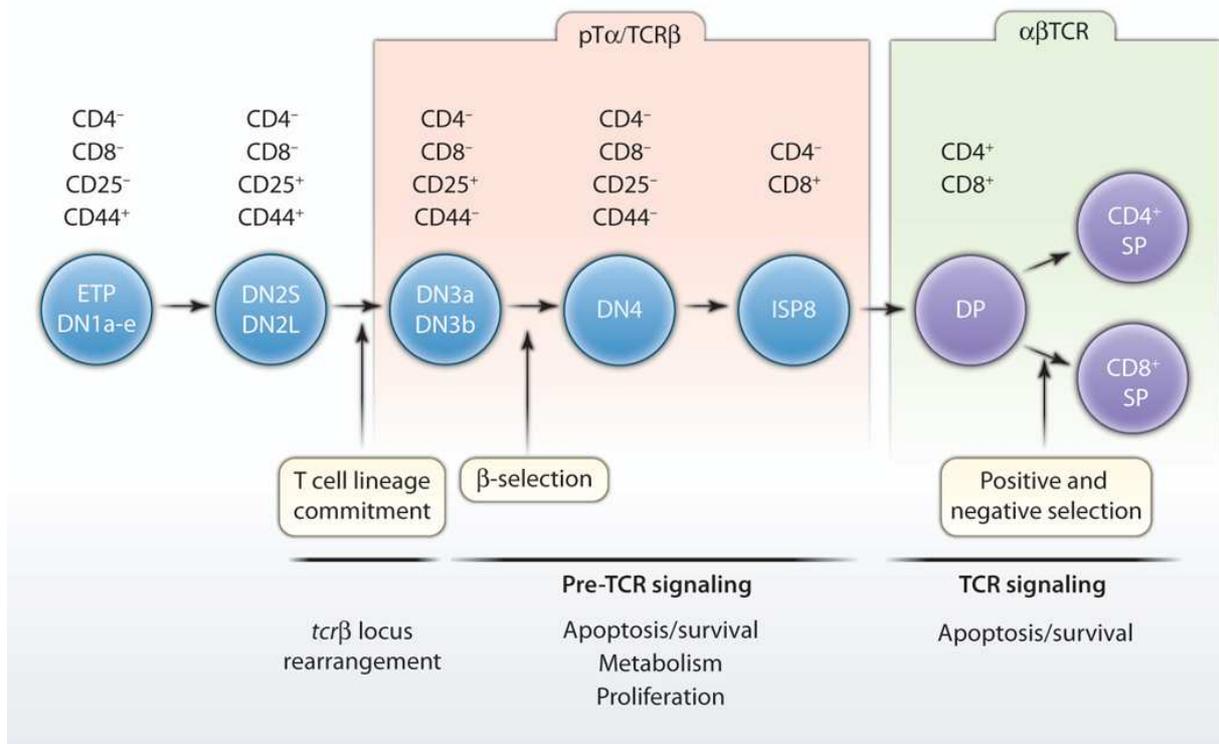


Figure 8. Développement des lymphocytes T, des thymocytes double négatif aux T CD4 et CD8 (D'après Fayard et al., 2010).

DN : Double négatif ; DP : Double positif ; SP : Simple positif.

(Lind et al., 2001). Les thymocytes sont des Ly T en cours de développement dans le thymus. Avant de passer au stade double positif, les thymocytes CD4⁻CD8⁻ vont subir quatre étapes de différenciation que l'on peut déterminer en étudiant l'expression de CD25 et de CD44 (Fayard et al., 2010; Godfrey et al., 1993) (Figure 8). Les DN1 sont CD25⁻CD44⁺, leur migration dans la zone sous-scapulaire du thymus leur fait acquérir le CD25, les DN2 sont donc CD25⁺CD44⁺. Entre DN2 et DN3, il y a un réarrangement génique des gènes β (pour un Ly T $\alpha\beta$) du TCR. En DN3, les thymocytes sont CD25⁺CD44⁻, la chaîne β réarrangée s'apparie avec la pré-chaîne α pour former le pré-TCR, primordial pour la survie de la cellule (Saint-Ruf et al., 1994). C'est à ce moment qu'il y a formation du complexe CD3 à la surface des cellules. Au stade DN4, les cellules sont CD25⁻CD44⁻, la chaîne α du pré-TCR n'est pas encore réarrangée et les thymocytes n'ayant pas réarrangé le locus β sont supprimés. La deuxième étape de maturation des thymocytes commence donc à ce stade, il y a un début de prolifération intense, un début de répression du pré-TCR et les thymocytes vont co-exprimer les deux récepteurs CD4 et CD8 et sont dites, double positives (DP). Lors de cette étape de maturation, le réarrangement génique de la chaîne α du TCR forme un TCR $\alpha\beta$ mature et fonctionnel. L'expression du TCR mature à la surface des thymocytes marque le début de deux sélections, une positive et une négative basées sur les caractéristiques du TCR. Le processus de sélection des Ly T naïfs dans le thymus est long et bien que les thymocytes soient initialement très nombreux dans l'organisme, une très faible quantité arrive au stade terminal de différenciation. La sélection positive est une sélection vis-à-vis des molécules du CMH du soi. Elle se déroule au niveau du cortex profond, où les cellules épithéliales du thymus présentent l'ensemble des molécules du CMH du soi au TCR du thymocyte. Si le thymocyte n'interagit pas avec une des molécules du CMH du soi, il sera détruit car considéré comme délétère pour le soi. A l'inverse, si le thymocyte reconnaît les molécules du CMH du soi avec une affinité intermédiaire, il sera considéré comme viable. Cette sélection positive assure la restriction aux molécules du CMH du soi. C'est pourquoi, cette étape représente une destruction de thymocytes d'environ 98%. Les thymocytes ayant reconnu une molécule du CMH du soi migrent alors dans la médulla du thymus, et subissent la sélection négative. Dans la médulla, les DC présentent aux thymocytes *via* le TCR des peptides du soi. Les cellules épithéliales médullaires possèdent une panoplie complète des facteurs de transcription AIRE (Anderson et al., 2002). Ces cellules épithéliales expriment de façon ectopique les différents antigènes du soi. Si la liaison entre le complexe CMH-peptide du soi est de forte affinité les thymocytes sont détruits car considérés comme auto-réactifs et dangereux. Si le thymocyte reconnaît le complexe CMH-peptide du soi avec une affinité intermédiaire, il est considéré comme acceptable (Page et al., 1996; Sprent and Kishimoto,

2002). Le rôle de la sélection négative est donc d'assurer la tolérance du soi. Après la sélection positive les thymocytes double positifs se délestent du CD4 ou du CD8 en fonction de la molécule du CMH que le TCR a reconnu. S'il se lie à une molécule du CMH de classe I, il va perdre l'expression du CD4 et augmenter l'expression du CD8. A l'inverse, s'il interagit avec une molécule du CMH de classe II, il va perdre l'expression de CD8 et augmenter l'expression de CD4 à sa surface (Anderson and Jenkinson, 2001; Klein et al., 2014; Sawicka et al., 2014; Teh et al., 1988; Zúñiga-Pflücker, 2004). Cependant, le moment du passage de DC en simple positif est débattu. En effet, d'après certains auteurs, cette étape se ferait après la sélection négative car des thymocytes se liant au CMH de classe II peuvent devenir des CD4 mais aussi des CD8 (Bosselut et al., 2001). Inversement, des thymocytes se liant au CMH de classe I ne pourront pas devenir des CD4 mais uniquement des CD8. Ces thymocytes alors matures, simples positifs et tolérant au soi, quittent le thymus. A leur sortie du thymus, les Ly T matures, mais n'ayant jamais rencontrés d'antigènes, prennent le nom de Ly T naïfs. Ils expriment le récepteur de chimiokines CCR7, qui en suivant le gradient de concentration des chimiokines CCL19 et CCL21 rejoignent la zone T des ganglions lymphatiques. Leur présence dans cette zone permet l'interaction avec les DC matures ayant migrées dans la zone T des ganglions lymphatiques grâce aux mêmes chimiokines (Cf 1.5.3.) dans le but de présenter les antigènes captés (du soi ou exogènes) et d'y apporter une réponse adaptée. Cette réponse adaptée suite à l'interaction DC-Ly T naïfs sera le fruit de trois signaux que nous décrirons dans ce chapitre. Le signal 1, ou signal TCR correspond à la présentation des peptides antigéniques portés par le CMH des DC aux Ly T par leur TCR (dans cette étude nous nous sommes intéressés aux Ly T CD4, donc nous nous intéresserons à l'interaction TCR-CMH de classe II). Il correspond à l'initiation de l'activation et porte la spécificité de l'interaction mais ne suffit pas pour activer les Ly T naïfs. Pour cela, le signal 2 ou signal de costimulation, est nécessaire. Il correspond à l'interaction des molécules de costimulation présentes sur les DC avec leurs ligands présents sur les Ly T. Il augmente l'activation des Ly T naïfs d'un facteur 100, et induit l'expansion clonale. Enfin le signal 3 ou signal cytokinique induit la polarisation lymphocytaire.

2.2. Le signal 1 : Activation des Lymphocytes T

2.2.1. La structure du TCR

Le TCR a un rôle essentiel dans la reconnaissance de l'antigène et l'activation de la réponse lymphocytaire T. Les deux chaînes α et β sont chacune composées de deux domaines extracellulaires avec une partie constante et une partie variable, mais ne possèdent pas de

domaine intracellulaire. Les domaines variables sont les parties qui seront en contact avec les molécules du CMH et le peptide présenté par ces dernières. A la très grande variété antigénique doit correspondre une variabilité du TCR. Ces régions hypervariables forment des boucles uniques à chaque TCR appelées CDR (Complementary-Determining Regions) (Al-Lazikani et al., 2000). Les CDR sont au nombre de trois par chaîne : CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α et CDR1 β , CDR2 β , CDR3 β . La région CDR3 se situe au centre de la liaison et reconnaît directement le peptide présenté par le CMH permettant la diversité et la spécificité de la reconnaissance antigénique (Jores et al., 1990). Cette diversité est due à un réarrangement génique somatique qui a lieu dans le thymus lors de la formation des chaînes α et β des thymocytes induisant un répertoire potentiel de TCR de l'ordre de 10^9 par individu. Ce large répertoire de reconnaissance d'antigènes permet aux Ly T une spécificité de réponse à un antigène.

L'absence de domaine intracellulaire dans les molécules du TCR ne permet pas de relayer les informations reçues à l'intérieur du lymphocyte. Le TCR qui a eu la charge de reconnaître l'antigène s'associe avec les molécules du CD3 pour relayer les informations reçues. Le complexe TCR/CD3 permet donc d'induire la signalisation intracellulaire. Les molécules CD3 sont formées de six chaînes formant trois dimères s'associant au domaine transmembranaire du TCR, (i) l'hétérodimère CD3 $\delta\epsilon$, qui interagit de façon faible avec TCR α , (ii) l'hétérodimère CD3 $\gamma\epsilon$, qui s'associe avec TCR β et (iii) un homodimère intra-cytoplasmique CD3 $\xi\xi$ qui s'associe avec TCR α (Call et al., 2002). Le domaine intra-cytoplasmique CD3 $\xi\xi$ possède trois domaines de signalisation ITAM par chaîne. Les deux autres domaines n'en ont qu'un (Kuhns et al., 2006). Ces domaines ITAM sont centraux pour l'induction de la signalisation intracellulaire.

Enfin, les molécules CD4 et CD8, souvent utilisées en cytométrie en flux pour identifier les populations de lymphocytes T, ont un rôle important dans l'activation du Ly T. Elles sont recrutées par le complexe TCR-CMH et jouent le rôle de corécepteurs en stabilisant la liaison TCR-CMH mais ont aussi un rôle d'amplification de la signalisation intracellulaire (Gao et al., 2002).

2.2.2. Le modèle de « kinetic segregation » et la synapse immunologique

Ce modèle a été proposé dès 1996 par Davis and Van der Merwe et repris en 2006 (Davis and van der Merwe, 1996, 2006). Ce modèle dynamique avec, réarrangement des protéines membranaires des Ly T en fonction de leur taille se déroule au sein de la synapse immunologique (Huppa and Davis, 2003). Cette synapse immunologique est spécialisée dans

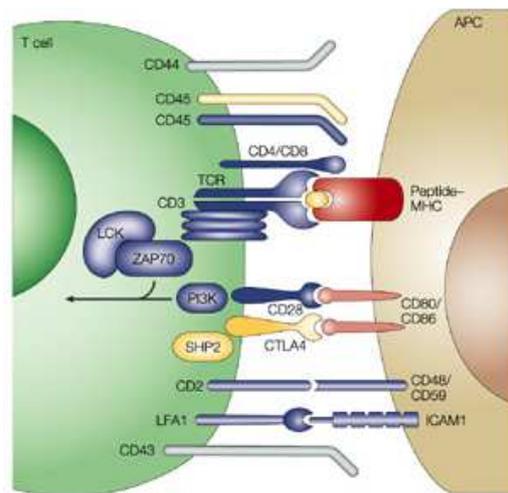


Figure 9. Interaction DC-lymphocyte T au sein de la synapse immunologique (D'après Huppa and Davis, 2003).

l'adhésion cellule-cellule permettant l'acquisition de l'antigène, l'activation des lymphocytes et de leurs fonctions effectrices. Autour des interactions TCR/CD3/CD4-CMH/peptide, se forme une couronne de molécules d'adhésion, essentiellement des intégrines, favorisant l'échange des signaux (Figure 9). Les molécules d'adhérences ICAM-1 et LFA-3 (CD48) présentes à la surface des DC se fixent sur leur ligand LFA-1 et CD2 présents sur les Ly T. A l'extérieure de la couronne, sont présentes les phosphatases CD45 et CD43. La formation d'une synapse mature joue un rôle dans la réorganisation des protéines de surface et le rassemblement des TCR (Graf et al., 2007). A l'état de repos, les protéines membranaires sont exprimées de manière diffuse sur la membrane. Lors d'une interaction TCR-CMH, il y a une réorganisation des protéines de surface. Les molécules de petite taille comme les TCR, CD3, CD2 et CD28 sont recrutées et créent une zone de contact très proche et privilégiée excluant les phosphatases, comme CD45. Cette phosphatase étant la plus abondante, elle participerait fortement lorsqu'elle est activée à l'inhibition de la réponse par son activité tyrosine phosphatase à la fois sur CD3 $\xi\xi$ et Lck (Cho et al., 2016). Cependant, des Ly T qui n'expriment pas le CD45 ne peuvent pas être activés (Chang et al., 2016). Il y aurait donc un double rôle du CD45 à la fois inhibiteur ou activateur de la réponse T. Cette exclusion des phosphatases permet donc l'activation du complexe TCR/CD3, l'apparition des tyrosines kinase Lck et ZAP-70 initiant la cascade de signalisation intracellulaire. Il faut en moyenne l'activation de dix TCR par des couples peptide-CMH pour activer un Ly T.

La membrane plasmique des Ly T, tout comme celle de très nombreuses cellules est composée de radeaux lipidiques. Au sein de cette membrane, il a été montré que les radeaux lipidiques sont requis pour l'activation des Ly T (Varshney et al., 2016). Les auteurs ne sont pas d'accord pour savoir si les TCR sont localisés au niveau des radeaux lipidiques à l'état basal (Beck-García et al., 2015; Dinic et al., 2015). Cependant, lors de l'engagement du TCR, ce dernier se trouve au niveau des radeaux lipidiques et la synapse immunologique se forme au niveau de ces domaines. Les protéines présentes dans ces radeaux, sont essentielles pour l'activation des tyrosines kinase comme Lck et ZAP-70. Une étude portant sur une Lck mutante, exclue des radeaux lipidiques, est incapable d'activer la signalisation du TCR (Kabouridis et al., 1997). De plus, des modifications dans la composition de ces radeaux (diminution de la glycosphingolipide) réduit la polarisation des Ly Th17 (Zhu et al., 2011).

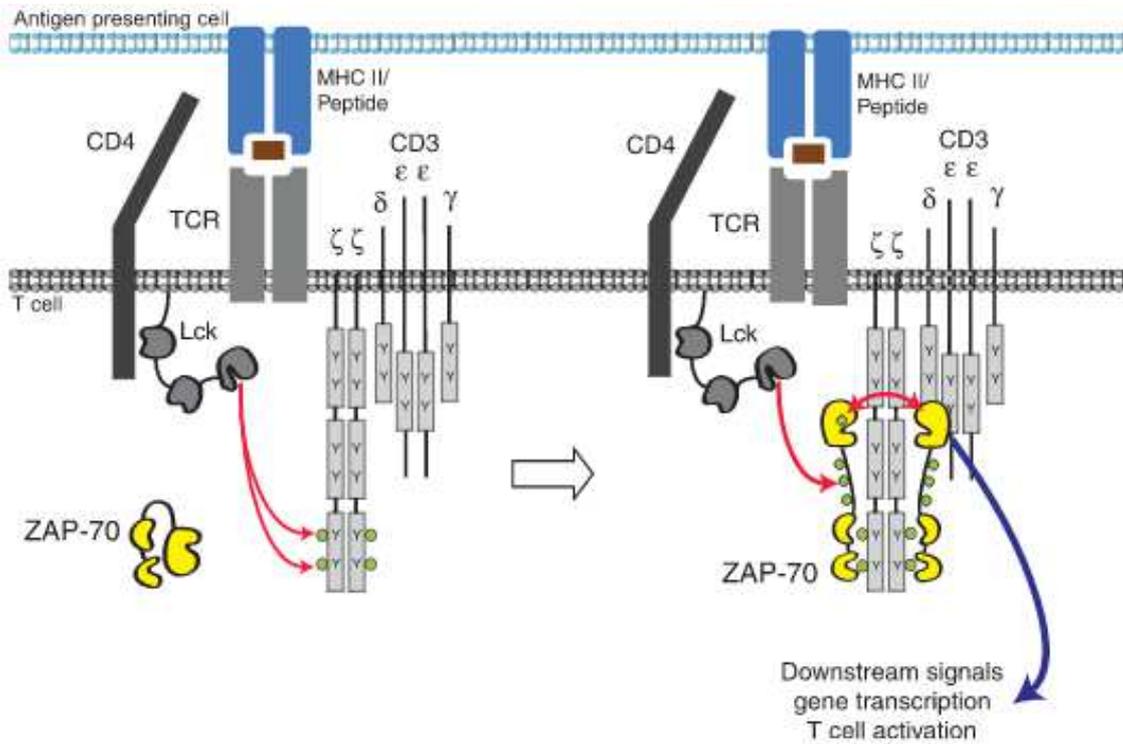


Figure 10. Interaction entre le CMH de classe II portant un peptide antigénique avec le complexe TCR/CD3/CD4 et initiation de la signalisation intracellulaire (D'après Au-Yeng et al., 2009).

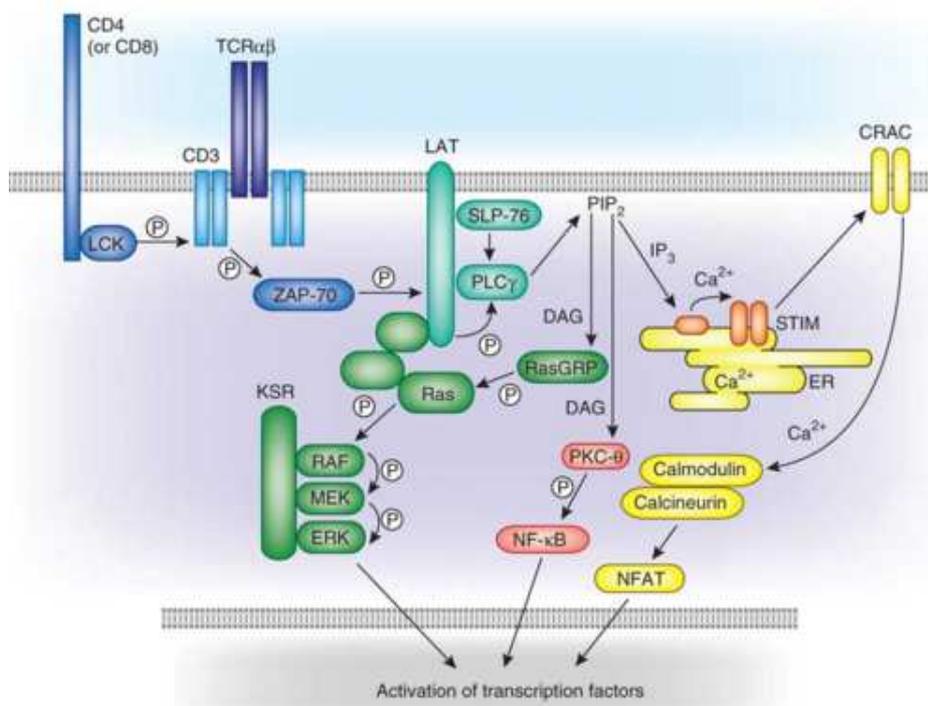


Figure 11. Signal TCR et initiation de la voie calcique, de la voie du NF- κ B et des MAPK à partir de la phosphorylation des protéines ZAP-70 et LAT (D'après Morris and Allen, 2012).

2.2.3. Signalisation et voies de transduction du signal

L'interaction entre le complexe CD3/TCR/CD4 avec le CMH-II, portant un peptide, permet l'induction d'une signalisation qui s'effectue en trois étapes : (i) l'activation de la tyrosine kinase Lck qui phosphoryle les motifs ITAM présents sur les domaines intracytoplasmiques des chaînes ξ du CD3, (ii) le recrutement de la tyrosine kinase ZAP-70 qui phosphoryle la protéine adaptatrice LAT (Linker for Activation of T cells) et (iii) l'activation des voies de transduction du signal.

2.2.3.1. Initiation de la signalisation

Lors de la liaison entre le CD4 et le CMH-II, la protéine intracellulaire adaptatrice p56 Lck associée de façon non covalente au corécepteur CD4 se rapproche des domaines intracellulaires $\xi\xi$ du CD3 permettant la phosphorylation des motifs ITAM (Oers et al., 1996; Veillette et al., 1988). La protéine ZAP-70 (Zeta chain Associated Protein kinase 70) est alors recrutée sur les motifs ITAM phosphorylés (Au-Yeung et al., 2009). Elle est ensuite elle-même phosphorylée par Lck induisant son activation, ce qui lui permet de phosphoryler à son tour LAT (Linker for Activation of T cells) conduisant à l'activation du signal intracellulaire et à l'activation du Ly T (Zhang et al., 1998) (Figure 10).

La phosphorylation de LAT par ZAP-70 permet le recrutement de nombreuses protéines au niveau de la membrane comme Grb2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2), Gads (Grb2-related Adaptor Downstream of Shc), Slp-76, qui se fixe sur Gads, et de la PLC- γ (Phospholipase C gamma) (Gilliland et al., 1992; Liu et al., 1999). Le site d'ancrage membranaire permet à la PLC- γ d'hydrolyser le PIP₂ membranaire (Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate). Cette hydrolyse aboutit à la production de deux seconds messagers IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphate) et DAG (Berridge, 1987). Ces deux seconds messagers sont responsables de la transduction du signal de trois voies de signalisation : (i) la voie calcique (IP₃), (ii) la voie PKC- θ (Protein Kinase C Théta) (DAG) et (iii) la voie des MAPK (DAG) (Morris and Allen, 2012) (Figure 11). La voie des MAPK peut aussi être activée de façon indépendante à DAG après phosphorylation de LAT. La voie Vav-1/Jun est dépendante de SLP-76.

2.2.3.2. La voie calcique

L'IP₃ généré par l'hydrolyse du PIP₂ est libéré dans le cytoplasme et se fixe sur son récepteur IP3R, présent sur la membrane du RE. Ceci permet le relargage des stocks de calcium réticulaire dans le cytoplasme. Cette déplétion de calcium réticulaire induit l'ouverture des canaux calciques CRAC (Calcium Release Activated calcium Chanel) à la surface des Ly T permettant l'entrée de calcium extracellulaire dans le cytoplasme (Wu et al., 2006a). Deux Ca²⁺ se fixent alors sur la calmoduline, permettant ensuite l'activation de la calcineurine, qui est une phosphatase dépendante du Ca²⁺ (mais est incapable de la fixer elle-même). Elle déphosphoryle alors le facteur de transcription cytoplasmique NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). S'en suit la translocation de NFAT dans le noyau, où il coopère avec d'autres facteurs de transcription pour induire l'expression essentiellement d'IL-2 et de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) ainsi que de nombreux gènes codant pour différentes cytokines, ou pour des récepteurs membranaires (Lee et al., 2004; Wu et al., 2006b) (Figure 11).

2.2.3.3. Voie de la PKC

La Lck joue un rôle dans cette voie, car le recrutement à la membrane de la PKC- θ est médié par sa phosphorylation par Lck. La fixation de PKC- θ au DAG permet son activation (Melowic et al., 2007). Son rôle va être d'activer le facteur de transcription NF- κ B. La PKC- θ permet la formation du complexe CMB (CARMA1/Bcl10/MALT1) qui va activer IKK en dégradant la sous-unité inhibitrice IKK γ . IKK peut alors phosphoryler I κ B. Sous sa forme non phosphorylée I κ B est complexée à NF- κ B, ce qui permet son maintien au niveau cytoplasmique. Une fois phosphorylée, I κ B est ubiquitinée et détruite par le protéasome. Alors libre, il y a translocation de NF- κ B dans le noyau qui peut se fixer sur les promoteurs des gènes comme ceux de l'IL-2 et de CD25 (Isakov and Altman, 2002) (Figure 11).

2.2.3.4. Voie des MAPK

Cette voie implique en premier lieu la protéine Ras qui peut être activée de deux manières : (i) Le DAG active RasGRP (Ras Guanyl-releasing protein 1) qui est une protéine activatrice de Ras ou, (ii) le LAT, où Grb2 recrute Sos (Son Of Sevenless) qui active Ras. Une

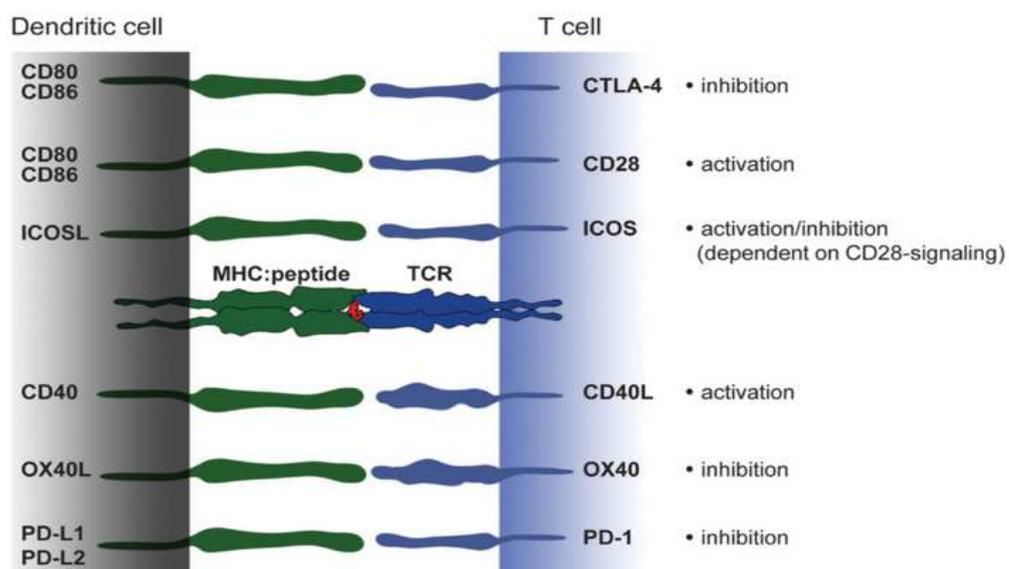


Figure 12. Interactions entre les molécules de costimulation portées par les DC et leurs ligands à la surface des lymphocytes T (D'après Hubo et al., 2013).

fois activée, Ras déclenche la cascade des MAPK, aboutissant à l'activation des protéines Erk1/2 (Roose et al., 2007). Ras active la kinase Raf-1, qui phosphoryle Mek, qui à son tour phosphoryle Erk1/2. Une fois phosphorylées, Erk 1/2 pénètrent dans le noyau et phosphorylent différents facteurs de transcription comme Elk-1 qui activera c-fos (Genot and Cantrell, 2000; Rincón, 2001). En parallèle, SLP-76 recrute et phosphoryle Vav-1 qui permet l'activation d'une cascade de phosphorylation aboutissant à la phosphorylation de JNK (c-jun N-terminal Kinase). JNK peut pénétrer dans le noyau, phosphoryler c-jun, qui en s'hétérodimérisant avec c-fos forment le facteur de transcription AP-1. En se fixant sur certains promoteurs de gènes, AP-1 augmente l'expression d'IL-2 et de CD25 (Figure 11).

2.3. Le signal 2 induit par les molécules de costimulation

Le deuxième signal qui intervient lors du contact entre un TCR et son antigène spécifique correspond à l'interaction entre des molécules de costimulation présentes sur les DC matures avec leurs ligands respectifs présents sur les Ly T au sein de la synapse immunologique. Le signal 1 a permis la transcription d'IL-2 et de CD25, ainsi que l'expression de CD40-L sur les Ly T. Le CD40 étant exprimé sur les CPA permet une augmentation de l'expression et de la synthèse des molécules de costimulation. L'expression des molécules de costimulation permet d'activer massivement les Ly T naïfs en multipliant par 100 les niveaux de synthèse de l'IL-2 et en les faisant passer de la phase GO à la phase G1. En absence du signal 2, les Ly T naïfs deviennent anergique. Cette interaction a pour but, en fonction des molécules activées, de promouvoir la réponse des Ly T (CD80-CD86/CD28, ICOS-L/ICOS) ou au contraire de limiter la réponse pro-inflammatoire pour éviter les effets délétères (CD80-CD86/CTLA-4, PD-L1-2/PD-1). Ces molécules sont réparties en deux familles présentes sur les Ly T : celle des B7-CD28 et celle des TNF-TNFR. Dans ces deux familles, les molécules peuvent être activatrices ou inhibitrices de la réponse T (Figure 12).

2.3.1. Les molécules de la famille B7-CD28

B7-1 et B7-2, correspondant respectivement à CD80 et CD86 présents sur les DC, interagissent avec deux molécules présentes sur les LyT, CD28 et CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocytes-Associated protein 4). Ces deux liaisons vont respectivement, avoir des effets immunogènes et favoriser la prolifération lymphocytaire ou tolérogène et réprimer cette

prolifération. L'augmentation de l'expression de CD80 et de CD86 est induite par le processus de maturation des DC. CD28 est exprimé sur environ 80% des Ly T (June et al., 1990). La voie d'activation CD80-CD86/CD28 est très importante pour l'activation des Ly T. Cette interaction induit une forte sécrétion d'IL-2 ainsi qu'une augmentation de CD25, qui correspond à IL-2R α (boucle autocrine de stimulation) (Lenschow et al., 1996; Linsley et al., 1991). CTLA-4 est un homologue structurel de CD28 mais a une affinité plus forte pour les CD80 et CD86 et a des effets différents. En effet, en condition physiologique CTLA-4 a pour rôle d'éviter l'activation des Ly T contre des antigènes du soi et participe au maintien de la tolérance (Greenwald et al., 2005; Kurtz et al., 2009). Lors d'une inflammation et d'une activation forte des Ly T, il y a une augmentation de l'expression de CTLA-4 au bout de 48h, qui entre en compétition avec le CD28 pour se fixer au CD80 et au CD86. Ayant plus d'affinité pour ces molécules le couple CD80-CD86/CTLA-4 se forme, induisant un contrôle de l'inflammation en inhibant l'activation lymphocytaire, réduisant la production d'IL-2 et arrêtant les cellules en phase G1 (Hubo et al., 2013). En outre, l'absence d'expression de CTLA-4 induit l'expression de Ly Th1 et Th2, et sa présence permet d'inhiber la production de cytokines par ces deux sous-populations (Alegre et al., 1998).

ICOS (Inducible Costimulator) exprimé sur les lymphocytes T et ICOS-L (ICOS-ligand) exprimé entre autres sur les DC font partie de la famille CD28-B7 (Hutloff et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999). ICOS qui est un homologue de CD28 agit en synergie avec CD28 pour réguler la différenciation des Ly T CD4. L'interaction ICOS/ICOS-L est en partie responsable de l'induction de Ly T anergiques et a des capacités suppressives *via* la sécrétion d'IL-10. Très exprimé sur les DC immatures et les DC régulatrices, ICOS-L a un rôle dans le maintien de la tolérance périphérique en stabilisant l'expression d'IL-10R sur les DC et sur les Ly T et en induisant des Ly Treg (Ito et al., 2007; Tuettenberg et al., 2009). Cependant, ICOS est aussi exprimé sur des Ly Th1 et Th2, à la fois pour sécréter de l'IL-10 et contrôler la réponse inflammatoire mais aussi pour sécréter de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IFN- γ (Sperling and Bluestone, 2001; Wassink et al., 2004). La réponse est dépendante de la nature de l'antigène rencontré, de sa localisation dans les tissus et de la chronicité de la réponse immunitaire (Bonhagen et al., 2003).

CD28 et ICOS jouent leur rôle de costimulation en activant la voie des PI3K (Phosphoinositide 3 kinase) (Cf 2.3.3.) (Mittelsteadt et al., 2016).

La molécule PD-1 (ProGram Death-1) exprimée sur les Ly T a deux ligands, PD-L 1 et 2. Leur interaction entraîne l'inhibition de la réponse T en freinant l'activation de la voie de

signalisation PI3K (Parry et al., 2005). La présence de PD-1 et de PD-L1 semble primordiale pour limiter le rejet de greffe du fait de leur capacité à inhiber les Ly T effecteurs et à induire des Treg (Keir et al., 2008; Riella et al., 2012). A l'inverse, il a été montré une surexpression de PD-1L sur des tumeurs, leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire (Hamanishi et al., 2007; Nakanishi et al., 2006). Actuellement, des études utilisant des anticorps anti-PD-L1 sont menées pour lutter contre certains cancers, dont le mélanome, avec des résultats intéressants. Ces anticorps permettent d'inhiber l'interaction de PD-1 avec les PD-L1 présentes sur les tumeurs, permettant de lever l'inhibition du système immunitaire (Hamid et al., 2013).

2.3.2. Les molécules de la famille TNF/TNF-R

Ox40L est exprimé par les DC après stimulation du CD40L. Il se fixe sur Ox40 exprimé par les Ly T (Ohshima et al., 1997). Cette interaction joue un rôle important dans l'expansion clonale des Ly T. En l'absence de sécrétion d'IL-12, cette interaction induit une différenciation des Ly T naïfs en faveur des Th2 (Ito et al., 2005). Cependant, en présence d'IL-12, les Ly T naïfs se différencient plutôt en Th1 (Smedt et al., 2002). En plus d'avoir un effet pro-Th1 ou pro-Th2, la stimulation d'OX40 inhibe l'expression de FoxP3 (Forkhead box P3) et l'induction de Ly Treg (Ito et al., 2006; Vu et al., 2007).

2.3.3. Le CD40/CD40L

Le CD40 (TNFRSF) est une molécule de costimulation présente sur les DC et non sur les Ly T. Le CD40L (CD154) présent sur les Ly T se lie au CD40 (Grewal and Flavell, 1998). L'effet est donc inverse aux autres molécules de costimulation présentées. Le rôle de la liaison de ces deux molécules est complexe et peut selon les conditions amplifier la réponse immunitaire ou être tolérogène. Le CD40L exprimé sur les Ly T activés entre en interaction avec le CD40 des DC matures, induisant une augmentation de l'expression de CD80 et de CD86. Il en résulte une sorte de boucle d'activation des DC par les Ly T, permettant d'augmenter le signal 2. Ceci se traduit par l'induction de la sécrétion de cytokines comme l'IL-2 et l'IL-12 (Quezada et al., 2004). Cependant, d'autres études ont montré que des DC stimulés par le CD40 pouvaient avoir un effet anergique sur les Ly T en produisant de l'IL-10 et en stabilisant l'expression de l'IL-10R sur les Ly T (Tuettenberg et al., 2010). La différence entre les deux réponses serait due au niveau d'expression de CD40L. Un faible niveau d'expression

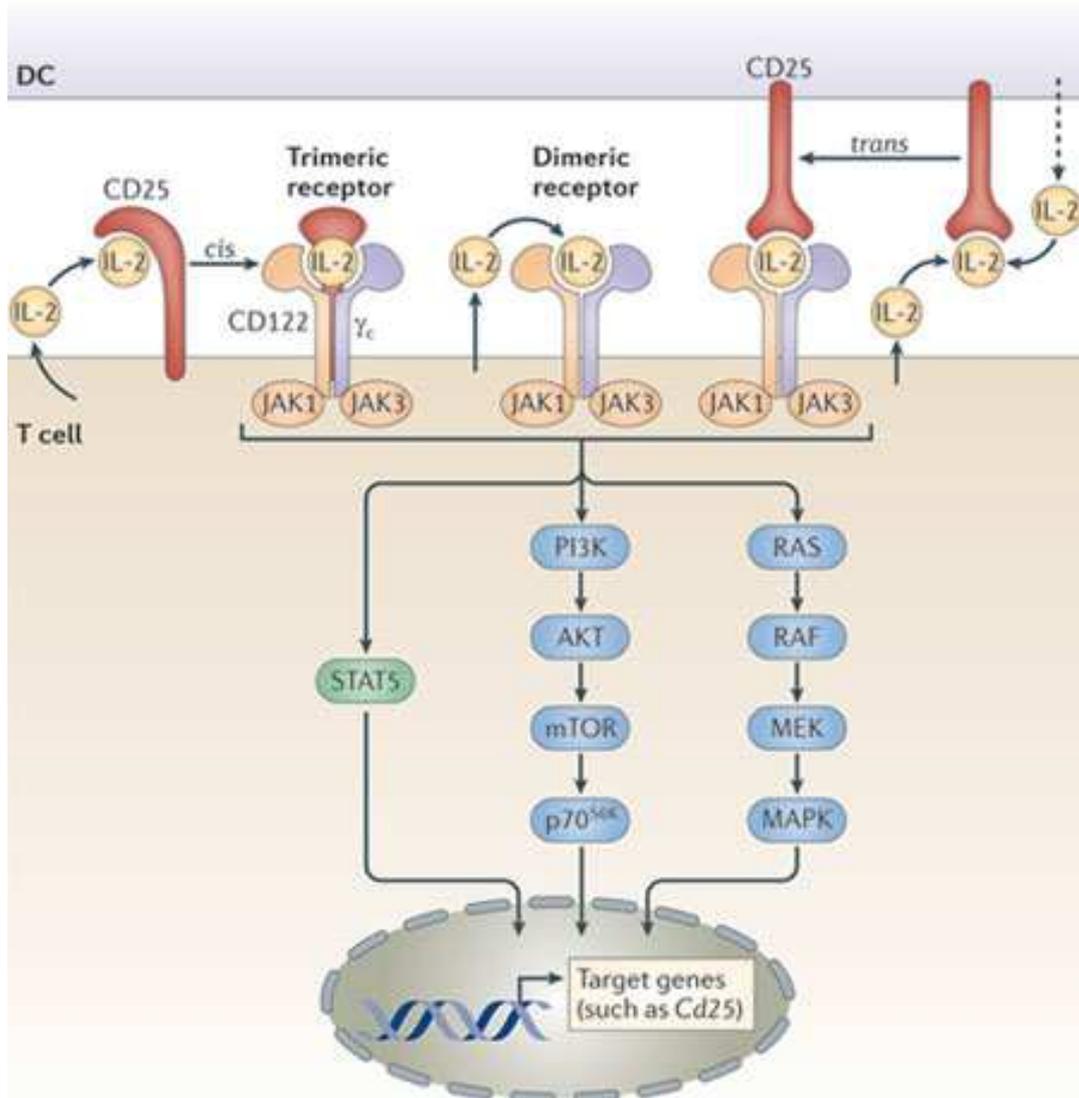


Figure 13. Expansion clonale dépendante de l'IL-2 et de la voie mTOR (D'après Boyman and Sprent., 2012).

de CD40L induirait l'effet anergique alors qu'une forte expression de CD40L induirait la sécrétion d'IL-12 (Murugaiyan et al., 2007).

2.3.4. La voie de stimulation de la PI3K

La PI3K joue un rôle essentiel dans l'activation des Ly T. Ce rôle a été montré par l'utilisation de souris mutantes pour le CD28, étant dans l'incapacité de se fixer à la PI3K, ceci entraînant un défaut de prolifération lymphocytaire ainsi qu'un défaut de sécrétion de l'IL-2 (Harada et al., 2001). La PI3K est rapidement activée après engagement du TCR et recrutée au niveau membranaire. Son activation permet le recrutement de protéines à domaine PH (Pleckstrin Homology) impliquées dans les processus de croissance et de survie cellulaire mais aussi dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. La PI3K permet aussi l'activation des Tec kinases permettant d'activer la PLC γ 1 qui, comme montré précédemment joue un rôle majeur dans le déclenchement des différentes voies de signalisation (Ward and Cantrell, 2001). La PI3K activée recrute aussi à la membrane Akt (ou protéine kinase B), active la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) et la voie des MAPK. Enfin, en jouant sur les différentes voies de signalisation, la PI3K induit la sécrétion accrue d'IL-2 et de CD25 (IL-2R).

2.3.5. L'expansion clonale : Interaction IL-2/IL-2R

A la fin du signal 1 et du signal 2, les Ly T naïfs ont commencé la synthèse d'IL-2 et de CD25, ce qui a permis de faire progresser le cycle cellulaire de la phase G₀ à la phase G₁. Les signaux délivrés par les molécules de costimulation et le CD25, renforcent l'activation de mTOR, aboutissant à une augmentation de sécrétion d'IL-2 et de l'expression du CD25.

La fixation de l'IL-2 sur le CD25 (IL-2R α) permet le recrutement des deux autres chaînes β et γ du CD25, déjà présentes sur les Ly T au repos. Le recrutement de ces deux chaînes augmente l'affinité de l'IL-2 pour son récepteur. Ainsi, il se crée une boucle autocrine IL-2/CD25 dépendante de mTOR permettant d'activer de nouveau la voie de la PI3K, et de stabiliser l'activation médiée par l'IL-2 (Figure 13) (Boyman and Sprent, 2012). Cette boucle autocrine et l'activation continue de mTOR prévient l'anergie et permet d'induire l'initiation de la prolifération lymphocytaire (Powell et al., 1999). Les gènes impliqués permettent la progression du cycle cellulaire de la phase G₁ à la phase S du cycle cellulaire. Les cellules vont alors se diviser par mitose et permettre l'expansion d'un clone spécifique de l'antigène présenté par les DC. Enfin, des Ly T déplétés en mTOR n'ont pas permis d'induire la différenciation des

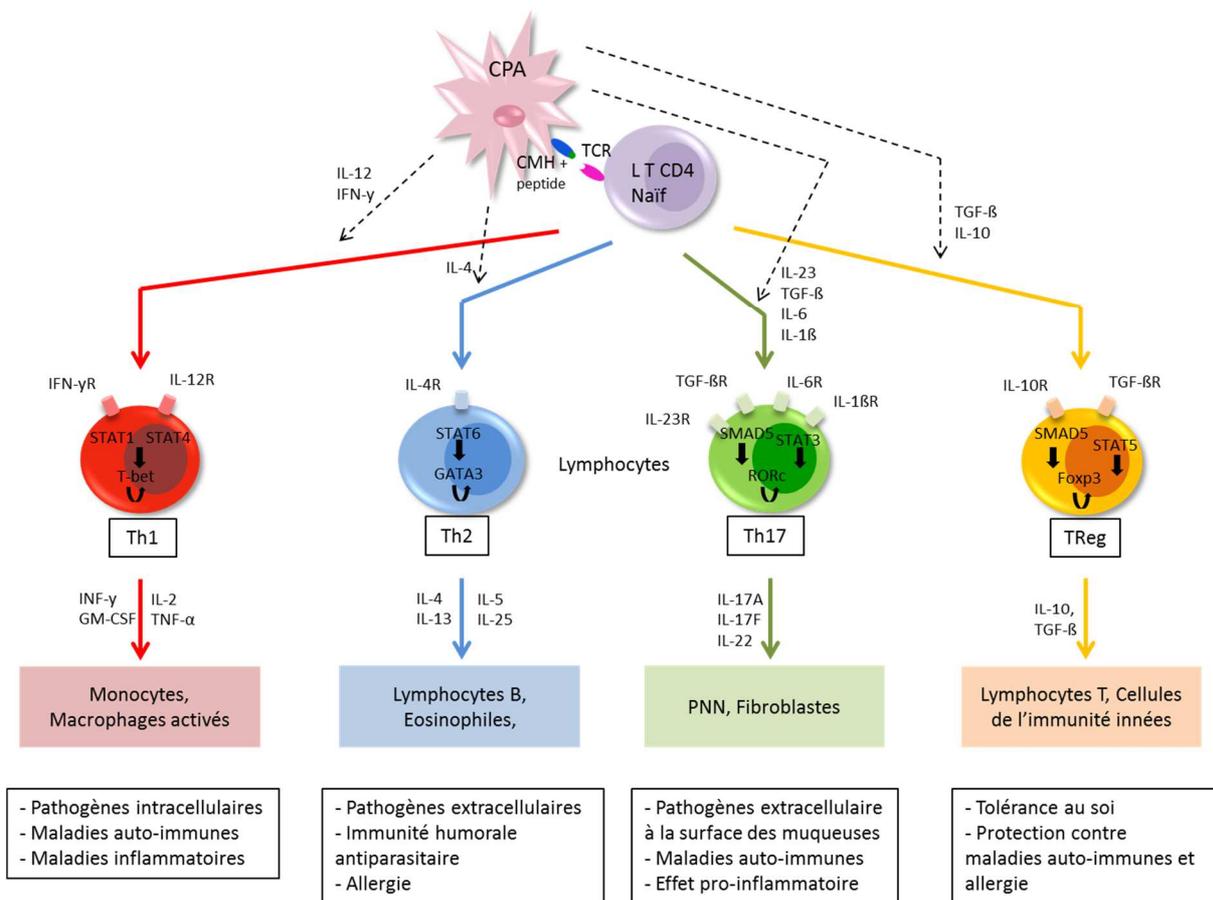


Figure 14. Polarisation des lymphocytes T naïfs après stimulation cytokinique par les DC en quatre sous-populations lymphocytaires, les Th1, Th2, Th17 et Treg.

Ly T naïfs en sous-population effectrice de Ly T. En revanche les Ly T naïfs sont devenus des Ly Treg (Waickman and Powell, 2012). mTOR joue donc un rôle dans le développement du signal 3 et la mise en place de la polarisation lymphocytaire T.

2.4. Signal 3 et polarisation lymphocytaire T

Les Ly T CD4, appelés aussi T « helper » jouent un rôle central dans la réponse immunitaire. La réponse des Ly T CD4 est adaptée aux signaux issus du microenvironnement captés dans les tissus périphériques par les PRR des DC. Après migration, les DC activent alors les Ly T naïfs dans les ganglions lymphatiques. Dans un premier temps, l'expression des marqueurs de costimulation à la surface des DC, en induisant une augmentation de l'expression du CD25 ainsi qu'une importante sécrétion d'IL-2, permet aux Ly T naïfs de devenir des Ly Th0. Ces derniers commencent à se multiplier grâce à l'activation de mTOR et la boucle autocrine d'IL-2/CD25, et à synthétiser un large panel de cytokines, mais ne sont pas encore différenciés. Le signal 3, ou signal cytokinique, correspond à la sécrétion de cytokines par les DC. La sécrétion cytokinique est spécifique des antigènes captés par les DC et permet aux Ly Th0 de se différencier en quatre sous-populations, les Ly Th1, Th2, Th1 ou Treg (Figure 14). Un engagement de Ly Th0 dans une voie est souvent définitif. En effet, les cytokines ont des effets antagonistes entre elles, favorisant alors leur propre voie tout en s'opposant aux autres. De plus, dans un second temps, les Ly Th sécrètent aussi des cytokines leur permettant d'augmenter l'activation de façon autocrine. Par exemple les Ly Th1 stimulés essentiellement par l'IL-12 provenant des DC sécrètent à son tour de l'IL-12 mais aussi de l'IFN- γ ; les Ly Th1 possédant les récepteurs de l'IFN- γ . Cette suite d'événement permet ainsi la polarisation lymphocytaire, apportant une réponse forte et adaptée au pathogène. Ainsi, par exemple, la présence de bactéries intracellulaires captées par les DC induira une réponse essentiellement de type Th1, alors que la reconnaissance de parasites comme les helminthes, par les DC induira une réponse de type Th2. Enfin, la reconnaissance de bactéries extracellulaires à la surface des muqueuses par les DC induira généralement une réponse de type Th17. Les Ly T reg auront un rôle dans la régulation des réponses immunes et un rôle essentiel dans la reconnaissance du soi (Reiner, 2007).

2.4.1. Les Ly T effecteurs

2.4.1.1. Le paradigme Th1/Th2

La découverte des sous-populations lymphocytaires est récente. C'est en 1986 que Mosmann *et al.*, décrivent à partir d'un modèle murin, deux sous-populations lymphocytaires dérivées d'un même précurseur, les Ly Th1 et les Ly Th2 (Mosmann et al., 1986). Ces cellules sont différenciées en fonction de leur profil de sécrétion cytokinique. Les Th1 sécrètent essentiellement de l'IFN- γ , induisant une activation des macrophages permettant de lutter contre les pathogènes intracellulaires alors que les Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 permettant de jouer un rôle important dans l'élimination de parasites extracellulaires. Dès lors, apparaît la notion de balance Th1/Th2, avec deux sous-populations mutuellement exclusives possédant des actions antagonistes.

2.4.1.2. Les Lymphocytes Th1

Les cytokines sécrétées par les cellules de l'immunité innée, comme les DC, ou par le microenvironnement créé par les cellules épithéliales d'une muqueuse jouent un rôle essentiel dans la polarisation des sous-populations lymphocytaires. L'IL-12 sécrétée par les DC, induit la polarisation de Ly T naïfs en Ly Th1 (Macatonia et al., 1995). L'IL-12 sécrétée par les DC se fixe sur l'IL-12R des Ly T naïfs, active le facteur de transcription STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) et induit la sécrétion d'IFN- γ . Dans le même temps, il y a une augmentation de l'expression d'IFN- γ R à la membrane des Ly T. Par le biais d'une boucle autocrine, l'IFN- γ sécrétée se fixe sur l'IFN- γ R, présent sur la membrane, et active les facteurs de transcription STAT1 et T-bet (T-box transcription factor), ce qui amplifie la sécrétion d'IFN- γ par le Ly T lui-même et induit la polarisation des Ly T naïfs en Ly Th1 (Lighvani et al., 2001). C'est ce facteur de transcription T-bet, qui active la programmation génétique des Ly T naïfs en Th1 et réprime la programmation génétique de la voie Th2 (Szabo et al., 2000). La sécrétion d'IL-12 par les DC induit donc une polarisation lymphocytaire de type Th1. La sécrétion de ces cytokines est antagoniste avec la sécrétion d'IL-4 et inhibe l'expression de GATA-3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor) qui est le facteur de transcription essentiel au développement des Th2. De plus, il est reconnu que l'intensité du signal 1 apporté par la quantité d'antigène ainsi que l'expression des molécules de costimulation pouvaient réguler la différenciation Th1/Th2. En effet, une importante concentration d'antigène ainsi qu'une forte expression de CD40L et de CD40 induisent une différenciation des Ly T naïfs en Th1 (Ruedl

et al., 2000). Inversement pour la polarisation en Ly Th2. Enfin, les Ly Th1 expriment à la surface préférentiellement CXCR3 et CCR5.

Grâce à la sécrétion de ces deux cytokines principales, les Ly Th1 ont la capacité de lutter contre les infections par des bactéries intracellulaires intravacuolaires en stimulant les macrophages et les cellules NK. Les Ly Th1 permettent aussi de lutter contre les infections virales intracytoplasmiques en stimulant les Ly T cytotoxiques. Cette réponse antivirale apportée par les Ly Th1 serait, d'après une étude récente, dépendante de l'IL-33 et de son récepteur ST2, initialement connus pour jouer un rôle dans la polarisation des Ly Th2 (Baumann et al., 2015). Une hyper-activation de la sous-population Th1 peut induire certaines maladies auto-immunes comme, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, l'hyper sensibilité de type IV...etc.

2.4.1.3. Les Lymphocytes Th2

Dans la polarisation des Ly T naïfs en Ly Th2, l'IL-4 joue un rôle majeur (Swain et al., 1990). Il existe deux voies d'activation des Ly Th2, en fonction de la concentration en IL-4. Lorsque l'IL-4 est sécrétée par les DC de manière abondante, elle se fixe sur l'IL-4R du Ly T. La fixation d'IL-4 sur son récepteur permet l'activation du facteur de transcription STAT6 qui induit l'expression de GATA-3 (Zheng and Flavell, 1997). La surexpression de GATA-3 stimule la production d'IL-4, d'IL-5 ainsi que d'IL-13 et inhibe l'expression d'IL-12R (Ouyang et al., 1998). S'il n'y a pas d'apport d'IL-4 exogène, il peut y avoir une auto-activation de GATA-3 induisant une faible production d'IL-4 médiée par le TCR. L'IL-4 endogène agit alors comme l'exogène et sur-régule l'expression de GATA-3 permettant ainsi de recréer la boucle autocrine (Farrar et al., 2002). Les cellules épithéliales, peuvent sécréter une grande variété de cytokines. Au contact d'helminthes, elles sécrètent du TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), de l'IL-25 et de l'IL-33 en grandes quantités. Elles sont connues pour augmenter l'interaction des molécules de costimulation Ox40/Ox40L pour potentialiser la réponse Th2 (Ito et al., 2005; Kitajima et al., 2011). Les cellules épithéliales au contact d'helminthe sécrètent aussi des chimiokines comme CCL17, CCL22 (jouant sur CCR4) et des eotaxin-like (jouant sur CCR3) permettant le recrutement de nombreuses cellules, comme les éosinophiles, les ILC2 (Innate Lymphoid cells 2), les Th2, les T reg et les basophiles (Hammad and Lambrecht, 2015). Bien que les DC soient essentielles pour le développement de la lignée Th2, il semblerait que dans certains cas, leur stimulation seule ne soit pas suffisante pour induire une réponse Th2 complète (Tang et al., 2010). En effet, les basophiles peuvent coopérer avec les DC en sécrétant d'une

part une forte quantité d'IL-4, et d'autre part, en ayant un rôle de CPA faisant de la présentation antigénique aux Ly T pour amplifier la réponse Th2 (Nakanishi, 2010; Sokol et al., 2009a). De plus, les basophiles sont responsables de la différenciation en Ly Th2 en réponse aux haptènes et à des peptides antigéniques mais pas à des protéines (Otsuka et al., 2013, 2016). Enfin, les Ly Th2 expriment à la surface CCR4, CCR3 et CRTh2.

Les Ly Th2 stimulés jouent alors un rôle dans la commutation de classe de plasmocyte à IgG en plasmocyte à IgE spécifique de parasite ou d'un allergène. Ces IgE spécifiques se fixent à la surface des basophiles et des mastocytes, qui possèdent des récepteurs au fragment constant des IgE, FcεRI. Les IgE se fixent alors sur leur cible, ce qui active la cellule qui, en réponse dégranule et détruit les helminthes par exemple (Stone et al., 2010). Cependant, du fait de la commutation de classe en IgE, une surproduction de Ly Th2 joue un rôle majeur dans les maladies atopiques comme l'asthme, la rhinite allergique et la dermatite atopique.

2.4.1.4. Les Ly Th17

Pendant presque 20 ans, l'étude des sous-populations lymphocytaires s'est axée presque exclusivement autour de la dichotomie Th1/Th2. Il y a 10 ans, la découverte de nouvelles cytokines de la famille de l'IL-17 (6 cytokines nommées IL-17A à IL-17F) et l'analyse de cytokines comme l'IL-23 (faisant partie de la famille de l'IL-12) ainsi que l'attribution de nouveaux rôles donnés à des cytokines pléiotropiques comme l'IL-6 et le TGF-β, ont mis en exergue la présence d'une troisième sous-population de Ly T effecteurs sécrétant de l'IL-17 : les Ly Th17 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Au départ, il était envisagé que l'IL-23 joue un rôle majeur dans la polarisation de Ly T naïfs en Ly Th17. En effet, L'IL-23 partage une sous-unité avec l'IL-12, la p40, mais pas la p35, car la deuxième sous-unité de l'IL-23 est la sous-unité p19. La sous-unité p40 se fixe sur le récepteur IL-12Rβ1 et la p35, sur le récepteur IL-12Rβ2. Or, seul le récepteur IL-12Rβ2 est présent sur le Ly T naïf. L'IL-23 ne peut donc pas se fixer et stimuler les Ly T naïfs, mais aurait un rôle dans la stabilisation des Th17 (Veldhoen et al., 2006a). Des auteurs ont alors démontré que la combinaison d'IL-6, d'IL-1β et de TGF-β en faible dose semble essentielle à la génération de Ly Th17 (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Sallusto et al., 2012). La combinaison de ces quatre cytokines varient en fonction du pathogène reconnu (Manel et al., 2008). Les Ly Th17 sécrètent des cytokines de la famille de l'IL-17 mais aussi de la famille de l'IL-2, l'IL-21. Cette dernière cytokine a plusieurs propriétés lui permettant à la fois, (i) de jouer positivement sur le développement de Th17 en

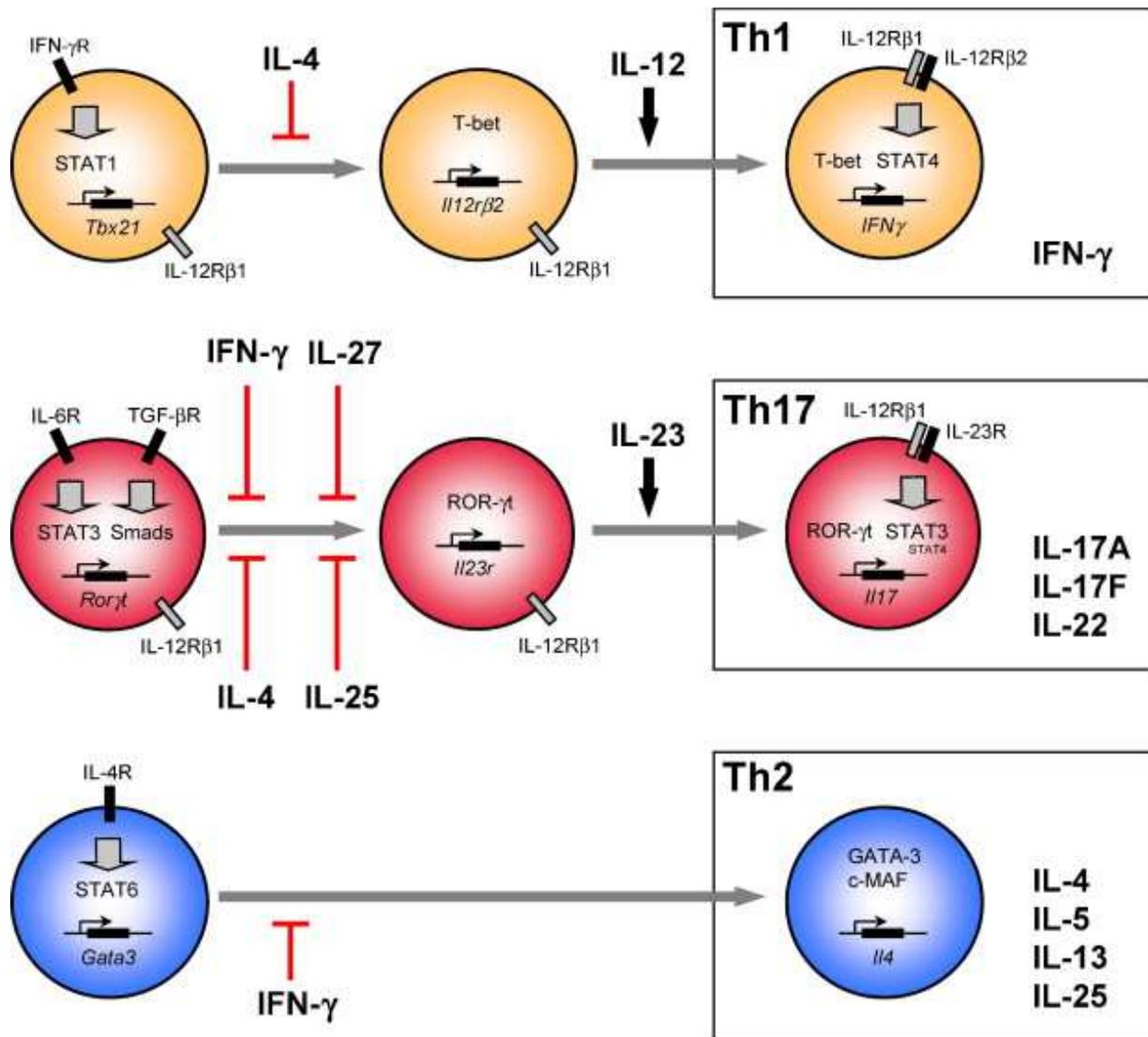


Figure 15. Effets antagonistes des cytokines s crites par les sous-populations lymphocytaires effectrices sur les autres sous-populations (D'après Korn et al., 2007b).

amplifiant la différenciation en Th17 en collaboration avec le TGF- β , (ii) de produire plus d'IL-21 grâce à une boucle autocrine et (iii) d'augmenter l'expression d'IL-23R sur les Th17 (Korn et al., 2007a; Nurieva et al., 2007; Zhou et al., 2007). Il y a donc trois étapes distinctes dans le développement des Th17, chacune caractérisée par une cytokine. Ces étapes se font toujours en présence de TGF- β : (i) l'induction avec l'IL-6 et l'IL-1 β , (ii) l'amplification avec l'IL-21 et (iii) la stabilisation avec l'IL-23. STAT3, stimulé par l'IL-6 et l'IL-23 joue un rôle important dans le développement de cette lignée en activant le facteur de transcription RORc (RAR-related Orphan Receptor c) (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Ivanov et al., 2006; Laurence et al., 2007; Yang et al., 2007). La sécrétion d'IL-2 qui *via* STAT5 est un facteur de croissance des sous-populations Th1 et Th2 a un rôle inhibiteur de Th17, tout comme la sécrétion d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-27 (Harrington et al., 2005; Korn et al., 2007b; Stumhofer et al., 2006; Veldhoen et al., 2006b) (Figure 15). Enfin, les Ly Th17 expriment à leur surface CCR6, leur permettant d'être adressés vers les muqueuses.

L'IL-17RA, est un récepteur présent sur de nombreuses cellules, comme les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les fibroblastes. Une fois activées par l'IL-17 sécrétée par les Ly Th17, ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α ainsi que des chimiokines induisant le recrutement des polynucléaires neutrophiles. Ce recrutement induit une très forte inflammation permettant de lutter contre les pathogènes extracellulaires présents à la surface des muqueuses comme *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* (Huang et al., 2004; Infante-Duarte et al., 2000; Kolls and Lindén, 2004; Puel et al., 2011). Cependant, une mauvaise régulation de la sécrétion d'IL-17 a été reconnue pour jouer un rôle majeur dans le développement de maladies auto-immunes comme l'encéphalomyélite auto-immune ou le psoriasis ainsi que dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comme la maladie de Crohn (Ghoreschi et al., 2010; Harden et al., 2015; Lock et al., 2002; Sato et al., 2006; Teunissen et al., 1998; Yen et al., 2006).

2.4.2. Les Ly T régulateurs

Les Ly Treg ont un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie immunitaire et de la tolérance à la fois, aux antigènes du soi et aux antigènes inoffensifs de l'environnement. Les premières études indiquant des phénomènes de tolérance, par des cellules provenant du thymus ont été publiées vers la fin des années 1960 (Gershon et al., 1968; Isaković et al., 1965).

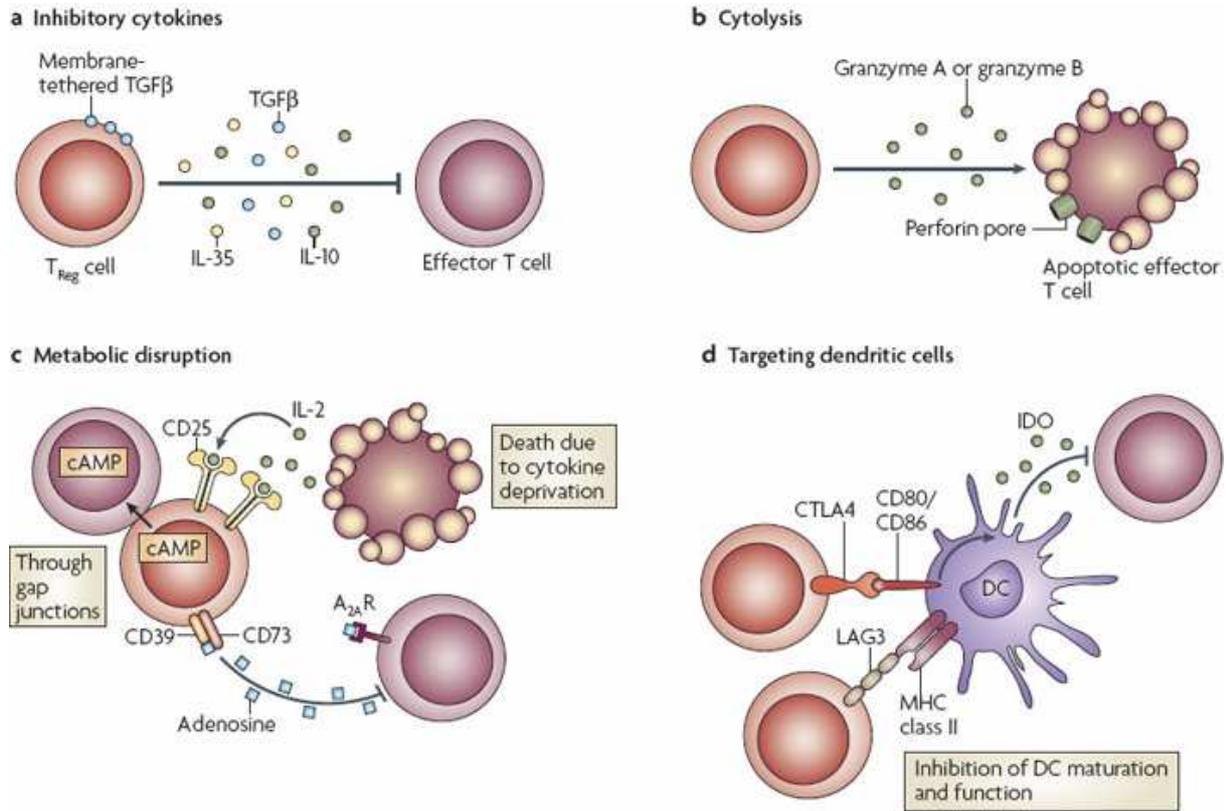


Figure 16. Quatre mécanismes d'actions des lymphocytes Treg (D'après Vignali et al., 2008).

(a) Par sécrétion de cytokines inhibitrices, (b) par cytolysse, (c) par altération métabolique, (d) en inhibant la maturation des DC.

Cependant, au début des années 1990, les auteurs faisaient mention de Ly T suppresseurs et non régulateurs. C'est seulement au milieu des années 1990 que ce concept essentiel a été remis en cause, pour faire alors mention de Ly T à action régulatrice, c'est-à-dire, les Ly Treg. Ces cellules ont une action opposée à celle des sous-populations effectrices décrites précédemment, à savoir, une action anti-inflammatoire (Sakaguchi et al., 1995). Sont décrits alors, deux types de tolérance : la tolérance centrale médiée par les Ly Treg dits naturels, directement produits dans le thymus et la tolérance périphérique, médiée par les Ly Treg induits après polarisation au contact des DC par la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β . Ce sont les deux sous-types cellulaires principaux, CD4⁺, CD25⁺ et FoxP3⁺ (Asseman et al., 1999; Powrie et al., 1996; Takahashi et al., 2000). Les Treg induits sont activés spécifiquement par la présentation d'antigène par les DC. Les Treg peuvent agir de plusieurs façons (Figure 16) : (i) en sécrétant des cytokines inhibitrices IL-10, TGF- β et l'IL-35 (Collison et al., 2007, 2009). La sécrétion d'IL-35 induirait une autre sous-population de Ly Treg, les iTreg35, ayant une activité suppressive *via* la sécrétion d'IL-35 mais pas d'IL-10, ni de TGF- β (Collison et al., 2010, 2012). (ii) Par cytolysse en sécrétant des molécules granzyme (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004). (iii) Par altération métabolique en consommant l'IL-2 présente grâce à leur forte expression en CD25, privant les Ly T effecteurs de l'IL-2 nécessaire à leurs besoins (Pandiyan et al., 2007) et (iv) par action sur les DC en inhibant l'expression de molécules de co-stimulation comme CD80/86 et en induisant des molécules immunosuppressives comme l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Vignali et al., 2008). Une dérégulation des Ly Treg peut induire de nombreux problèmes physiopathologiques participant à l'apparition de maladies dysimmunitaires comme les allergies, maladies auto-immunes ou les cancers....

La classification des Ly Treg est très discutée, car deux autres sous-types, les Tr1 et les Th3, qui n'expriment pas le FoxP3 seraient aussi des Ly Treg, mais présents en faible quantité dans certaines muqueuses.

Les Ly Tr1, sont des lymphocytes producteurs d'IL-10. Ils peuvent cependant sécréter de faibles quantités de TGF- β , d'IL-5, d'IL-2 et d'IFN- γ , mais pas d'IL-4. Ils expriment les marqueurs d'activation CD28, CTLA4, CD25, HLA-DR et CD40L (Roncarolo et al., 2006). De plus, ils expriment à leur surface à la fois des récepteurs de chimiokines des Ly Th1 CXCR3 et CCR5 ainsi que des Th2 CCR3, CCR4 et CCR8. Bien qu'ils expriment différents marqueurs d'activation, ils ont peu de capacité à proliférer. Ils n'ont pas besoin d'exprimer le FoxP3 pour jouer leur rôle régulateur. Bien que les Ly Tr1 soient généralement caractérisés par l'absence de FoxP3, ce point est encore disputé et certains auteurs indiquent que des Ly Tr1 peuvent

exprimer FoxP3 (Brun et al., 2009; Maynard et al., 2007; Roncarolo and Gregori, 2008). Les voies de signalisation sont mal connues mais seraient activées par AHR (Aryl Hydrocarbon receptor) (Gandhi et al., 2010). Ils sont générés *in vitro* à partir de Ly T naïfs après stimulation du TCR en présence de grande quantité d'IL-10 (Battaglia et al., 2006). De même, une stimulation répétée de Ly T naïfs par des DC immatures allogéniques peut induire des Ly Tr1 (Wakkach et al., 2003). Ils ont surtout un rôle très important dans la tolérance au greffon lors de transplantation (allo-antigène), dans l'inhibition de la réponse immunitaire face à des allergènes (antigènes de l'environnement non dangereux) et dans la tolérance du soi (Battaglia et al., 2006). Du fait de leur stimulation après contact répété avec un antigène, ils agiraient à retardement, pour diminuer la réponse immunitaire afin de restaurer et maintenir la tolérance (Gol-Ara et al., 2012).

Les Ly Th3, sont des lymphocytes producteurs de TGF- β . Ils ont été identifiés lors de recherches concernant l'étude des mécanismes de tolérance orale au niveau de la muqueuse digestive. Les Ly Th3 apportent leur aide pour la sécrétion d'IgA et ont un rôle dans la suppression des réponses Th1 et Th2. L'expression de FoxP3 par les Th3 est discutée (Ramsdell, 2003). Les Ly Th3 exercent leur activité suppressive grâce à la sécrétion de TGF- β , indépendamment d'un contact avec une cellule. Certains auteurs leur attribuent un rôle important dans l'homéostasie des Ly T, mais ce champ de recherche doit être plus investigué (Gol-Ara et al., 2012; Zhu and Paul, 2009).

2.4.3. Plasticité lymphocytaire

Comme cela vient d'être décrit, les Ly T naïfs peuvent se différencier en plusieurs sous-populations effectrices ou régulatrices et avoir différentes fonctions (Sallusto et al., 2004). Une fois différenciés, après avoir rencontré un antigène spécifique, les Ly T sont moins flexibles, bien que certaines de ces sous-populations gardent une possible plasticité leur permettant d'acquérir de nouvelles fonctions, en sécrétant de nouvelles cytokines après une nouvelle stimulation, en passant par exemple, de Ly Th en Treg ou vice versa (O'Garra and Vieira, 2007; Zhou et al., 2009a). La plasticité des Ly T est encore mal connue chez l'Homme. Les premières études sur la plasticité lymphocytaire ont été faites sur les Th1 et les Th2. Bien qu'il ait été montré que l'IFN- γ et l'IL-4 ont un effet antagoniste respectivement envers ces deux sous-populations, des Th1 mémoires ont la capacité de produire de l'IL-4 après stimulation du TCR en présence d'IL-4 sans perdre leur capacité à produire de l'IFN- γ alors que les Th2 semblent

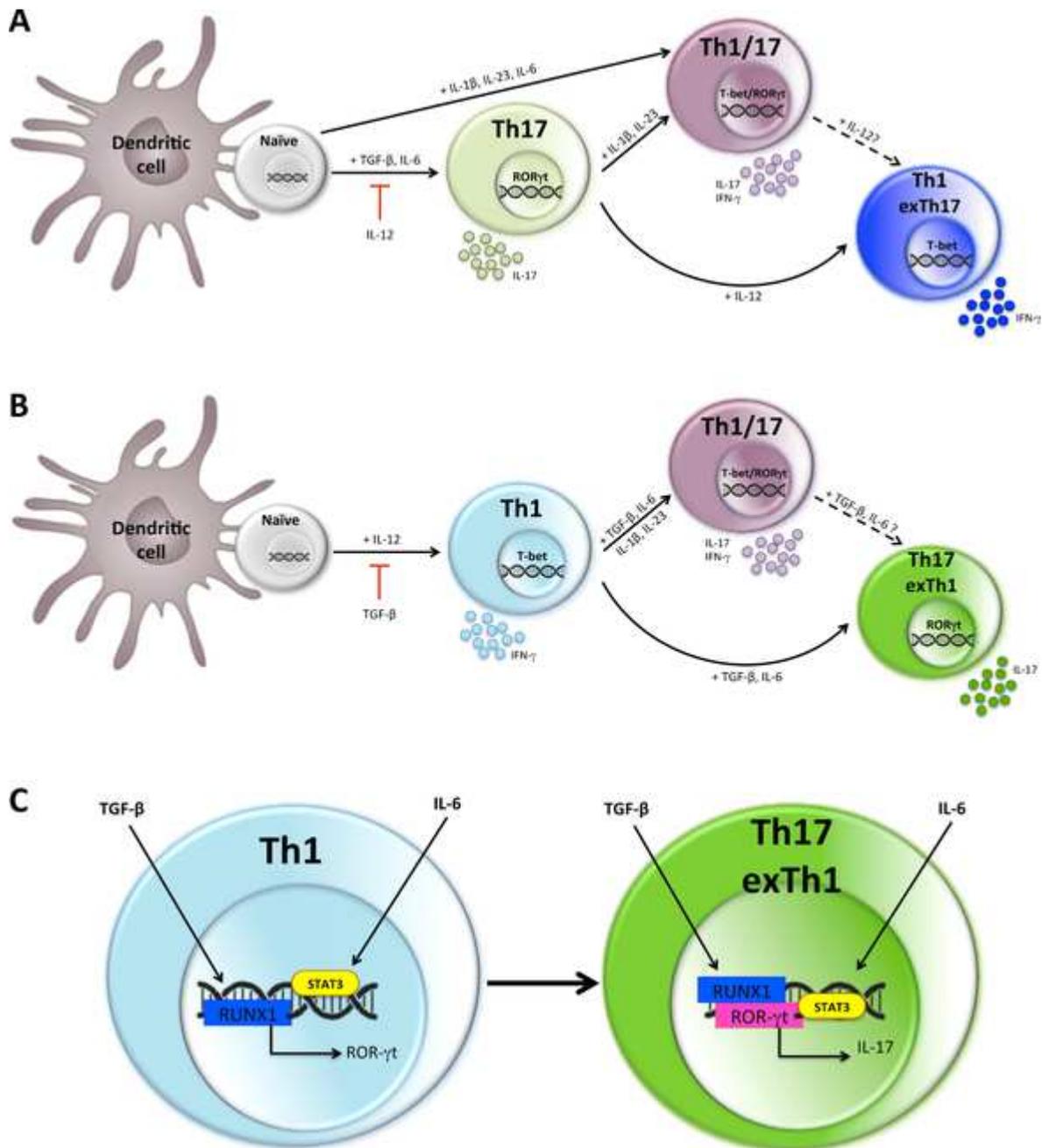


Figure 17. Plasticité lymphocytaire entre les lymphocytes Th1 et Th17 (D'après Geginat et al., 2016).

(a) Augmentation d'expression du facteur de transcription t-bet et de la production d'IFN- γ par les lymphocytes Th17 formant des Th1 ex Th17. (b) Augmentation d'expression du facteur de transcription ROR γ T et de la production de TGF- β , IL-6, IL-1 β et IL-23 par les lymphocytes Th1 formant des Th17 ex Th1. (c) Mécanisme génétique possible expliquant l'expression de ROR γ T par des Th1 en présence de TGF- β .

moins plastiques (Messi et al., 2003). De plus, certaines cellules sont capables d'exprimer à la fois des marqueurs de surface Th1 et Th2 que sont CXCR3 et CCR4 (ou CRTh2), ainsi que GATA-3 et T-bet (Peine et al., 2013; Rivino et al., 2004). Pour poursuivre dans l'étude de la plasticité des Th1, il a été montré que l'IL-12 peut induire des clones de Th1 producteur d'IFN- γ et d'IL-10 (Gerosa et al., 1996). Ces cellules coproductrices d'IL-10 et d'IFN- γ (Tr1) sont très peu présentes dans le sang et répondent à des pathogènes persistants dans l'organisme contrôlant ainsi la réponse potentiellement néfaste d'une hyperproduction d'IFN- γ (Häringer et al., 2009). Les Ly Th1 deviennent alors des Ly Tr1, avec une phase intermédiaire où les cellules sont coproductrices d'IL-10 et d'IFN- γ . Ce switch est nécessaire pour maintenir l'intégrité du tissu dans ce type d'infection (Cope et al., 2011). Récemment, il y a eu une avancée concernant la plasticité des Th2, dans un modèle murin décrivant le fait que des Ly Th folliculaires (Ly Tfh) (Cf 2.4.4.) (Ly T aidant les Ly B à produire des Ac) sont dérivés de Th2 (Zaretsky et al., 2009). Ces résultats montrent que les Ly Th1 et Th2, essentiellement mémoires peuvent acquérir différentes propriétés fonctionnelles après une nouvelle stimulation antigénique sous l'influence de cytokines. De plus, il a été montré très récemment, que dans un modèle murin d'inflammation intestinale, les Ly Th1 pouvaient se différencier en Th17 sous l'influence de TGF- β (Geginat et al., 2016; Liu et al., 2015) (Figure 17).

Comme mentionné auparavant, la différenciation en Ly Th17 est plus complexe que pour les Ly Th1 et Th2 car elle nécessite un cocktail de trois ou quatre cytokines. Ces Ly Th17 ont une plasticité importante et peuvent être Th1/Th17, Th2/Th17 et Treg/Th17. En effet, ils peuvent exprimer à la fois CCR6 et CXCR3 sous l'action d'IL-1 β , mais aussi de l'IL12 et de l'IFN- γ (Duhon and Campbell, 2014; Lexberg et al., 2010). Ces cellules luttent à la fois contre les pathogènes reconnus par les Th1 et les Th17 et sont enrichies chez les patients atteints de maladies auto-immunes. Certaines cellules peuvent même devenir des Ly Th1 dérivés de Ly Th17 et le marqueur CD161 a été proposé comme marqueur pour différencier les Ly Th1 conventionnels des Ly Th1 dérivés de Th17 (Maggi et al., 2012). En 2010, une équipe a identifié une rare population de cellules sécrétant à la fois de l'IL-17 et de l'IL-4, étant donc Th2/Th17 avec un rôle inflammatoire dans l'asthme allergique (Cosmi et al., 2010). L'IL-21, sécrétée par les Ly Th17, peut inhiber la sécrétion d'IFN- γ et accroître la sécrétion d'IL-10 par les Ly Th17 et donc générer à la fois des Ly Th17 conventionnels (sécrétion autocrine d'IL-21) ou des Ly Th17 régulateurs tout en inhibant les Ly T pathogéniques Th1/Th17 (Kastirr et al., 2014; Peters et al., 2011). Ces résultats récents montrent que les Ly Th17 sont hautement hétérogènes et partiellement instables.

Enfin, au sujet de l'hétérogénéité des Ly Treg, il a été montré que les principaux facteurs de transcription que sont T-bet, GATA-3 et RORc peuvent être exprimés par des sous-populations de Ly Treg. Lors d'une infection forte dans un environnement tolérogène, la quantité de Treg décroît, la population de Ly Th1 augmente et les Ly Treg peuvent exprimer T-bet et l'IFN- γ (Oldenhove et al., 2009). Cependant, lors d'une décroissance de la population de Ly Treg, celle-ci a plutôt tendance à préférentiellement se différencier en Ly Th2, même dans un environnement Th1 (Wan and Flavell, 2007). Enfin, le TGF- β jouant un rôle important dans la différenciation des Ly Treg et des Ly Th17, sa concentration en baisse ainsi que la présence d'IL-6, (plus d'IL-1 β ...) peut faire que des Ly Treg se différencient en Ly Th17 (Voo et al., 2009). Cette balance Th17/Treg est régulée par les interactions du système immunitaire de la muqueuse digestive et de la flore digestive. C'est pourquoi, cette balance est très importante au niveau du tube digestif pour lutter contre les MICI. De nombreuses études s'intéressent à la modification de la flore intestinale par l'ajout de probiotiques dans le but de créer un environnement riche en TGF- β afin de jouer sur cette balance Th17/Treg et former plus de Treg que de Th1. Enfin, une équipe a déterminé que beaucoup de Ly T effecteurs avaient précédemment exprimé FoxP3 et qu'ils sont soit dérivés de Treg, soit que pendant leur différenciation, les Ly T effecteurs ont exprimé FoxP3 de façon transitoire (Zhou et al., 2009b).

2.4.4. Autres sous-populations issues de la lignée lymphoïde

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux quatre grandes sous-populations lymphocytaires citées précédemment. Cependant, il existe d'autres sous-populations ayant des rôles néanmoins importants, qui ont été récemment décrites. Elles seront brièvement présentées dans cette sous partie.

Les Ly Th22, découverts en 2009, sont des lymphocytes producteurs d'IL-22. Due à l'utilisation de modèles animaux, la sécrétion d'IL-22 était initialement attribuée aux Ly Th17 (Yang et al., 2008). Cependant, l'activation du facteur de transcription des Ly Th17, RORc chez l'Homme (ROR γ T chez la souris) n'entraîne pas de sécrétion d'IL-22. Le facteur de transcription impliqué dans la sécrétion d'IL-22 est l'AHR. Les Ly Th22 ne sécrètent ni d'IL-17, ni d'IFN- γ , ni d'IL-4. Cette sous-population à part, exprime pourtant, CCR4 (Th2) et CCR6 (Th17) (Eyerich et al., 2009; Trifari et al., 2009). Les cellules de l'immunité ne possèdent pas d'IL-22R au contraire des cellules épithéliales des tractus digestifs et respiratoires ainsi que de la peau. La sécrétion d'IL-22 est importante dans le maintien de l'homéostasie des cellules

épithéliales, dans la réparation des tissus et dans la lutte contre les bactéries entéropathogènes (Basu et al., 2012; Wolk et al., 2004). L'IL-22 est retrouvée dans un grand nombre de maladies de la peau et de maladies autoimmunes, comme le psoriasis, la dermatite atopique, la spondylarthrite ankylosante et l'arthrite rhumatoïde (Benham et al., 2013; Fujita, 2013; Gittler et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Les Ly Th9, sont des lymphocytes producteurs d'IL-9. Pour se différencier, les Ly Th9 ont à la fois besoin de la présence d'IL-4 et de TGF- β et sont dépendants de leur facteur de transcription respectif STAT6 et PU.1. STAT6 réprime à la fois les facteurs de transcription FoxP3 (Treg) et T-bet (Th1) et stimule les facteurs de transcription IRF4 et GATA3. Cependant GATA3 ne permet pas la sécrétion directe d'IL-9. Il aurait plutôt un rôle dans l'inhibition de FoxP3 et ne doit pas être trop exprimé pour ne pas induire des Ly Th2. Les Ly Th9 sont pro-inflammatoires en stimulant le recrutement de mastocytes et d'autres cellules au site d'inflammation. Leur fonction dépend du microenvironnement du tissu dans lequel ils se situent mais auraient un rôle dans la lutte contre les mélanomes et les vers intestinaux. Il apparaît que leur contribution est forte dans des maladies autoimmunes et les allergies. Cependant, paradoxalement, l'IL-9 peut promouvoir des Ly Treg (Jabeen and Kaplan, 2012; Schmitt et al., 2014).

Les Ly Tfh : ce sont les Ly T spécialisés dans l'aide aux Ly B dans les follicules lymphoïdes. La différenciation des Ly T naïfs en Ly Tfh est un processus multifactoriel avec différentes étapes. Si CXCR5 est exprimé, les Ly Tfh précoces migrent à la bordure du follicule des cellules lymphoïdes. Cette différenciation est régulée par l'IL-6, qui de façon transitoire induit l'expression du facteur de transcription Bcl6 (B cell lymphoma 6) nécessaire pour l'expression de CXCR5 et réprime CCR7 (Nurieva et al., 2009). ICOS, l'IL-2 et le TCR ont aussi un rôle dans la différenciation. La deuxième étape arrive lors de l'interaction avec les Ly B qui jouent alors le rôle de CPA. Cette interaction crée un signal activateur grâce aux molécules de stimulation engagées (ICOS et CD40L), stimule la prolifération des Ly B et facilite le changement de classe des plasmocytes en fonction des cytokines sécrétées (King, 2009). La troisième étape se déroule dans le centre germinal (GC) où les Ly Tfh sécrètent alors CXCL13, de l'IL-21 et de l'IL-4. Ils peuvent alors quitter le GC, transiter dans un follicule voisin et entrer dans un autre GC avant de le quitter, de perdre l'expression de Bcl 6 et de devenir mémoire. Grâce à la sécrétion d'IL-21, les Ly Tfh ont un rôle dans la formation du GC (Vogelzang et al., 2008). De plus, ils ont comme rôle essentiel d'activer les Ly B et de déclencher, grâce à la sécrétion de cytokines, des signaux permettant la commutation de classes des plasmocytes (King, 2009). Les cytokines sécrétées permettent la survie des Ly B ainsi que leur prolifération.

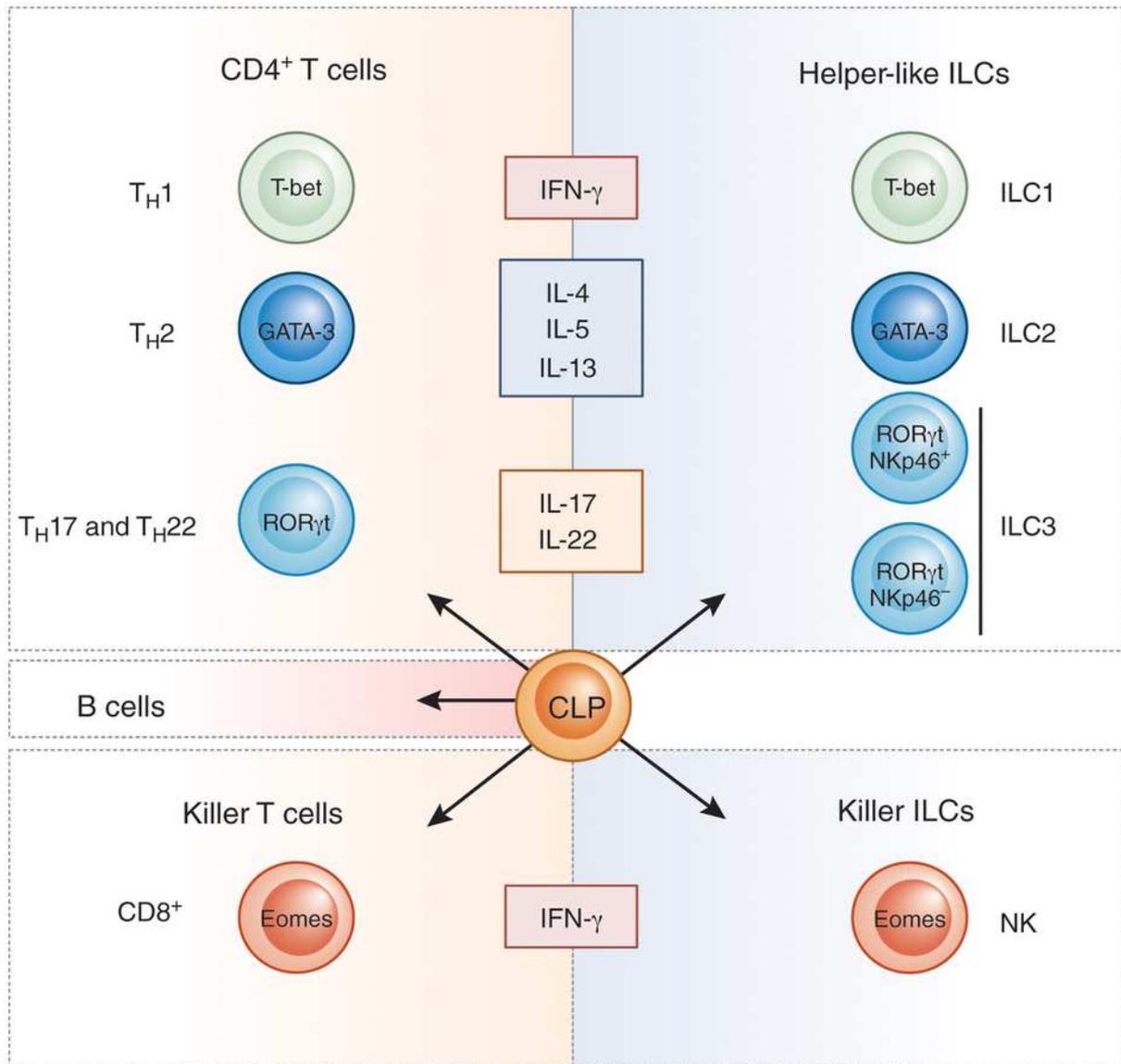


Figure 18. Equivalence entre les cellules lymphoïdes innées et leurs homologues de l'immunité adaptative, les lymphocytes T (D'après Eberl et al., 2015).

Ils sont essentiels pour la génération et la commutation de classe de certains anticorps jouant donc un rôle de protection contre les pathogènes. Ils sont aussi très importants dans le contrôle du microbiote par le biais de la production d'IgA dépendant des Ly T. La biologie des Ly Tfh est complexe et les découvertes sont récentes. De plus amples connaissances devraient arriver dans les années à venir (Crotty, 2014).

Il existe aussi dans le sang des Ly T activés, mémoires, à vies longues ayant les propriétés fonctionnelles des Ly Tfh. Ces Ly Tfh circulants (cTfh) n'expriment pas Bcl-6 et sont classés en sous-populations en fonction de leur expression de CXCR3 et CCR6. Les cTfh1 sont CXCR3+ CCR6- (ressemblant aux Ly Th1), expriment T-bet et sécrètent de l'IFN- γ . Les cTfh2 sont CXCR3- CCR6- (ressemblant aux Ly Th2), expriment GATA3 et sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Les cTfh17 sont CXCR3- CCR6+ (ressemblant aux Ly Th17), expriment ROR γ T et sécrètent de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22. Leur rôle étant de patrouiller dans les organes lymphoïdes secondaires en condition homéostatique. Lors d'une exposition à des antigènes les cTfh peuvent s'accumuler dans les ganglions lymphatiques pour apporter une aide rapide aux Ly B pour produire des anticorps spécifiques (Ueno, 2016a, 2016b).

Les Cellules lymphoïdes innées (ILC) : Les ILC 1, 2 et 3, sont considérées comme le miroir phénotypique et fonctionnel des Ly T CD4 helper respectivement, Th1, Th2 et Th17 (Figure 18). Elles n'expriment que très peu de PRR mais réagissent rapidement à un signal inflammatoire ou infectieux et sécrètent des cytokines correspondant à cette agression. Elles possèdent de multiples récepteurs de cytokines, ce qui leur permet de surveiller l'environnement de la muqueuse intestinale par exemple, et de répondre aux cytokines sécrétées par les DC, les cellules épithéliales, les macrophages... En fonction des cytokines reconnues, une réponse adaptée par le biais d'une sécrétion de cytokines est apportée par les ILC (Klose and Artis, 2016). Elles ont le même précurseur commun (CLP) que les lymphocytes mais des facteurs de transcription suppriment les destinées B ou T et génèrent des ILC. Les précurseurs des ILC migrent directement vers les tissus infectés où elles terminent leur maturation. En fonction du microenvironnement et des cytokines sécrétées dans le milieu, seront générées des ILC 1, 2 ou 3. Les ILC jouent un rôle sur la polarisation lymphocytaire de deux manières, (i) indirectement, par la sécrétion de cytokines, pour influencer les DC qui à leur tour feront de la polarisation lymphocytaire, ou (ii) directement, pour les ILC 2 et 3 grâce à la présentation de peptides par les CMH de type II (Eberl et al., 2015; Hepworth et al., 2013; Klose and Artis, 2016). Les ILC 1 n'expriment pas le CMH de type II (Goldberg et al., 2015). Les cellules NK

conventionnelles sont considérées comme le pendant de l'immunité innée des Ly T CD8. Les ILC sont donc le pendant de l'immunité innée des Ly T CD4 (Figure 18).

L'étude des ILC est en plein essor, cependant, nous ne rentrerons pas plus dans le détail car ces cellules n'ont pas été étudiées dans le cadre de cette thèse.

Chapitre 2 : Les probiotiques

1. Généralités

1.1. Historique

La première définition du terme probiotique date de 1953 (Kollath, 1953). Probiotique en étymologie grec signifiant « en faveur de la vie » a été introduit pour l'opposer à la notion d'antibiotique plutôt néfaste pour la santé. Diverses définitions se sont succédées au cours des années pour que récemment, en 2001, l'organisation mondiale de la santé fournisse une définition reconnue internationalement, bien que restant encore l'objet de débats. Cette définition est la suivante : « Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui administrés en quantité adéquate, confère un bénéfice pour la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2001). Le terme vivant est débattu car comme nous le verrons dans certaines études ainsi que dans notre travail, des probiotiques inactivées par des UV ou par la chaleur peuvent avoir des effets importants.

Depuis l'antiquité, les Hommes consomment des aliments fermentés, dont nous savons maintenant que les effets bénéfiques étaient dus aux micro-organismes utilisés. De nos jours, le concept de probiotique est largement répandu et commence à être connu du grand public. Cependant, ce concept a en fait cent-dix ans. En effet, c'est en 1906 que Tissier reportait des effets bénéfiques de la consommation de produits fermentés chez des enfants atteints d'infections intestinales (Tissier, 1907). Un an plus tard, Metchnikoff, prix Nobel de médecine pour ses travaux sur la phagocytose et biologiste à l'Institut Pasteur de Paris, fait le lien entre la santé, la longévité et la consommation de bactéries présentes dans le lait fermenté. Il s'est appuyé sur des faits qu'il a observés comme la préservation des aliments de la putréfaction après fermentation lactique ainsi que la longévité de paysans bulgares consommant de grandes quantités de lait fermenté contenant des *Lactobacillus bulgaricus* (Metchnikoff, 1907). De plus, ses expériences ont montré que les effets bénéfiques étaient dus à la production d'acide lactique, mais pas seulement. La présence de la bactérie elle-même semblait avoir aussi des effets bénéfiques sur la santé. La commercialisation de probiotiques a débuté à Paris en 1906, par la Lactobacilline. La société la produisant était le fournisseur de Metchnikoff pour ses recherches. En 1917, Nissle, en étudiant la flore fécale de soldats de la première guerre mondiale et a réussi à isoler une souche d'*Escherichia coli* présente dans la flore de soldats n'ayant pas eu d'infections intestinales (Nissle, 1916). Elle est alors utilisée dans le traitement d'infections à *Salmonella* et à *Shigella* dès 1917. Cette souche toujours utilisée de nos jours porte le nom d'*E. coli* Nissle 1917. En 1923, c'est Boulard, qui lors d'un voyage en Indochine étudia la peau d'un

fruit exotique permettant aux autochtones de se traiter contre la diarrhée lors d'une épidémie de choléra. Cette étude lui permit de mettre en évidence la présence de *Saccharomyces boulardii* qui est toujours utilisé de nos jours (Martins et al., 2013). Dans les années 1930, Shirota a réussi à isoler une bactérie lactique issue de fèces humaines capable de survivre à la digestion. Il créa une boisson fermentée, le Yakult à partir de ce lactobacille, le *Lactobacillus casei* Shirota, qui est toujours commercialisé aujourd'hui.

Il existe de très nombreuses bactéries probiotiques, et nous allons nous intéresser à une bactérie lactique isolée dans les années 1950, à Aurillac, de l'intestin d'un enfant, le *Lactobacillus rhamnosus* 35. Le Lcr35 est toujours commercialisé sous différentes formes aujourd'hui est sujet de l'étude de cette thèse. Les caractéristiques du Lcr35 ainsi que les recherches effectuées à son sujet seront développées dans un paragraphe ultérieur.

Ces dernières années, le développement de produits probiotiques, allant des produits laitiers fermentés, aux gélules, comprimés et autres, s'est largement développé pour arriver à un marché mondial d'environ 20 milliards de dollars. De plus, l'engouement scientifique est énorme avec plus de 6000 publications scientifiques dans les vingt dernières années, dont 60% de ces publications dans les cinq dernières années, certaines étant publiées dans des journaux scientifiques de haut rang (Didari et al., 2014). Pour obtenir le statut de probiotique, la preuve d'inocuité doit être apportée par de multiples études pour ainsi obtenir le statut de GRAS (Generally recognized as safe). Ensuite, il existe des probiotiques médicamenteux, peu nombreux, pour lesquels il faut apporter des preuves d'efficacité. En France, seulement une bactérie (le Lcr35, Bacilor®), sujet de l'étude et une levure (*S. boulardii*, Ultra Levure®) ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les autres probiotiques sont considérés comme des compléments alimentaires. Enfin, l'intérêt scientifique et économique pousse les laboratoires à identifier de nouveaux genres, espèces et souches de probiotiques potentielles, qui seront utilisées dans des indications variées.

1.2. Les différents genres, espèces et souches de probiotiques

Dans cette partie, nous nous attarderons sur les genres ainsi que sur certaines espèces, les plus communément utilisés, comme probiotiques (Fijan, 2014). La liste suivante est non exhaustive.

Le genre *Lactobacillus* contient des bactéries à Gram positif anaérobie facultative et est l'un des genres les plus étudiés avec les genres *Bifidobacterium* et *Saccharomyces*. Elles sont les premières à coloniser le tractus digestif d'un nouveau-né car c'est le genre majoritaire au niveau vaginal de la maman. Elles restent présentes à l'âge adulte dans le tractus digestif mais leur proportion est moindre que pour un nouveau-né (Walker, 2013; Walter, 2008). Les principales espèces de *Lactobacillus* utilisées comme probiotique sont *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*.... Par exemple, il existe des dizaines de souches de l'espèce *L. rhamnosus*, les plus connus étant : *L. rhamnosus* GG, GR-1, HN001, DR20, Lcr35.... Certaines de ces souches ont leur génome complet ayant été séquencé (Makarova et al., 2006). Les lactobacilles se retrouvent dans beaucoup de produits alimentaires fermentés. Le plus connu étant peut-être l'Actimel® dans lequel est retrouvée la souche probiotique *L. casei* DN-114 001. Le premier effet qui leur a été attribué est dû à la production d'acide lactique en métabolisant des sucres, ce qui rend l'environnement néfaste pour les pathogènes. Elles sont très utilisées en tant que probiotique car très résistantes à la digestion, elles restent donc viables dans le tube digestif, même s'il a été montré qu'elles étaient de passage et ne restaient pas dans le tractus digestif (Taverniti et al., 2014).

Le genre *Bifidobacterium* contient aussi des bactéries à Gram positif anaérobie productrices d'acide lactique. Elles sont commensales du tractus gastro-intestinal et en très faible quantité au niveau vaginal. De même, que pour les *Lactobacillus*, elles colonisent rapidement le tube digestif des nouveau-nés (Chen et al., 2007). Il existe de nombreuses espèces utilisées comme probiotique, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. animalis*, *B. longum*, *B. bifidum*....

Les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* sont des coques à Gram positif et font partie des bactéries productrices d'acide lactique. Certaines de ces espèces peuvent être très pathogènes alors que d'autres ont des propriétés probiotiques comme *E. durans* et *S. thermophilus* (Pieniz et al., 2013).

Le genre *Lactococcus* contient des bactéries à Gram positif productrice d'acide lactique. Elles aussi sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire. *L. Lactis* est la seule à avoir des propriétés probiotiques.

Le genre *Bacillus* contient des bactéries à Gram positif aérobie productrice d'acide lactique. *B. subtilis*, *B. coagulans* et *B. cereus* sont considérées comme des probiotiques.

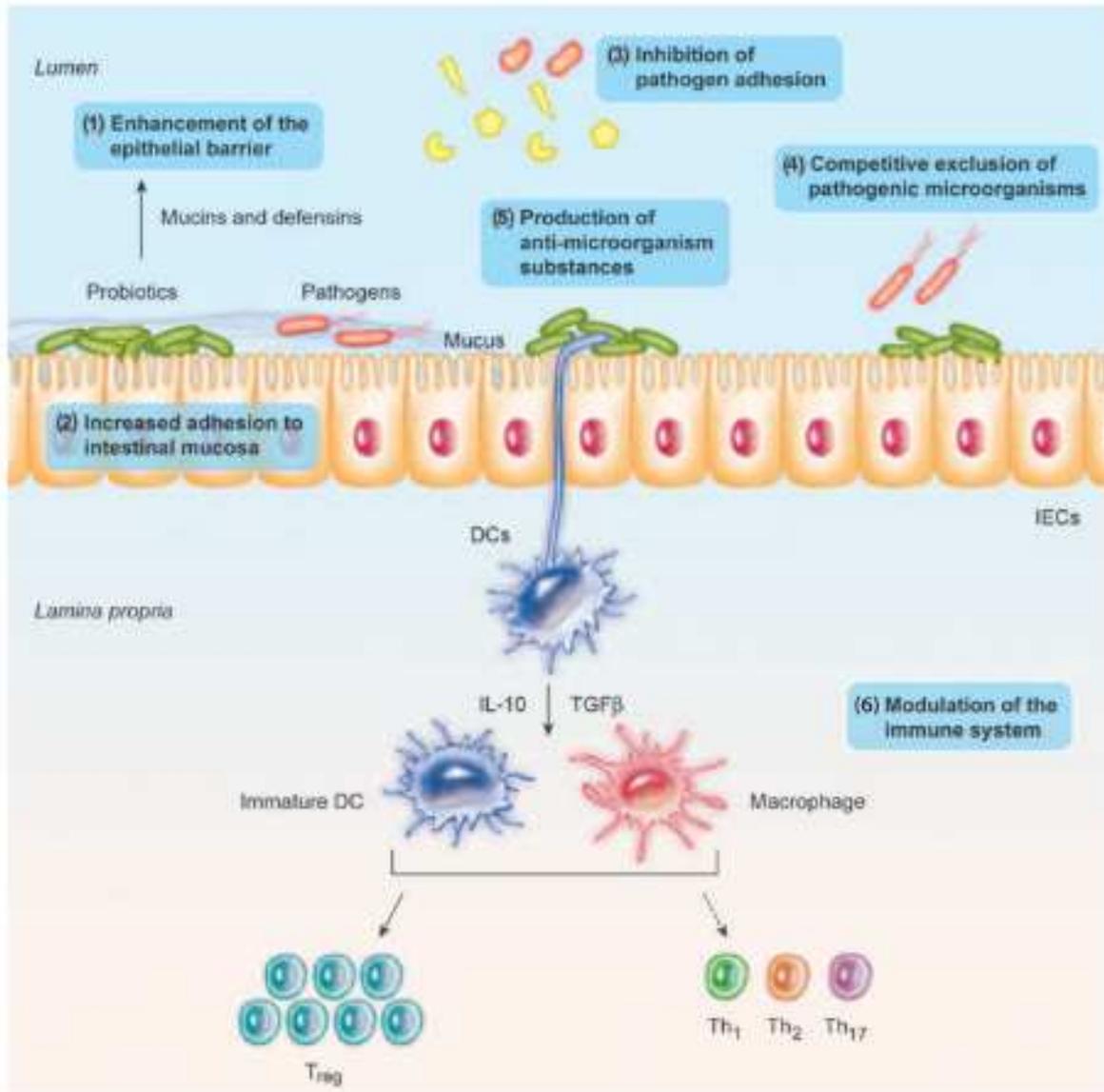


Figure 19. Mécanismes d'action des probiotiques (D'après Bermudez-Brito et al., 2010).

(1) Amélioration de la barrière épithéliale. (2) Augmentation de l'adhésion à la muqueuse intestinale. (3) inhibition de l'adhésion des pathogènes. (4) Exclusion par compétition des microorganismes pathogènes. (5) production de substances antimicrobiennes. (6) modulation du système immunitaire.

Le seul genre contenant des bactéries à Gram négatif ayant des effets probiotiques est le genre *Escherichia*, et le probiotique est celui cité précédemment, *E. coli* Nissle 1917.

Le genre *Saccharomyces* comprend des levures utilisées dans de nombreux breuvages alcooliques du à leur capacité de fermentation. Trois espèces principales existent *S. boulardii*, *S. cerevisiae* et *S. bayanus*. *S. boulardii* est la seule levure ayant obtenue une AMM indiquée dans le traitement des diarrhées post-antibiotique.

Il est maintenant établi que de très nombreux genres, espèces et souches peuplent l'intestin humain. L'importance des rôles de cette flore commensale croît d'années en années. En effet grâce à des techniques de génomique il est possible de connaître la composition du microbiote d'un individu. Il s'avère que pour des pathologies, certains genres ou espèces microbiens peuvent être absents du microbiote. Des équipes de recherche s'intéressent donc aux capacités de ces bactéries à la fois dans des études *in vitro* et lors d'études cliniques. Ceci pourrait permettre d'identifier dans le futur des probiotiques potentiels adaptés à des pathologies. C'est le cas de deux nouvelles souches identifiées dans la flore commensale de l'intestin. Elles montrent des effets importants dans des pathologies de par leur absence et sont étudiées depuis quelques années. Les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) et *Bacteroides fragilis* sont représentées en nombre dans l'intestin et ont des effets importants sur la réponse immunitaire (Ivanov and Manel, 2010). Connue depuis plus de cinquante ans, leur étude a été freinée par le fait que personne ne savait les cultiver. Depuis 2015, certains équipes ont l'équipement nécessaire pour les cultiver (Schnupf et al., 2015). *Faecalibacterium prausnitzii* est une bactérie commensale humaine retrouvée dans l'intestin de personnes saines. Elle a été identifiée lors d'études du microbiote de patients atteints de la maladie de Crohn. Il est absent du microbiote durant cette pathologie. Il a été montré des effets potentiels très intéressants dans le traitement de cette maladie (Martín et al., 2014).

2. Mécanismes d'action des probiotiques

2.1. Mécanismes d'action bactériologiques des probiotiques

Les mécanismes induisant un effet bénéfique des probiotiques pour la santé sont multiples induisant globalement un effet antagoniste vis-à-vis de microorganismes pathogènes (Figure 19).

Le renforcement de la barrière épithéliale. La barrière épithéliale est en contact permanent avec la flore et est une barrière mécanique imperméable permettant de protéger l'organisme de l'environnement extérieur. Lorsque cette barrière est altérée, des antigènes bactériens ou alimentaires peuvent pénétrer dans la sous-muqueuse, agresser le tissu, créer de la perméabilité membranaire et induire une inflammation. La consommation de probiotique peut préserver l'intégrité de la barrière épithéliale de différentes façons. Le mucus qui est sécrété par les cellules épithéliales est une barrière physique permettant d'éviter que les pathogènes ne se fixent aux cellules épithéliales, ne les dégradent et rendent la barrière épithéliale perméable (Bermudez-Brito et al., 2012). Certaines souches de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* peuvent augmenter l'expression de protéines présentes dans le mucus, les mucines comme MUC 2 et 3 *in vitro* dépendamment ou indépendamment de leur adhésion aux cellules épithéliales, et inhiber l'adhésion de pathogènes (Collado et al., 2005; Mack et al., 2003). Certaines souches peuvent stimuler l'expression de gènes codant pour des protéines, comme les occludines, pour réguler les jonctions serrées en prévention d'une altération, mais aussi pour réparer une barrière mucoale qui a été rendue perméable (Anderson et al., 2010; Dai et al., 2012; Stetinova et al., 2009). Ce mécanisme de réparation permet de réduire la translocation bactérienne intestinale.

Adhésion à la muqueuse intestinale. L'adhésion aux cellules épithéliales est un des critères de sélection primordial pour un probiotique. Comme nous venons de le mentionner, des souches de probiotiques peuvent induire la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales. Certaines souches ont à leur surface des adhésines permettant de se fixer sur cette couche de mucus (Buck et al., 2005; Van Tassel and Miller, 2011). Ces adhésines sont essentiellement des protéines mais aussi des sucres et des acides lipotéichoïques. Chaque souche possède différentes adhésines, comme les pili, permettant de se lier au mucus ou aux cellules épithéliales (Vélez et al., 2007). Par exemple, *L. reuteri* 1063 exprime les protéines MUB (Mucus Binding Protein) permettant de se fixer au mucus alors que *L. reuteri* 104R et *L. reuteri* 6475 expriment les protéines MapA (mucous Adhesion-promoting Protein) et cmbA (cell and mucus-binding protein A), respectivement, permettant de se fixer au mucus et à la lignée cellulaire Caco-2 (Jensen et al., 2014; Miyoshi et al., 2006; Roos and Jonsson, 2002). La souche *L. paracasei* BGSJ2-8 produit un exopolysaccharide EPS-SJ impliqué dans l'adhésion à des cellules épithéliales intestinales (Živković et al., 2016). De plus, le séquençage des bifidobactéries comme *B. animalis* indique qu'elles expriment dans leur génome de nombreuses protéines responsables de leur capacité d'adhésion à des Caco-2 (Zhu et al., 2016). Certaines protéines extracellulaires sécrétées par les probiotiques peuvent jouer un rôle dans leur interaction avec

l'épithélium et réguler l'adhésion de pathogènes (Sánchez et al., 2010). En effet, la protéine BIF (ETEC-binding inhibitory factor), sécrétée spécifiquement par *B. longum* inhibe l'adhésion d'*Escherichia coli* à la muqueuse intestinale (Fujiwara et al., 1999).

L'adhésion des probiotiques à la muqueuse intestinale permet de mettre en place une compétition pour les récepteurs en créant un encombrement stérique. Par exemple, il a été démontré *in vitro* que le *L. rhamnosus* ATCC 53103 pouvait inhiber l'infection par *E. coli* d'une lignée de cellules épithéliales grâce à sa capacité d'adhésion à ces cellules (Hirano et al., 2003). Les probiotiques induisent aussi un phénomène de compétition pour les nutriments présents dans la lumière intestinale. *E. coli* Nissle peut par exemple entrer en compétition avec *S. typhimurium* pour du fer (Deriu et al., 2013).

Sécrétion de composés antimicrobiens. Les acides lactiques et acétiques sont de puissants inhibiteurs des bactéries à Gram négatif et sont considérés comme les principales substances antimicrobiennes sécrétées par les probiotiques pour lutter contre des pathogènes (Alakomi et al., 2000; Keersmaecker et al., 2006; Makras et al., 2006; Russell and Diez-Gonzalez, 1997). La production d'acide lactique induit une baisse du pH du microenvironnement inhibant la croissance des pathogènes. Cette production induit aussi une diminution du pH intra-bactérien après que l'acide soit entré à l'intérieur de la bactérie, conduisant à la mort du pathogène (Jordan et al., 1999). Ces acides sont essentiellement sécrétés par les lactobacilles qui sont également capables de produire des bactériocines. Les bactériocines sont des peptides bioactifs ayant une activité antimicrobienne (Arqués et al., 2015). Les bactériocines que peuvent être la lactacine, la plantaricine et la nisine détruisent les pathogènes en formant des pores dans leur membrane et/ou en inhibant la synthèse de leur membrane (Hassan et al., 2012). Le biosurfactant qui est aussi sécrété par les probiotiques est un composé actif biologique ayant de fortes capacités à inhiber la formation de biofilms par des pathogènes (Rivardo et al., 2009; Rodrigues et al., 2004). Enfin, certaines souches de probiotique, essentiellement des lactobacilles sécrètent des composés antifongiques, comme l'acide phenyllactique (Magnusson and Schnürer, 2001; Prema et al., 2010).

Action sur le métabolisme énergétique par les acides gras à courte chaîne (AGCC) : Les AGCC sont produits dans le colon grâce à la fermentation des fibres présentes issues de l'alimentation. Le butyrate a des effets protecteurs contre les cancers colorectaux (Gonçalves and Martel, 2013). Il a été montré *in vitro* qu'une infection par *E. coli* entéropathogénique inhibait l'absorption du butyrate par les cellules épithéliales en altérant le transporteur MCT1 (Monocarboxylate Transporter 1) présent au pôle apical de la membrane (Borthakur et al.,

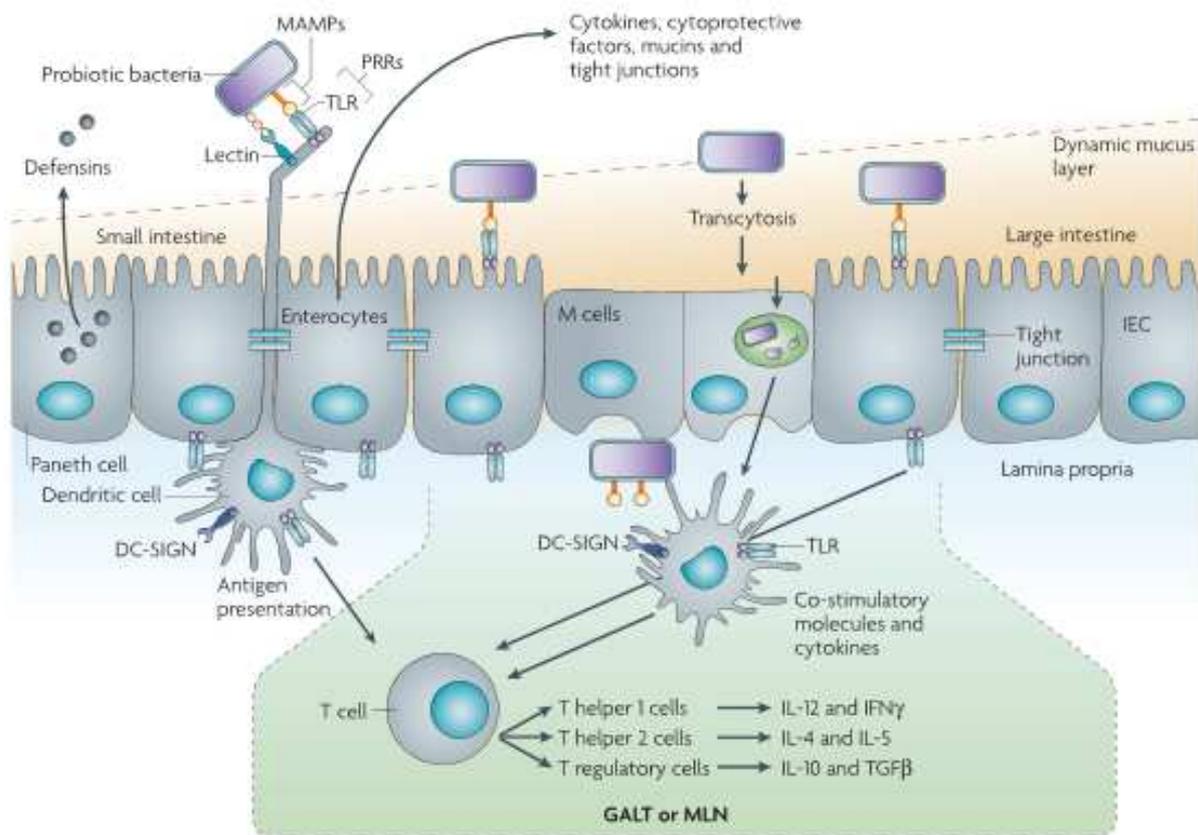


Figure 20. Interactions entre les probiotiques et les DC au niveau de la muqueuse intestinale (D'après Lebeer et al., 2010).

L'interaction peut se faire de trois manières. Les DC résidentes dans la *lamina propria* surveillent les antigènes bactériens présents dans la lumière du tube digestif en passant leurs dendrites entre les cellules épithéliales intestinales. Les DC peuvent aussi interagir avec les probiotiques après leur passage par les cellules M dans la *lamina propria*. Enfin, les entérocytes au contact des bactéries de la lumière intestinale activent les DC grâce à la sécrétion de diverses cytokines et chimiokines. L'interaction entre les PRR et les MAMP entraîne une réponse spécifique des DC et des lymphocytes T après présentation de l'antigène dépendante du probiotique capté.

2006). Récemment, il a été démontré que la prise de *L. acidophilus* 4357 pouvait contrecarrer l'inhibition induit par *E. coli* entéropathogénique (Kumar et al., 2015).

En plus des mécanismes sus-cités, il existe des mécanismes immunologiques impliqués dans les effets bénéfiques des probiotiques. Du fait de leur présence, même transitoire, au contact d'une muqueuse lors d'une prise, les probiotiques peuvent stimuler le système immunitaire, par contact entre MAMP et PRR entraînant la stimulation des cellules épithéliales et des DC qui peuvent alors rencontrer les Ly T. Nous allons détailler ce phénomène dans le paragraphe suivant.

2.2. Les mécanismes d'action immunologiques

Les cellules épithéliales des muqueuses intestinales et vaginales possèdent de nombreux PRR à leur surface leur permettant d'entrer en contact avec des probiotiques. Elles ont la capacité de sécréter des cytokines en fonction du microorganisme à leur contact, créant un microenvironnement inflammatoire ou tolérogène, modulant ensuite la réponse des cellules de l'immunité telles que les DC. Les DC, cellules sentinelles de l'immunité innée, peuvent être au contact de probiotiques présents dans la lumière grâce à de nombreux PRR, de trois manières : soit, directement grâce au déploiement de dendrites passant entre les cellules épithéliales, soit indirectement dans la *lamina propria* après transcytose de ces probiotiques au travers des cellules M, soit à travers les cellules épithéliales où les peptides peuvent se retrouver dans des exosomes (Lebeer et al., 2010) (Figure 20). Les réponses des DC et des Ly T sera alors souche-dépendante. Dans le paragraphe suivant seront cités les principaux PRR mis en jeu dans la reconnaissance des probiotiques.

2.2.1. Reconnaissance des probiotiques par les PRR

Les PRR les plus étudiés, sont les TLR, les CLR, les NLR et les RLR. Même s'ils sont souvent étudiés indépendamment, il faut considérer qu'ils fonctionnent de concert et de façon non isolés (Triantafilou et al., 2002). La plupart des probiotiques sont des lactobacilles à Gram positif avec une paroi classiquement composée de peptidoglycanes, de lipoprotéines, d'acides lipotéichoïques et de polysaccharides, autrement dit des MAMP (Delcour et al., 1999). Les lipoprotéines, les acides lipotéichoïques et les peptidoglycanes sont reconnus essentiellement

par le TLR 2 associé au TLR 1 ou 6. Ceci est conforté par de très nombreuses études montrant un effet de différentes souches de lactobacilles sur la réponse immunitaire de manière TLR 2 dépendante. Voici quelques exemples non exhaustifs de lactobacilles étudiés récemment activant la signalisation cellulaire *via* le TLR 2 des cellules épithéliales, des cellules dendritiques et aussi des macrophages.

Par exemple, *L. amylovirus* par la stimulation du TLR 2 de cellules intestinales, inhibe la stimulation de TLR 4 et l'effet pro-inflammatoire d'*Escherichia coli* enterotoxinogène (Finamore et al., 2014). *L. rhamnosus* GG augmente la survie des cellules des cryptes et diminue l'apoptose des cellules épithéliales de façon TLR 2/MyD88-dépendant, après irradiation de ces cellules (Ciorba et al., 2012). Ce probiotique, toujours dépendamment de TLR 2, protège des souris contre des colites induites par *Citrobacter rodentium* (Ryu et al., 2016). *L. acidophilus* induit une amélioration du fonctionnement des jonctions serrées de la barrière intestinale médiée par le TLR 2 et la kinase p38 (Al-Sadi et al., 2016). Enfin, il a été montré sur des lignées HEK *in vitro*, que six souches de lactobacilles, *L. plantarum* CCFM634, *L. plantarum* CCFM734, *L. acidophilus* CCFM137, *S. thermophilus* CCFM218, *L. fermentum* CCFM381 et *L. fermentum* CCFM787, activent les voies de signalisation du NF- κ B et de AP-1 de façon TLR 2-dépendante. Plus précisément, les cinq premières souches activent le dimère TLR 2/6 alors que le *L. fermentum* CCFM787 active à la fois le dimère TLR 1/6 et TLR 2/6 (Ren et al., 2015).

L. gasseri SBT2055 active la signalisation du TLR 2 dans des DC induisant la production d'IgA dans la lumière intestinale (Sakai et al., 2014). L'induction par *L. rhamnosus* JB1 de la sécrétion d'IL-10 et l'expression de FoxP3 de moDC est TLR 2-dépendante (Konieczna et al., 2015).

L. sakei K040706 augmente l'activité phagocytaire des macrophages et leur sécrétion de TNF- α *via* l'activation de TLR 2 (Jung et al., 2015). *L. rhamnosus* GR-1 stimule la production de G-CSF par les macrophages *via* TLR 2 (Meshkibaf et al., 2015).

L'autre genre prédominant de probiotiques est *Bifidobacterium*. Il a été démontré que ces probiotiques exercent leur effet plutôt anti-inflammatoire essentiellement par le TLR 2 (Hoarau et al., 2006; Konieczna et al., 2011; Moratalla et al., 2016; Scutto et al., 2014; Zeuthen et al., 2008).

TLR 2 est donc l'un des récepteurs primordial pour qu'agisse ces probiotiques. Leurs effets sur les cellules de l'immunité qui seront décrits dans les paragraphes suivants sont très variés.

De nombreuses études ont pu montrer une modulation importante de l'expression de TLR 4 induite par des lactobacilles (Liu et al., 2012; Peng and Jiang, 2014; Rizzo et al., 2013; Villena and Kitazawa, 2014). Cependant, à notre connaissance l'interaction directe entre un lactobacille et le TLR 4 n'a pas été clairement démontrée. Ce qui peut paraître logique puisque ce TLR interagit essentiellement avec le LPS des bactéries à Gram négatif. Néanmoins, une étude datant de 2016 a pu mettre en évidence l'interaction de *B. longum* subsp *infantis* avec les TLR 4 d'une lignée cellulaire intestinale fœtale dans un modèle d'entérocolite nécrosante (Meng et al., 2016). Le probiotique, *E. coli* Nissle 1917 est un bacille Gram négatif dont la paroi est différente des lactobacilles et des bifidobactéries. Elle contient des *pili* et du LPS connus pour se fixer au TLR 4 (Fischer et al., 2006; Grozdanov et al., 2002). Cependant, dans un modèle de colite induite chez la souris, il a été montré des effets bénéfiques d'*E. coli* Nissle 1917 de façons TLR 4 et TLR 2-dépendantes (Grabig et al., 2006). Ce probiotique peut donc aussi se fixer sur TLR 2, et avoir des effets *via* le TLR 2 (Sturm et al., 2005). Un effet protecteur contre des allergies a été montré, cet effet étant TLR4 dépendant (Adam et al., 2010).

E. coli Nissle 1917, est une bactérie flagellée. Ces flagelles sont connus pour se fixer au TLR 5 (Hayashi et al., 2001). Les flagelles de ce probiotique induisent l'expression de β -défensine 2 par les cellules épithéliales de l'intestin humain (Schlee et al., 2007). Ceci n'a pas été vérifié, mais il est logique de supposer que cette action s'effectue de façon TLR 5-dépendante.

Le TLR 9 reconnaît les motifs CpG caractéristiques de l'ADN viral ou bactérien. Les probiotiques peuvent relâcher de l'ADN non-méthylé contenant des motifs CpG ayant la capacité de se fixer au TLR 9 des cellules épithéliales. Les lactobacilles ont des motifs CpG divers et leur capacité à stimuler le TLR 9 est différente selon les souches (Hemmi et al., 2000). De plus, la localisation du TLR 9 sur des cellules épithéliales intestinales polarisées joue sur la signalisation en aval du récepteur. En effet, un probiotique capté au pôle apical d'une cellule épithéliale par le TLR 9 va prévenir l'activation du NF- κ B en bloquant la dégradation d'I κ B alors qu'une stimulation du TLR 9 basolatéral active la voie du NF- κ B (Lee et al., 2006). Il a été montré que de l'ADN de *L. rhamnosus* GG et de *B. longum* mis au contact des cellules T84 et HT29 polarisées augmente l'expression de TLR 9 sur ces cellules et que la stimulation apicale de TLR 9 avait un effet anti-inflammatoire en inhibant l'expression de TNF- α et d'IL-8 médiée par le NF- κ B (Ghadimi et al., 2010). La stimulation de PBMC par deux lactobacilles (*L. rhamnosus* NumRes 1 et *L. casei* DN-114-001) et une bifidobactérie (*B. breve* NumRes 204) a induit une sécrétion de cytokines, à la fois d'IFN- γ et d'IL-10, médiée par le TLR 9 (Plantinga et al., 2011). Enfin, il a été montré que la signalisation par le TLR 9 était essentielle au

probiotique VSL#3 pour exercer ses effets anti-inflammatoires dans un modèle expérimental de colite murin (Rachmilewitz et al., 2004).

Il existe une autre famille de récepteurs présents dans le cytoplasme des cellules épithéliales mais aussi des DC, les NLR. NOD 1 et NOD 2 sont les plus représentés. NOD 1 reconnaît le peptidoglycane de bactéries à Gram négatif alors que NOD 2 qui est moins ubiquitaire reconnaît une plus large gamme de bactéries (Biswas et al., 2012). Il existe peu d'études montrant l'effet de probiotiques de façon NLR-dépendante. Cependant, il semblerait que certaines souches peuvent avoir une action défensive contre les infections *via* NOD 2. En effet, le *L. plantarum* BAA-793, *via* NOD 2 en partenariat avec le TLR 2 contribue à la défense de l'hôte lors d'une infection pneumovirale (Percopo et al., 2015; Rice et al., 2016). *L. salivarius* 33 induit la sécrétion d'IL-10 responsable de la production de Treg grâce à un mucopeptide additionnel présent sur la membrane en plus des peptidoglycanes. Le mucopeptide est reconnu par NOD 2 (Fernandez et al., 2011). NOD 2 seul n'aurait pas d'effet sur les DC, mais il en a un, lorsqu'il est en synergie avec les TLR (Wells, 2011).

Enfin, concernant les CLR, le plus étudié est le DC-SIGN. Le premier ligand du DC-SIGN présent à la surface des cellules dendritiques a été identifié sur le *L. acidophilus* NCFM : le SlpA (Surface layer protein A). Il est impliqué dans la modulation de fonctions des cellules dendritiques et des Ly T (Konstantinov et al., 2008). Le SlpA a aussi été isolé de *L. helveticus* M92, ce qui permet à ce probiotique de jouer un rôle dans la compétition d'exclusion de pathogènes (Beganović et al., 2011). De plus, le DC-SIGN est nécessaire pour la fixation de certains probiotiques sur des moDC, comme le *L. rhamnosus* JB-1 (Konieczna et al., 2015). Tous les probiotiques ne se fixent pourtant pas forcément sur le DC-SIGN, en effet, il a été montré que le *L. plantarum* NIZO B253 ne se fixe pas au DC-SIGN à l'inverse des *L. casei* NIZO B255 et *L. reuteri* ASM20016 (Smits et al., 2005). Cependant, une étude datant de 2010 montre qu'une autre souche de *L. plantarum*, la CGMCC 1258 utilise le DC-SIGN pour entrer en interaction avec les DC (Liu et al., 2011). Ces études indiquent, une nouvelle fois, que l'effet de probiotiques sur le système immunitaire est tout à fait souche-dépendant.

Les probiotiques peuvent donc entrer en contact avec différents récepteurs présents à la surface des cellules épithéliales mais aussi des DC. Cependant, deux probiotiques se fixant sur le même récepteur peuvent avoir des effets différents sur la réponse immunitaire. Ceci peut-être dû à la concentration de probiotiques stimulant les PRR, mais aussi à la coopération entre les différents PRR impliqués.

2.2.2. Effet des probiotiques sur les cellules dendritiques

Comme nous venons de le mentionner, les probiotiques se fixent sur des PRR en fonction de leur espèce et de leur souche. Les PRR sont présents, entre autre, à la surface des DC. Les probiotiques induisent donc des réponses différentes des DC en fonction des PRR mis en jeu. En réponse à cette stimulation des PRR, les DC mûrissent, migrent vers les ganglions lymphatiques, sécrètent différentes cytokines pro ou anti-inflammatoires, et rencontrent les Ly T naïfs. Dépendamment des cytokines sécrétées, les Ly T naïfs vont se polariser en l'une des sous-populations de Ly T, les Ly Th1, Th2, Th17 ou Treg apportant une réponse spécifique aux antigènes captés. Ainsi, les probiotiques ont des effets souches-dépendants, que nous allons démontrer ici.

Il existe de nombreuses études traitant de l'effet d'une souche particulière de probiotique sur les DC. Cependant, il existe de nombreuses différences de méthodologies entre ces études. En effet, certaines études portent sur des DC murines, d'autres sur des DC *in vitro* (moDC (DC dérivés de monocytes), cDC, pDC) humaines. Or chaque sous-population de DC peut répondre différemment, car elles n'expriment pas tout à fait les mêmes PRR. De plus, dans ces études, certaines sont effectuées avec des probiotiques vivants, d'autres ont été inactivés par la chaleur ou par des UV. Ici, nous allons présenter quelques exemples de probiotiques ayant des effets divers sur la maturation et la sécrétion de cytokine des DC.

Tout d'abord, La grande majorité des probiotiques semblent avoir des effets plutôt pro-inflammatoires induisant la sécrétion de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IFN- γ . Par exemple, au contact de moDC, c'est le cas des souches *L. helveticus* DSM 13137, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* DSM 18891, *S. thermophilus*, *B. animalis* subsp. *Lactis* DSM 15954 et *B. breve* DSM 13692 (Latvala et al., 2008). Dans une autre étude, toujours sur des moDC, il a été montré que *L. johnsonii*, *L. gasseri* et *L. reuteri* sécrétaient de l'IL-12 et pas d'IL-10 (Mohamadzadeh et al., 2005). De même pour *L. acidophilus* X37 et *L. paracasei* Z11 qui sécrètent de l'IL-12 et du TNF- α (Zeuthen et al., 2006). Le *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* FC et le *L. acidophilus* NCFM ont de fortes capacités à induire la sécrétion de l'IL-12 par les DC humaines (Amar et al., 2015; Kosaka et al., 2012). Le probiotique *L. casei* DN-114 001, que l'on retrouve dans l'actimel, augmente la sécrétion d'IL-12 par des moDC.

A l'inverse, certains probiotiques peuvent avoir des effets anti-inflammatoires. Le surnageant de culture de *B. breve* C50 (BbC50sn) induit une importante maturation des moDC, comme le

LPS. Cette maturation est suivie d'une sécrétion importante d'IL-10 et faible d'IL-12 (à l'inverse d'une stimulation au LPS) (Hoarau et al., 2008). Dans une autre étude, *B. infantis* 35624 induisait une sécrétion importante d'IL-10 et pas d'IL-12 (O'Mahony et al., 2005). En 2006, il a été montré que cinq souches de bifidobactéries stimulaient la sécrétion d'IL-10 par des moDC : *B. bifidum* S131, *B. lactis* Bb12, *B. longum* Q45, *B. longum* Q46 et *B. bifidum* Z9 (Zeuthen et al., 2006). D'autres espèces de probiotiques peuvent aussi avoir un effet anti-inflammatoire, c'est le cas de *S. boulardii*. Le surnageant de *S. boulardii* au contact de cDC humaine inhibe leur maturation induite par du LPS, diminue l'expression de CCR7 (récepteur de chimiokine présent sur les DC matures), diminue la sécrétion d'IL-6 et de TNF- α et augmente la sécrétion d'IL-10 (Thomas et al., 2009). Cette étude comparée à d'autres n'étudie pas l'effet direct du surnageant sur les DC immatures mais analyse son effet lors d'une stimulation forte induite par le LPS. Le probiotique VSL#3 semble avoir des effets tolérogènes. Ce probiotique est constitué de 8 souches différentes, 4 lactobacilles, 3 bifidobactéries et un streptocoque. Il semble stimuler la production d'IL-10 et inhiber fortement la production d'IL-12 par des cDC et des pDC. De plus, une stimulation de ces cellules avec le VSL#3 en concomitance à l'exposition avec du LPS ne modifie pas le profil de sécrétion de ces deux cytokines (Hart et al., 2004). Dans cette même étude, les différentes souches composant le probiotique ont été testées individuellement. Il s'avère que les souches productrices d'IL-10 sont les trois bifidobactéries, *B. longum* Y10, *B. infantis* Y1 et *B. breve* Y8. Une autre étude portant sur des DC dérivés de la moelle osseuse de souris montre une augmentation de sécrétion d'IL-10 mais pas d'IL-12 induite par le VSL#3 (Drakes et al., 2004). Plus récemment, de nombreuses études ont pu mettre en exergue le rôle de nombreux lactobacilles dans l'induction de tolérance médiée par les DC humaines et murines, et la sécrétion d'IL-10. C'est le cas du *L. crispatus* SJ-3C-US, *L. gasseri* OLL2809, *L. sakei* K17, *L. curvatus* WiKim38, *L. paracasei* L9 et *L. rhamnosus* OLL2838 (Aoki-Yoshida et al., 2016; Eslami et al., 2016; Eun et al., 2016; Jo et al., 2016; Ogita et al., 2015; Yang et al., 2015). Enfin, *F. prausnitzii* A2-165 a de fortes capacités à induire de l'IL-10 par des DC à la fois humaines et murines (Rossi et al., 2016).

Ces probiotiques, grâce à l'induction d'IL-10, ont donc des capacités à induire des DC tolérogènes qui apporteront une réponse anti-inflammatoire après contact avec le probiotique, comme nous le décrivons dans le paragraphe suivant (Cf 2.2.3.).

Les capacités de chaque souche à sécréter des cytokines anti ou pro-inflammatoires comme l'IL-10 et l'IL-12 est important cliniquement. L'analyse de la balance IL-10/IL-12 permet d'effectuer un screening *in vitro* pour sélectionner des souches de probiotiques en fonction des

besoins. En effet, selon la réponse apportée par un probiotique son utilisation sera plus adaptée dans telle ou telle pathologie dysimmunitaire, en fonction du profil des sous-populations de Ly T générés ultérieurement.

Il n'est cependant pas possible de classer tous les probiotiques en tant que inflammatoire ou tolérogène à partir d'études *in vitro* car elles sont insuffisantes. Certaines souches de probiotiques vont être globalement immunostimulantes. C'est-à-dire qu'elles vont sécréter en grande quantité toutes les cytokines dosées, aussi bien les pro-inflammatoires que les anti-inflammatoires. Il est alors délicat de dire si leurs effets *in vivo* seront plus inflammatoires ou tolérogènes. L'étude *in vitro* de la sécrétion de cytokines par les DC n'est alors pas suffisante. C'est le résultat obtenu dans plusieurs études avec des souches comme *L. acidophilus* NCFM, *L. lactis* MG1363, *E. coli* TG1, *E. coli* Nissle, *L. fermentum* ACA-DC198, *B. breve* BBSF, *B. infantis* B107 et *Enterococcus faecalis* CECT7121 (Cross et al., 2004; Foligne et al., 2007; Helwig et al., 2006; Molina et al., 2015; Zoumpopoulou et al., 2009). Dans ces cas-là, il y a la nécessité d'aller vérifier les sous-populations générées au niveau lymphocytaire.

Le probiotique VSL#3, a été considéré comme tolérogène au début de ce paragraphe suite à la publication de Drake *et al.*, en 2004. Cependant, une autre équipe a publié une étude en 2003, dans laquelle ils ont dosé d'autres cytokines comme l'IL-6 et l'IL-1 β . Les résultats ont montré que la quasi-totalité des souches présentes dans ce cocktail de probiotiques pouvait induire la sécrétion de ces deux cytokines par des PBMC (Lammers et al., 2003). Il est donc difficile de conclure d'un effet tolérogène dans ces conditions. De plus il a été montré en 2015, que VSL#3 pouvait avoir des effets anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires en fonction du modèle murin utilisé (Mariman et al., 2015). Ceci indique que l'effet des probiotiques est souche-dépendant mais aussi dépendant du contexte génétique de l'hôte.

A l'inverse, certaines souches de probiotiques sécrètent très peu de cytokines qu'elles soient pro ou anti-inflammatoires. C'est le cas par exemple des deux lactobacilles, *L. salivarius* 33, *L. rhamnosus* 32 et *L. casei* shirota (Cross et al., 2004; Foligne et al., 2007; Zoumpopoulou et al., 2009).

Enfin, Christensen *et al.*, en 2002 ont démontré que dans un mélange de probiotiques, un probiotique faible sécréteur d'IL-12, *L. reuteri* DSM12246, pouvait inhiber la sécrétion d'IL-12 induite par *L. casei* subsp. *alactus* CHCC3137, fort sécréteur d'IL-12, sans modifier la sécrétion de l'IL-10 induite par ce dernier (Christensen et al., 2002). Plus récemment, une seconde souche de *L. reuteri* (5289) a montré qu'elle était capable d'inhiber la production d'IL-

12 induite par le *L. acidophilus* NCFM (Amar et al., 2015). Ces études montrent, une des limites des modèles *in vitro*. En effet, au contact d'autres bactéries probiotiques, un probiotique peut avoir un comportement différent que lorsqu'il est étudié tout seul.

2.2.3. Expansion clonale et prolifération lymphocytaire

En plus de polariser les LyT, les probiotiques vont être capable de moduler l'expansion clonale induite par des stimuli exogènes. Durant les études *in vitro* analysant la prolifération lymphocytaire induite par un stimulus exogène, souvent un mitogène, le probiotique peut augmenter la prolifération, l'inhiber, ou alors n'avoir aucun effet. De nombreuses études indiquent que les probiotiques ont tendance à inhiber la prolifération induite par un stimulus. Les mitogènes utilisés sont généralement des lectines d'origine végétale comme la phytohémagglutinine A (PHA) et la concanavoline A (ConA). L'ARN du probiotique *L. gasseri* OLL2809, induit l'inhibition de prolifération de Ly TCD4 murins stimulés à l'ovalbumine. De plus cette inhibition est dose-dépendante (de 0.01 µg/mL à 10 µg/mL) (Yoshida et al., 2011). Sur des lignées de cellules humaines issues de lymphomes, les Jurkat et les cellules BJAB, le *L. helveticus* SBT2171 inactivé par la chaleur inhibe la prolifération induite par le LPS. L'analyse du cycle cellulaire a montré que les cellules BJAB traitées par *L. helveticus* SBT2171 étaient majoritairement arrêtées à la phase G2/M. Ceci a été expliqué par une diminution de la phosphorylation de JNK et de c-Jun. Cette voie régule l'expression de CDC2 (Cell Division Cycle 2), un facteur essentiel à la progression du cycle cellulaire après la phase G2/M. Lorsque les cellules BJAB sont traitées au *L. helveticus* SBT2171 l'expression de CDC2 est inhibée (Hosoya et al., 2014). Dans une étude publiée en 2011 par Li *et al.*, il a été étudié deux mélanges de deux probiotiques à concentration équivalente, le *L. acidophilus* 1748 avec le *B. bifidum* 1453 (Probiotique 1) et la combinaison *L. acidophilus* 1748 avec le *B. infantis* ATCC 1567 (Probiotique 2), dans le but d'identifier leurs effets sur la prolifération lymphocytaire induite par de la PHA et de la ConA. Pour cela ils ont utilisé plusieurs concentrations des deux mélanges de probiotiques au contact de PBMC (MOI (Multiplicité d'infection) : 0.1, 0.5, 1 et 2). Dans cette étude ils ont pu montrer que les deux mélanges de probiotiques inhibent la prolifération lymphocytaire induite par la PHA et par la ConA de la MOI 0.5 à la MOI 2, de façon dose-dépendante. De plus, ils ont montré que l'action des deux mix de probiotiques s'effectue par le blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Li et al., 2011).

2.2.4. Orientation de la réponse lymphocytaire T par les probiotiques

Les DC par le biais de leur sécrétion de cytokines, polarisent la réponse lymphocytaire T. L'activation des sous-populations de lymphocytes T par les probiotiques est importante à déterminer pour avoir une idée de l'impact que pourrait avoir un probiotique sur certaines pathologies qu'il est possible de traiter avec des probiotiques, comme les infections entériques, les MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), les maladies autoimmunes et allergies (Cf 2.3).

La balance Th1 versus Th2 : Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, de nombreuses souches de probiotiques, et particulièrement de lactobacilles, sont de forts inducteurs d'IL-12, or l'IL-12 est la cytokine principale orientant les Ly T naïfs vers les Ly Th1. Dans ces modèles *in vitro*, les probiotiques sont alors identifiées comme pro-Th1. Comme cela a été mentionné dans le premier chapitre de ce manuscrit, il y a un effet antagoniste entre l'IL-12 et l'IL-4, chacune étant représentative des Th1 et des Th2, respectivement. Une forte sécrétion de l'IL-12, suppose donc une déviation de la réponse lymphocytaire vers les Th1, inhibant la réponse de type Th2 (Feili-Hariri et al., 2005). De nombreux exemples de probiotiques induisant la sécrétion d'IL-12 ont été donnés précédemment. Ici, nous prenons l'exemple du *L. rhamnosus* GG, qui est l'un des lactobacilles les plus étudiés. Ces études ont pu montrer sa capacité à induire la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques et à inhiber la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5, à la fois par la bactérie elle-même (à faible et forte dose) ou par les facteurs solubles se trouvant dans le surnageant de culture dans des modèles de moDC et de PBMC (Cai et al., 2016; Fong et al., 2015, 2016; Ghadimi et al., 2008). Il existe peu d'études au sujet de l'effet potentiellement pro-Th2 de certaines souches. Ceci s'explique par le fait que de nombreuses recherches concernant la réponse immunitaire associée à la prise de probiotique s'effectuent dans le cadre de la lutte contre les maladies allergiques Th2-dépendante. Dans ces études, le but est d'inhiber cette réponse Th2, en favorisant les Ly Treg ou les Ly Th1 (Cf 2.3.4). Une équipe a pu montrer que la consommation de *L. plantarum* par des souris pouvait augmenter la sécrétion d'IL-4 et diminuer la sécrétion d'IL-12 dans les splénocytes, favorisant le profil Th2 (Hong et al., 2014).

L'orientation vers les Ly Th17 : Les Ly Th17 sont très importants dans l'homéostasie du tube digestif. La balance Treg/Th17 est finement régulée par les interactions entre la flore commensale intestinale et les cellules immunitaires du tube digestif. Les DC stimulées par des probiotiques sont-ils capables d'induire une réponse de type Th17 ? Les études à ce sujet ont

débuté vers la fin des années 2010. Il a été montré *in vitro* que quatre souches de *B. bifidum* (IF, 10/10, A8 et L22) étaient capables d'induire la sécrétion d'IL-17 par des PBMC (López et al., 2010, 2011). Le *L. johnsonii* N6.2 est lui aussi capable d'induire des Th17, ceci ayant un effet bénéfique dans le diabète de type 1 (Lau et al., 2011). *L. casei* BL23 augmente l'expression de cytokines pro-Th17 et régule les Ly Treg en induisant des Th17. Ceci a un intérêt dans des modèles murins de cancer colorectal, mais également dans les réponses anti-infectieuses (Lenoir et al., 2016). Les études portant sur les SFB se multiplient ces dernières années. De très nombreux résultats indiquent que les SFB ont de fortes capacités d'induction des Th17 (Goto et al., 2014; Ivanov and Manel, 2010; Kumar et al., 2016; Sano et al., 2016; Schnupf et al., 2015; Yang et al., 2014). Enfin, *B. adolescentis*, une bactérie commensale de l'intestin peut induire des Th17 chez la souris mais n'induit pas d'inflammation intestinale, ni d'inflammation systémique (Tan et al., 2016).

Cependant, la plupart des probiotiques étudiés inhibent les Th17 en induisant des Treg.

L'induction de Ly Treg : Ils ont un rôle primordial dans le contrôle de pathologies dysimmunitaires. De nombreuses applications pour ce type de probiotique pourraient être développées, c'est pourquoi, les recherches portant sur des probiotiques ayant des effets tolérogènes sont très intenses depuis quelques années. Il a été montré *in vitro* sur des moDC que l'interaction avec le DC-SIGN de *L. reuteri* ASM20016 et de *L. casei* NIZO B255 promouvait des DC tolérogènes induisant des Ly Treg dont l'apparition était médiée par l'IL-10 (Smits et al., 2005). De la même manière, *B. bifidum* W23 induisait des DC tolérogènes permettant la différenciation des Ly T en Ly Treg produisant de l'IL-10 (Niers et al., 2007). Une mixture contenant cinq probiotiques, IRT5, favorisait l'apparition de DC régulatrices murines et induisait la prolifération de Ly Treg CD4⁺ CD25⁺ (Kwon et al., 2010). La consommation de *B. infantis* 35624 par des Hommes permet d'augmenter la présence d'IL-10 ainsi que l'expression de FoxP3 dans le sang périphérique (Konieczna et al., 2011). Plus récemment il a été montré que *L. crispatus* SJ-3C-US, un commensal vaginal, induisait la production d'IL-10 et l'apparition de Treg (Eslami et al., 2016). La production de Treg permet de lutter contre différentes pathologies liées à la production de Ly Th1, Th2 ou Th17 en trop grande quantité. Par exemple, lors de maladies inflammatoires de l'intestin, le ratio IL-10/IL-12 est faible, il y a donc une majorité de Ly Th1 inflammatoires. Le mélange VSL#3 qui induit de l'IL-10 tout en inhibant la production d'IL-12 par des DC inhiberait donc cet effet inflammatoire et pourrait avoir un rôle dans ce type de pathologies (Hart et al., 2004). C'est également le cas des deux souches *B. animalis* et *B. adolescentis* induisant une sécrétion

importante d'IL-10 et peu d'IL-12 (Baba et al., 2008). L'allergie respiratoire ayant un profil de type Th2, pourrait être diminuée grâce à la prise de *L. reuteri* ATCC 23272, en inhibant les cytokines IL-5 et IL-13 et en induisant de l'IDO (Indoleamine 2-3, dioxygénase), une enzyme qui est impliquée dans le métabolisme du tryptophane, qui est anti-inflammatoire (Forsythe et al., 2007). De même que pour la dermatite atopique qui est une pathologie ayant un profil pro-Th2. Il a été montré dans un modèle murin de dermatite atopique, que le probiotique *Weissella cibaria* WIKIM28 induit une augmentation de la proportion des Ly Treg dans les ganglions lymphatiques mésentériques (Lim et al., 2017). Enfin, de nombreuses études s'intéressent à la production de Treg dans le cadre d'une colite induite dans un modèle murin mimant les MICI Th17-dépendantes. Dans ces modèles, *B. longum* JCM122 *B. breve* NumRes 204 et *B. infantis* ont la capacité d'inhiber la production d'IL-17 et d'augmenter la sécrétion d'IL-10 (Miyachi et al., 2013; Tanabe et al., 2008; Zheng et al., 2014; Zuo et al., 2014). *Bacteroides fragilis*, une bactérie commensale de l'intestin a aussi montré de fortes capacités à induire des Treg et à traiter une colite induite chez des souris (Furusawa et al., 2015; Nutsch and Hsieh, 2012; Round and Mazmanian, 2010). Toujours, dans ces modèles murins, *F. prausnitzii* montre de fortes capacités à induire de la tolérance et des Ly Treg, faisant de cette bactérie un candidat potentiel dans l'indication du traitement de la maladie de Crohn (Qiu et al., 2013).

2.2.5. Effets des probiotiques sur les autres cellules de l'immunité

Bien que nous nous soyons focalisés au cours de ce travail sur l'effet des probiotiques sur les DC et les Ly T, les probiotiques agissent aussi sur d'autres cellules de l'immunité dont voici quelques exemples.

Les cellules NK : Les probiotiques peuvent stimuler l'activité des cellules NK. Ceci a par exemple été montré dans une étude clinique sur des patients âgés consommant du lait supplémenté avec deux souches de probiotique, le *L. rhamnosus* HN001 et le *B. lactis* HN019. Une consommation pendant 3 semaines de ce lait a eu pour conséquence d'augmenter la proportion de cellules NK CD56⁺ dans la circulation sanguine tout en augmentant leur activité anti-tumorale chez les sujets de plus de 70 ans (Gill et al., 2001). Dans un modèle murin, le même effet a été identifié par l'ajout du *L. casei* Shirota ou d'extraits de produits métaboliques du *Bacillus subtilis* AK (Takagi et al., 2001; Takeda et al., 2016). Une étude clinique plus récente, dans laquelle les sujets ont consommé du yaourt supplémenté avec le *L. gasseri* SBT2055 et le *B. longum* SBT2928 pendant 12 semaines a vu une augmentation de l'activité

des NK accompagnée d'une diminution du stress (dosage de l'hormone corticotrope et du cortisol (Nishihira et al., 2014).

Les cellules NKT : L'effet de probiotiques sur les NKT a été testé par deux études dans un modèle murin de stéatose non alcoolique. Dans cette pathologie la population de NKT présente dans le foie est diminuée. L'ajout de VSL#3 ou de *B. infantis* permettrait d'augmenter le nombre de NKT et de stimuler leur activité. L'ajout de ces probiotiques seraient donc bénéfique dans cette pathologie (Liang et al., 2013; Ma et al., 2008).

Les ILC : Les ILC étant une population cellulaire décrite récemment, il existe encore peu d'études concernant les effets de probiotiques sur leur activité. Dans un modèle murin, il semblerait que *L. rhamnosus* JB1 augmente les ILC3 et prolonge la survie des souris lors d'une infection par *S. typhimurium* (Mian et al., 2016).

Réponse humorale et sécrétion d'IgA : Les IgA sécrétoires ont un rôle de défense majeur dans l'intestin. La prise de *Bacillus subtilis* CU1 chez des sujets a eu pour incidence d'augmenter la concentration d'IgA au niveau fécal mais aussi salivaire. Cette étude a montré une diminution des infections respiratoires dans le groupe probiotique (Lefevre et al., 2015). Au niveau mécanistique, il a été démontré que le *L. gasseri* SBT2055 induisait la sécrétion de TGF- β , de BAFF (B-cell activating factor), d'IL-6 et d'IL-10 par des DC par l'intermédiaire du TLR 2. Ces cytokines sont essentielles pour la production d'IgA par les Ly B (Sakai et al., 2014). Dans cette même étude, le dosage des IgA confirme l'augmentation de sa concentration dans le surnageant de culture de cellules B traitées par ces cytokines. D'autres probiotiques ont été testés (*L. gasseri* JCM1131, *L. helveticus* SBT2171 et *L. acidophilus* SBT2062), mais n'avaient pas d'effets sur la production d'IgA, indiquant là aussi, un effet souche-dépendant (Sakai et al., 2014). Les SFB, au contact de la lamina propria d'un intestin de souris induisent la sécrétion d'IgA (Lécuyer et al., 2014).

Activation des voies du complément : Une étude datant de 2016 a pu montrer que les acides lipotéichoïques du *L. plantarum* K8 pouvaient inhiber la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF α et IFN- γ) grâce à l'inhibition de la synthèse de C3 (protéine jouant un rôle dans les trois voies) dans le sérum (Jeon et al., 2016).

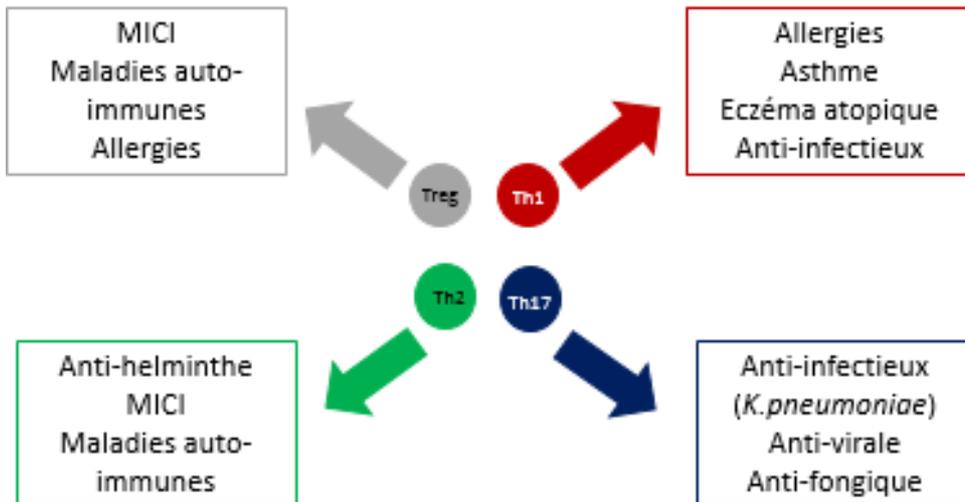


Figure 21. Efficacité potentielle des probiotiques dans le traitement de différentes pathologies dysimmunitaires en fonction des sous-populations lymphocytaires induites.

2.3. Effets bénéfiques des probiotiques dans différentes situations pathologiques

Les probiotiques ont de nombreux mécanismes d'action, que ce soit bactériens ou immunologiques et nous avons vu que chaque souche peut avoir un effet qui lui est propre. Comme nous venons de le décrire dans les paragraphes précédents, les probiotiques peuvent être captés, internalisés et dégradés en peptides par les DC d'une muqueuse. En fonction de ce probiotique, les DC sécrètent alors des cytokines anti- ou pro-inflammatoires permettant la polarisation des lymphocytes T naïfs en sous-population Th1, Th2, Th17 ou Treg. Cette polarisation est spécifique du probiotique capté. Ces souches de probiotique seules, ou en association avec d'autres souches peuvent donc être intéressantes pour lutter contre certaines infections ou maladies dysimmunitaires en contrecarrant le profil de la réponse immunitaire propre à ces pathologies. Par exemple, lors d'une pathologie induisant des Ly Th1 ou des Th17, il pourrait être intéressant d'utiliser des probiotiques permettant la production de Ly Treg pour contrecarrer l'effet inflammatoire provoqué par la pathologie en question (Figure 21).

2.3.1. Les maladies infectieuses

Les maladies infectieuses induisant des diarrhées sont responsables d'une forte mortalité dans le monde chez les jeunes enfants. C'est pourquoi de nombreuses équipes ont effectuées des essais cliniques pour analyser l'efficacité des probiotiques dans le traitement des diarrhées aiguës. De nombreuses études ont été effectuées *in vitro* dans le but d'identifier des souches pouvant avoir un effet bénéfique sur des pathogènes responsables d'infections comme *S. typhimurium* (Dunne et al., 2001). Dans ce contexte, les souches *L. johnsonii* La1, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* GR1, *L. casei shirota*, *L. casei* DN-114001 et *L. casei* GG ont montré des effets antagonistes contre ce pathogène. Le grand nombre de résultats obtenus *in vivo* a permis de conclure dans une base Cochrane datant de 2010 que l'utilisation de probiotiques lors de diarrhées était sans danger et avait un effet clair sur la réduction de la durée et de la fréquence des diarrhées infectieuses, en complément d'une réhydratation (Allen et al., 2010). Cependant, toutes les souches ne sont pas efficaces dans ce type de traitement. Il a été montré que les souches les plus efficaces seraient les *S. boulardii* et *L. rhamnosus* GG (Dinleyici et al., 2015; Guarino et al., 2015). A l'inverse, par exemple, une souche de *L. reuteri* DSM 17938 n'avait pas d'effet sur la durée de la diarrhée (Wanke and Szajewska, 2012).

Un traitement antibiotique en dégradant la flore intestinale peut induire des diarrhées post-antibiotiques. Étudié depuis de nombreuses années, l'effet des probiotiques contre les diarrhées post-antibiotiques fait l'œuvre de plusieurs méta-analyses très récentes indiquant que certaines souches peuvent avoir un effet positif sur ces diarrhées et diminuer la survenue des infections à *Clostridium difficile* (Gao et al., 2010; Hayes and Vargas, 2016; Hickson et al., 2007; Lau and Chamberlain, 2016; Valdés-Varela et al., 2016). Parmi ces souches, *S. boulardii* est l'une des seules à avoir obtenu une AMM dans cette indication (Ultra levure®) avec le Lcr35, sujet de cette étude dont nous reparlerons dans le paragraphe suivant (Cf 2.4.)

Outre les diarrhées, les probiotiques peuvent être utilisés pour lutter contre les infections à *Candida albicans*. Il s'agit d'un pathogène que l'on peut retrouver au niveau buccal mais aussi vaginal. Il est alors responsable d'une infection vaginale appelée vaginite. Il a été montré *in vitro* que des souches de *L. paracasei* et *L. rhamnosus* étaient capables d'inhiber la croissance de *C. albicans* (Sookkhee et al., 2001). De plus, le surnageant de trois lactobacilles *L. casei* ATCC 393, *L. paracasei* ATCC 27092, et *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 inhibaient aussi *C. albicans* (Noverr and Huffnagle, 2004). Utilisées en combinaison (SYNBIO®), les deux souches de *L. paracasei* et *L. rhamnosus* inhibaient encore l'activité de *C. albicans* (Coman et al., 2014, 2015). Dans un premier modèle murin, l'inoculation de probiotiques (bifidobactéries et lactobacilles) a montré une moindre densité de *C. albicans* orogastrique et la diminution de la survenue de candidoses (Wagner et al., 1997, 1998). Dans un second modèle murin, *L. acidophilus* et *L. rhamnosus* ont pu réduire la colonisation de *C. albicans* au niveau buccal de façon plus efficace que le traitement à la nystatine (Matsubara et al., 2012). Enfin, une étude récente a démontré que les *L. rhamnosus* Lr32, *L. acidophilus* NCFM et *L. casei* L324m inhibaient la formation de biofilms à *C. albicans* (Matsubara et al., 2016). De plus, *in vivo*, le *L. rhamnosus* GG en ajout dans du lait maternel, prévient la colonisation entérique par *C. albicans* chez des nouveau-nés prématurés (Manzoni et al., 2006).

L'utilisation de probiotiques dans le traitement ou la prévention d'une vaginose bactérienne sera étudiée dans le chapitre 3 qui traitera plus spécifiquement de la sphère vaginale.

Enfin, l'utilisation des probiotiques dans la sphère pulmonaire ont aussi été menées (Alexandre et al., 2014).

Au niveau du système immunitaire adaptatif, la réponse anti-infectieuse est apportée par les Ly Th1 et Th17. Lors de ces infections, il y aurait donc un intérêt à booster le système immunitaire

par la prise de probiotique ayant montré des capacités à stimuler la formation de Ly Th1 et/ou de Ly Th17, comme le *L. rhamnosus* GG ou les SFB.

2.3.2. Le syndrome de l'intestin irritable

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est une pathologie observée essentiellement dans les pays dits industrialisés dans laquelle il est retrouvé une altération de la flore intestinale avec augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroides* (Jeffery et al., 2012; Kassinen et al., 2007; Saulnier et al., 2011). Le concept d'une intervention à base de probiotique dans le but de modifier la flore commensale a donc été étudié à de multiples reprises (740 résultats dans Pubmed en tapant les mots-clés "Irritable Bowel Syndrome" et "probiotic"). Les résultats obtenus restent controversés du fait des disparités dans les modèles d'études cliniques et des effets souches-dépendants. Il est donc encore difficile de conclure sur les bienfaits de l'utilisation de probiotiques dans le traitement de l'IBS (Clarke et al., 2012; McKenzie et al., 2016; Moayyedi et al., 2010; Pearson and Whorwell, 2017; Sanders et al., 2013; Zhang et al., 2016). Cependant, il semblerait que la souche *B. infantis* 35624 montre des effets bénéfiques dans l'amélioration des symptômes liés à l'IBS (Brenner et al., 2009; O'Mahony et al., 2005; Whorwell et al., 2006).

2.3.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique : Ces deux pathologies sont des MICI évoluant par poussées. Il y aurait une modification du microbiote avec un nombre importants d'espèces bactériennes induisant des réponses plus inflammatoires et une diminution des plus tolérogènes avec un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* qui diminue (Rehman et al., 2010; Sokol et al., 2009b). La flore intestinale de ces patients stimule le système immunitaire et induit la production de lymphocytes de type Th1 et Th17 (Sartor, 2008). Il y a aurait donc un intérêt à l'utilisation de probiotique pour rééquilibrer la flore intestinale. La modulation de cette flore pourrait stimuler la production de Ly Treg et par conséquent inhiber la production de Ly Th1 et Th17. L'administration de probiotiques qui auraient un effet tolérogène pour lutter contre l'inflammation a donc été proposée comme traitement chez ces patients atteints de MICI. De nombreuses études cliniques ont donc été menées. Une fois encore, de nombreuses disparités dans les résultats sont à relever et les données de la littérature sont limitées par le grand nombre

de souches de probiotiques étudiées, des différentes doses appliquées dans les études, du design des protocoles et d'un manque global de standardisation (Müllner et al., 2013). Une synthèse bibliographique datant de 2016 indique qu'il y aurait peu d'effet sur l'induction de la rémission de la maladie par des probiotiques, pas d'effet, et même de la détérioration du maintien de la rémission médicalement induite et peu d'effet sur la récurrence post-opératoire de la maladie, à l'exception peut-être de *S. boulardii* (Lichtenstein et al., 2016). Le probiotique VSL#3, a été étudié de multiples fois et, une fois de plus les résultats sont divergents. Une méta-analyse très récente indique que le VSL#3 ne montre pas d'efficacité dans l'induction d'un maintien de la rémission de la maladie de Crohn mais qu'il pourrait cependant avoir un rôle bénéfique contre les pouchites associées à cette pathologie (Dong et al., 2016). Une synthèse bibliographique datant de 2015 s'est intéressée aux résultats d'études cliniques utilisant exclusivement des lactobacilles et des bifidobactéries, seuls ou en symbiotique, chez l'Homme lors de MICI. Les probiotiques seuls et en symbiotique ont montré des effets bénéfiques dans le traitement de la rectocolite, ainsi que dans le maintien de la rémission, alors qu'un effet clair sur la maladie de Crohn a seulement été montré pour les symbiotiques (Saez-Lara et al., 2015). Depuis quelques années une bactérie commensale, *F. prausnitzii* est étudiée avec beaucoup d'attention, car elle est moins présente dans la flore commensale digestive des patients atteints de MICI (Sokol et al., 2008, 2009b). Or cette bactérie possédant des propriétés anti-inflammatoires semble importante dans le maintien de la rémission des patients atteints de rectocolite (Quévrain et al., 2015; Varela et al., 2013).

2.3.4. Les maladies allergiques

Depuis deux décennies, la prévalence des allergies est en constante augmentation dans notre société. En France, elle atteint entre 20 et 30 % de la population française. Cette augmentation de la prévalence est possiblement due à la théorie de l'hygiène. Durant la petite enfance, il y aurait un manque de stimulations microbiennes et une altération du microbiote intestinal qui serait dus à une "aseptisation" de notre milieu environnant (stérilisation des surfaces, lavage corporel trop régulier...). Les enfants les moins exposés aux microorganismes pathogènes auraient plus de risque de développer des maladies allergiques dans le futur (Strachan, 1989). Le déséquilibre de la flore entraîne une altération du compartiment des Ly Treg ce qui a pour effet d'induire une déviation de la réponse immunitaire vers un excès de Ly Th2 par rapport à la population de Ly Th1 (Romagnani, 2004; Wills-Karp et al., 2001). De plus,

les Th2 seraient plus nombreux à la naissance. En effet, les Ly Treg inhibent plus facilement les Ly Th1 que les Ly Th2 donc, lorsque le compartiment des Ly Treg est altéré l'effet inhibiteur continue de s'exercer contre les Ly Th1 mais pas envers les Ly Th2. L'utilisation de probiotiques chez la femme enceinte ou chez le nouveau-né a été envisagée dans le but de moduler la flore et de retrouver un équilibre permettant de renouveler le compartiment des Treg ou d'inhiber les Ly Th2 en stimulant la production de Ly Th1. De nombreuses méta-analyses concernant l'effet des probiotiques sur les allergies IgE dépendantes ont été effectuées. Comme précédemment un consensus n'a pas encore été établi du fait d'un manque d'homogénéité dans les protocoles : l'exemple le plus parlant étant celui de l'utilisation du *L. rhamnosus* GG dans la prévention de la dermatite atopique. Une équipe finlandaise a observé une diminution des dermatites atopiques chez des enfants à risque, après avoir donné le *L. rhamnosus* GG à des femmes enceintes. Un suivi jusqu'à l'âge de sept ans de ces enfants a montré que ces effets étaient durables (Kalliomäki et al., 2001, 2003, 2007). A l'inverse une étude avec un protocole identique mais effectuée en Allemagne n'a montré aucun effet bénéfique sur des enfants allemands. De plus, ils ont même observé un effet délétère de la prise de probiotique, avec augmentation du taux de récurrence des bronchites sifflantes (Kopp and Salfeld, 2009; Kopp et al., 2008). Si ces deux études ont été réalisées exactement dans les mêmes conditions, seules les populations changent. Il pourrait donc y avoir un aspect génétique modulant les effets des probiotiques. En 2010, il était montré qu'une combinaison de probiotiques prise chez l'enfant prévenait l'apparition de l'eczéma atopique (Zhu et al., 2010). Une méta-analyse datant de 2012 a montré une diminution modérée de l'incidence des dermatites atopiques après prise de probiotique que ce soit pendant la grossesse ou à la naissance (Pelucchi et al., 2012). Plus récemment, en 2015, une autre méta-analyse allait dans le sens de celle de 2012, en concluant qu'il y avait un effet protecteur des lactobacilles dans la prévention de la dermatite atopique lorsqu'ils sont pris en pré ou post-natal (Panduru et al., 2015). La démonstration de l'effet bénéfique des probiotiques sur la prévention des dermatites atopiques semblent en bonne voie. En effet, en 2017, il a été montré qu'une bactérie productrice d'acide lactique, *Weissella cibaria* WIKIM28 isolée d'une préparation végétale fermentée coréenne a la capacité de diminuer les symptômes de la dermatite atopique induite chez la souris en inhibant les réponses allergiques Th2 et en augmentant la réponse des Ly Treg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Lim et al., 2017). Cette bactérie pourrait donc être utilisée en prévention ou dans le but d'améliorer les symptômes de la dermatite atopique. L'effet des probiotiques dans le traitement de la dermatite atopique est plus discutable et les différentes études ne montrent pas d'effets probants à ce jour (Blattner et al., 2016; Gore et al., 2012; Lee et al., 2008).

Le traitement de l'asthme et des rhinites allergiques par des probiotiques ne bénéficie pas encore de données récentes suffisamment complètes et de preuves assez fortes pour conclure d'un effet bénéfique (Azad et al., 2013; Cuello-Garcia et al., 2015; Elazab et al., 2013; Nieto et al., 2014; Peng et al., 2015; Singh et al., 2013; Tang et al., 2015). Des études supplémentaires seront donc à prévoir pour déterminer l'efficacité de souches particulières de probiotiques dans les maladies allergiques.

2.3.5. Autres pathologies

L'axe intestin/cerveau : Très récemment, des études ont montré un lien entre le microbiote intestinal et des pathologies du système nerveux central (autisme, anxiété, dépression) (Carabotti et al., 2015; Collins et al., 2012; Rhee et al., 2009). Il existe une communication bidirectionnelle entre le cerveau et l'intestin dans ce qui est communément appelé de nos jours l'axe "gut-brain" avec comme régulateur majeur, le système immunitaire (Powell et al., 2017). Il y a des voies de communications établies entre le système nerveux autonome, le système nerveux entérique, le système neuroendocrinien et le système immunitaire. Par ces intermédiaires, les microorganismes intestinaux jouent un rôle majeur dans le fonctionnement du système nerveux central (Foster and McVey Neufeld, 2013). Des modifications du microbiote induisent donc des modifications du comportement, en influençant les fonctions du cerveau (Cryan and Dinan, 2012; Mayer et al., 2015). L'axe de recherche intestin/cerveau est très récent et en cours de développement. L'étude des probiotiques est encore peu développée, mais lorsqu'il s'agit de pathologies associées à des modifications du microbiote, l'utilisation de probiotiques semble une piste intéressante à explorer. Le nombre de publications devrait croître dans les années à venir (Hemarajata and Versalovic, 2012).

Probiotiques et métabolisme : Le microbiote intestinal semble jouer un rôle important dans le développement de l'obésité, la micro-inflammation associée à l'obésité et l'insulino-résistance (Patterson et al., 2016). Des différences dans la composition, dans les gènes fonctionnels, et dans l'activité métabolique du microbiote permettrait de distinguer des individus obèses *versus* des individus sains (Shen et al., 2013). C'est pourquoi une approche à base de probiotiques dans le but de moduler la flore intestinale paraît intéressante. Il a été montré que l'utilisation de probiotiques lors d'un régime n'accélérait pas la perte de poids mais induisait des modifications du profil lipidique et une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Madjd et al., 2016; Savchenyuk et al., 2015). Dans un modèle murin, la prise de probiotique, *B. animalis* ssp *lactis*

420, durant un gavage avec un régime riche en gras, permet de limiter la prise de poids, d'augmenter la tolérance au glucose et de diminuer l'inflammation du foie (Stenman et al., 2014). Chez l'Homme, la supplémentation avec le probiotique *L. casei* Shirota pendant un régime riche en énergie permet de maintenir une certaine sensibilité à l'insuline (Hulston et al., 2015). La prise de probiotique peut donc être intéressante en prévention de maladies métaboliques comme le diabète de type 2. Dans une synthèse bibliographique datant de 2016, il a été conclu que la prise de probiotiques et de symbiotiques pour la prévention et le traitement de l'obésité, du diabète de type 2 et de la stéatose non alcoolique pouvait avoir des effets bénéfiques d'après les résultats de la littérature (Sáez-Lara et al., 2016). Les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus et doivent faire l'objet d'études supplémentaires. Il a été montré qu'un mélange de probiotiques (*L. rhamnosus* LMG S-28148 et *B. animalis* ssp *lactis* LGM P-28149), dans un modèle murin, était capable d'améliorer l'adiposité, l'insulino-résistance et les dyslipidémies *via* un remodelage des cellules de l'immunité du tissu adipeux (essentiellement les macrophages). Au niveau intestinal ce mélange modifiait l'absorption des acides gras et restaurait l'expression d'un récepteur des AGCC, GPR43. Associés à ces résultats, il y avait un changement dans la composition du microbiote et une augmentation de la production d'AGCC comme le butyrate et le propionate (Alard et al., 2016). Ces résultats confèrent alors à ce mélange de probiotiques des propriétés anti-inflammatoires. Enfin, l'axe intestin/cerveau est étudié dans la régulation de la prise alimentaire. Il existe encore peu de résultats sur le sujet mais le microbiote ayant des effets avérés sur le cerveau, il est tout à fait possible d'imaginer que sa modification par les probiotiques puissent modifier le comportement alimentaire d'un individu (Hussain and Bloom, 2013).

Probiotiques et maladies auto-immunes: Exemple de la polyarthrite rhumatoïde qui est une maladie inflammatoire auto-immune de type Th1 et Th17, avec une altération du microbiote intestinale dont le rôle dans la physiopathologie de la maladie est de plus en plus reconnu (Kang et al., 2016). Un grand nombre d'études sont menées et publiées actuellement concernant l'utilisation de probiotiques comme le *Bacillus subtilis* pour induire des effets anti-inflammatoires (Urdaci et al., 2016). Le *L. casei* 01 par exemple, induit une augmentation de la sécrétion d'IL-10 dans le sérum et améliore les symptômes de la maladie (Vaghef-Mehrabany et al., 2014). L'utilisation de probiotique en complément d'un traitement contre la polyarthrite rhumatoïde semble prometteur (Wang et al., 2016).

Probiotiques et nouveau-nés prématurés : De nombreuses études sont menées pour analyser l'effet de la prise de probiotiques chez les nouveau-nés prématurés pour prévenir des

entérocolites nécrosantes et des sepsis tardifs. La manipulation du microbiote par la prise de probiotique semblerait avoir un effet bénéfique dans la prévention de ces pathologies (Fernández-Carrocerá et al., 2013; Jacobs et al., 2013; Vongbhavit and Underwood, 2016). Cependant toutes les souches de probiotique ne sont pas efficaces. Par exemple, Le *B. breve* BBG-001 n'a pas montré d'effet bénéfique, ni sur les entérocolites nécrosantes, ni sur les sepsis tardifs (Costeloe et al., 2016).

2.4. Le *L. rhamnosus* Lcr35

Dans cette sous-partie, nous allons nous intéresser au *L. rhamnosus* 35, le Lcr35. Cette souche a été utilisée pour nos expériences.

2.4.1. Caractéristiques du Lcr35

Le Lcr35 a été isolé de la flore intestinale d'un enfant sain dans les années 1950. C'est un lactobacille hétérofermentaire facultatif identifié grâce à des galeries API® 50 CH. Il correspond, avec une probabilité à plus de 95% à l'espèce *L. rhamnosus* et à un peu moins de 5% à l'espèce *L. casei*. En 2008, Coudeyras *et al.*, ont démontré sur le plan moléculaire, que cette souche était proche de la souche *L. rhamnosus* GG (Coudeyras et al., 2008).

La souche Lcr35 est produite en Auvergne depuis plus de soixante ans, par les laboratoires Biose (Anciennement les laboratoires Lyocentre puis Probionov pour la partie recherche). Lyophilisée, elle est commercialisée sous diverses formes galéniques et appellations commerciales dans de nombreux pays à travers le globe, il s'agit du Bacilor®, du Gynophilus®, du Lcr Lenio®.... Comme cela a été mentionné précédemment, le Bacilor®, dont le Lcr35 constitue le principe actif, est le seul probiotique bactérien à avoir obtenu une AMM en France. Il est indiqué dans le traitement d'appoint des diarrhées post-antibiotiques en complément d'une réhydratation. Il est également utilisé dans la prévention des récurrences des vulvo-vaginites, sous la forme d'une préparation parapharmaceutique à action locale, le Gynophilus®, qui a obtenu un marquage CE. Notre travail participe à compléter un dossier d'AMM pour ce produit. Après des décennies d'utilisation et un suivi de pharmacovigilance, aucun effet secondaire n'a été rapporté.

2.4.2. Effets bactériologiques bénéfiques du Lcr35

Différentes études ont pu démontrer que l'action de la souche Lcr35 peut avoir des effets bénéfiques grâce à des propriétés anti-infectieuses. Nous traiterons ici, des effets bénéfiques démontrés du Lcr35 dans les sphères intestinale et pulmonaire. Ses propriétés anti-infectieuses vaginales seront décrites dans le chapitre 3 (Cf chapitre 3 2.9). Le surnageant de culture du Lcr35 possède des activités antibactériennes, bactériostatiques contre de nombreux pathogènes intestinaux comme les *E. coli* entéropathogènes et entérotoxinogènes, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Clostridium difficile* (Forestier et al., 2001). Il a aussi été montré dans cette étude, que le Lcr35 est capable d'entrer en compétition avec ces bactéries dans un modèle *in vitro* et d'adhérer aux cellules épithéliales Caco-2. De plus, il est capable de persister dans l'intestin et de résister aux stress gastro-intestinaux (de Champs et al., 2003). Toujours dans son rôle de lutte contre les bactéries pathogènes, il a été montré dans un modèle murin, qu'il est capable de diminuer la densité de colonisation intestinale par des entérocoques résistants à la vancomycine (Vidal et al., 2010). De plus, le Lcr35 est capable d'exercer une activité anti-inflammatoire réparatrice et d'améliorer le fonctionnement de la barrière intestinale suite à un traitement antérieur avec du LPS de *S. typhimurium* (Fang et al., 2010).

Des études portant sur l'amélioration des diarrhées ont montré que le Lcr35 pouvait avoir des effets bénéfiques en diminuant la quantité de particules virales de rotavirus présentes dans les fèces (Fang et al., 2009). Il peut aussi se montrer efficace dans le traitement des diarrhées post-radiothérapies (Urbancsek et al., 2001). En plus de son rôle pour lutter contre les infections et les diarrhées, le Lcr35 a également montré dans la sphère digestive, au cours d'une étude clinique sur des enfants, un effet bénéfique dans la prise en charge des constipations chroniques et des douleurs abdominales (Bu et al., 2007).

Dans la sphère pulmonaire, il a été montré que l'administration orale de Lcr35 permettait de différer la colonisation et l'infection des poumons par *P. aeruginosa*, chez des patients en unité de soins intensifs, nourris par sonde nasogastrique (Forestier et al., 2008). Dans une autre étude clinique comparative de trois probiotiques, il a pu être démontré que le Lcr35 avait un effet protecteur significatif sur des enfants en âge préscolaire contre les infections virales des voies aériennes (Lin et al., 2009).

2.4.3. Effets immunologiques du Lcr35

Pour décrire les effets qu'a le Lcr35 sur la réponse immunitaire des études *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées. Ces études se sont essentiellement intéressées aux cellules dont nous sommes intéressés, les DC ainsi que les sous-populations lymphocytaires T. Les études *in vivo* dans des modèles murins se sont focalisées sur la réponse immunitaire apportée par le Lcr35 dans des pathologies comme le syndrome de l'intestin irritable, les MICI et les maladies allergiques, et seront décrites dans le paragraphe suivant. Nous allons tout d'abord nous intéresser à ce qui a été démontré *in vitro* au sujet de l'effet du Lcr35 sur des moDC.

2.4.3.1. Immunomodulation des moDC par le Lcr35

Une étude a eu lieu en 2011, sur ce sujet, et publiée par Evrard *et al.*. Le but de cette étude était d'analyser la réponse des DC grâce à plusieurs techniques, au contact de deux concentrations de Lcr35 (MOI 0.01 et MOI 10) (Evrard et al., 2011). Une analyse transcriptomique a permis de montrer qu'à une MOI de 0.01, le Lcr35 modifie peu et de façon non significative la réponse transcriptionnelle des moDC. En revanche à une MOI de 10, le Lcr35 augmente positivement l'expression de gènes impliqués dans les réponses inflammatoires, dans la préparation et la présentation des antigènes par le CMH et la signalisation cellulaire. L'expression des gènes codant pour les cytokines pro-Th1 (IL-12) et pro-Th17 (IL-6, IL-23, IL-1 β et TGF- β) a été significativement augmentée. L'expression des gènes codant pour un profil Th2 ou Treg n'a pas été changé, excepté une légère augmentation de l'expression de l'IL-10. De plus, une analyse par qRT-PCR a permis d'observer une augmentation de l'expression des gènes codant pour CCL20, une chimiokine responsable du recrutement des DC dans les tissus, mais aussi de CCR7 qui est un récepteur de chimiokine (CCL19/CCL21) permettant aux DC ayant capté un antigène de migrer vers les ganglions lymphatiques. Au niveau phénotypique, une analyse en CMF de marqueurs membranaires caractérisant des moDC immatures (PRR) et des moDC matures (molécules de co-stimulation) après 48 heures de contact avec un gradient de concentration de Lcr35 (MOI 0.01 à 100) a indiqué que le Lcr35 a un effet dose-dépendant sur la maturation des DC. La maturation induite par la plus forte concentration de Lcr35 étant comprise entre les DC immatures et les DC pleinement matures (stimulées au LPS), il est conclu que le phénotype de maturation induit par le Lcr35 est intermédiaire. Le dosage des cytokines présentes dans le milieu de culture des DC confirme ce qui a été observé lors de l'étude transcriptomique, c'est-à-dire l'augmentation de

sécrétion de cytokines pro-Th1 et pro-Th17 aux fortes concentrations (MOI 10 et 100). La réponse lymphocytaire n'a pas été étudiée en 2011. Le but de notre étude est, entre autre, de compléter les données concernant la réponse lymphocytaire apportée par le Lcr35 et vérifier s'il induit, comme le conclut cet article, un effet inflammatoire pro-Th1 et pro-Th17.

2.4.3.2. Immunomodulation observée *in vivo* par le Lcr35

Le Lcr35 a été testé dans des modèles murins pour analyser son efficacité dans plusieurs pathologies en lien avec des réponses immunitaires défaillantes. Nous allons détailler les résultats obtenus dans ce paragraphe.

Le Lcr35 et le syndrome de l'intestin irritable : Dans une étude clinique parue en 2012, effectuée chez cinquante patients atteints du syndrome de l'intestin irritable, il a pu être démontré que le Lcr35 diminue le score de douleur abdominale dans le sous-groupe de patients avec une forme diarrhéique du SII (Dapoigny et al., 2012). Dans un modèle de rat avec injection de TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic) au niveau proximal, mimant le SII en créant une micro-inflammation du colon, ainsi que dans un modèle de stress induit par la contention, le Lcr35 a été capable de diminuer l'hypersensibilité et les douleurs viscérales ressenties par les animaux. Ces résultats sont encourageants pour la prise en charge des patients atteints d'IBS (Darbaky et al., 2016).

Lcr35 et inflammation muqueuse intestinale : Dans le but de mimer l'inflammation de la muqueuse intestinale pouvant survenir après un traitement de chimiothérapie, un modèle murin d'inflammation de la muqueuse par injection intrapéritonéale de 5-Fluorouracil a été créé. Le traitement oral avec du Lcr35 a permis de diminuer le nombre de diarrhées associées à la chimiothérapie, ainsi que de diminuer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β induites par la chimiothérapie (Yeung et al., 2015). Ces résultats préliminaires dans un modèle animal pouvant suggérer une stratégie thérapeutique alternative pour lutter contre cette inflammation.

Le Lcr35 et les maladies allergiques : D'autres effets bénéfiques que le rôle anti-infectieux du Lcr35 ont été étudiés. Une première étude datant de 2006 a voulu montrer l'efficacité du Lcr35 dans le traitement de la dermatite atopique. Dans cette étude une amélioration du score clinique a été observée chez de jeunes enfants âgés de 2 à 12 ans après trois mois de traitement avec le Lcr35 (Passeron et al., 2006). Dans cette étude, le probiotique a été utilisé en complément d'un

prébiotique (symbiotique). Le prébiotique est composé des produits de fermentation du Lcr35, de lait écrémé en poudre d'amidon et de lactose. Cependant, les résultats ne diffèrent pas de l'utilisation du prébiotique seul. Cette étude nous fournit des conclusions limitées par le fait qu'il n'y a pas de bras probiotique seul, ni de bras placebo ou traitement de référence (Passeron et al., 2006). Dans un modèle murin d'inflammation allergique des voies aériennes, sensibilisées et stimulées à l'ovalbumine, le traitement oral par le Lcr35 une semaine avant sensibilisation a montré sa capacité à réduire l'inflammation allergique et l'hyperréactivité bronchique (Yu et al., 2010). Dans le même modèle murin, il a été démontré que le Lcr35 avait des effets sur la prévention de l'asthme allergique médiée par les DC, en induisant des Ly Treg et en supprimant la réponse Th2 (Jang et al., 2012; Kim et al., 2013). Toujours dans un modèle murin, le Lcr35 est capable d'induire la production de Ly Treg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, de diminuer la production d'IL-4 et ainsi avoir un rôle préventif dans le développement des dermatites atopiques (Kim et al., 2012; Yeom et al., 2015). Finalement, il en a été conclu dans un modèle murin que le Lcr35 montre une diminution de la marche atopique, c'est-à-dire l'évolution dans le temps du phénotype de la maladie dermatite atopique d'abord, puis de la rhinite allergique et plus ou moins de l'asthme grâce à la production de Ly Treg et à la diminution des réponses Th2, Th17 et TSLP (Kim et al., 2014).

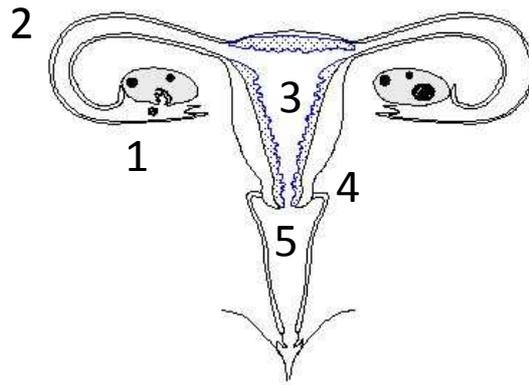


Figure 22. Schéma de l'appareil génital féminin.

(1) Les ovaires. (2) Les trompes de Fallope. (3) L'utérus. (4) Le col de l'utérus qui comprend l'endocol dans la partie utérine et l'exocol dans la partie vaginale. (5) Le vagin.

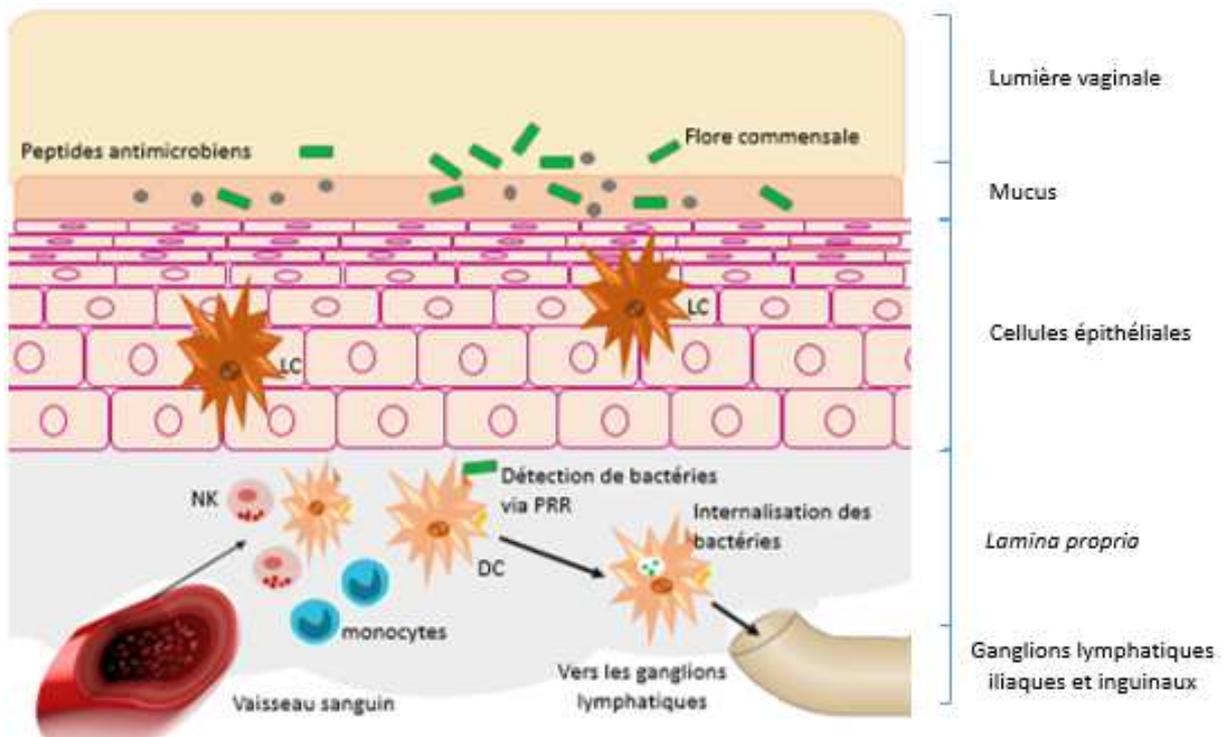


Figure 23. Représentation schématique de la muqueuse vaginale.

Sont représentés sur ce schéma la lumière vaginale où vit la flore commensale principalement composée de lactobacilles sécrétant de nombreux peptides antimicrobiens. Les cellules épithéliales pluristratifiées non kératinisées sont recouvertes d'une couche de mucus à leur pôle apical. Des LC sont présentes au sein de cet épithélium. A leur pôle basal se trouve la *lamina propria* où sont se retrouvent les différentes sous-populations de DC présentées ainsi que des cellules NK et des monocytes.

Chapitre 3 : L'appareil génital féminin

1. La physiologie vaginale

L'appareil génital féminin est composé de cinq parties (Figure 22). Tout d'abord il est constitué des ovaires, ils forment un organe pair, ce sont les gonades féminines. Elles servent à la fois à la production des ovules et à la sécrétion des hormones sexuelles féminines, œstrogène et progestérone. En aval, partant des ovaires, il y a les trompes de Fallope (ou oviductes) qui relient chaque ovaire à l'utérus. Elles captent les ovocytes lors de l'ovulation et permettent le transport des spermatozoïdes de l'utérus vers l'ovocyte. L'utérus reçoit latéralement les trompes de Fallope droite et gauche et le corps utérin communique avec le vagin par le col utérin. Ce dernier est composé de deux parties, l'endocol qui a une structure épithéliale formée d'un épithélium mono-couche similaire à l'utérus, et l'exocol qui est revêtu d'un épithélium identique à l'épithélium vaginal. Le vagin est constitué d'une muqueuse de type II, elle est constituée par un épithélium malpighien squameux pluristratifié non kératinisé avec absence de jonctions serrées. Cet épithélium est séparé du tissu conjonctif sous-épithélial (*lamina propria* ou LP) par une fine lame basale. Les cellules de la couche basale sont cubiques et leur division par mitose entraîne le renouvellement de l'épithélium. Les cellules de la couche intermédiaire ont une forme polyédrique et les cellules de la couche superficielle sont pavimenteuses (plates) et desquament dans la lumière. Le tissu conjonctif s'élève à la face profonde de l'épithélium sous forme de papilles. Il existe un réseau capillaire sous-épithélial d'une très forte densité occupant toute l'épaisseur de la *lamina propria*, ce qui permet aux cellules immunitaires de circuler (Koritke et al., 1969) (Figure 23). Cet épithélium connaît des modifications en fonction de l'influence hormonale. Après l'ovulation, la strate superficielle desquame et libère du glycogène qui sera métabolisé en acide lactique par la flore commensale, d'où l'acidification du milieu plus importante selon le cycle menstruel. Les cellules épithéliales sécrètent et sont recouvertes d'une couche de mucus (Andersch-Björkman et al., 2007). De plus, ce mucus sécrété par les cellules épithéliales est recouvert de nombreuses bactéries composant la flore commensale vaginale et composée essentiellement de lactobacilles producteurs d'acide lactique.

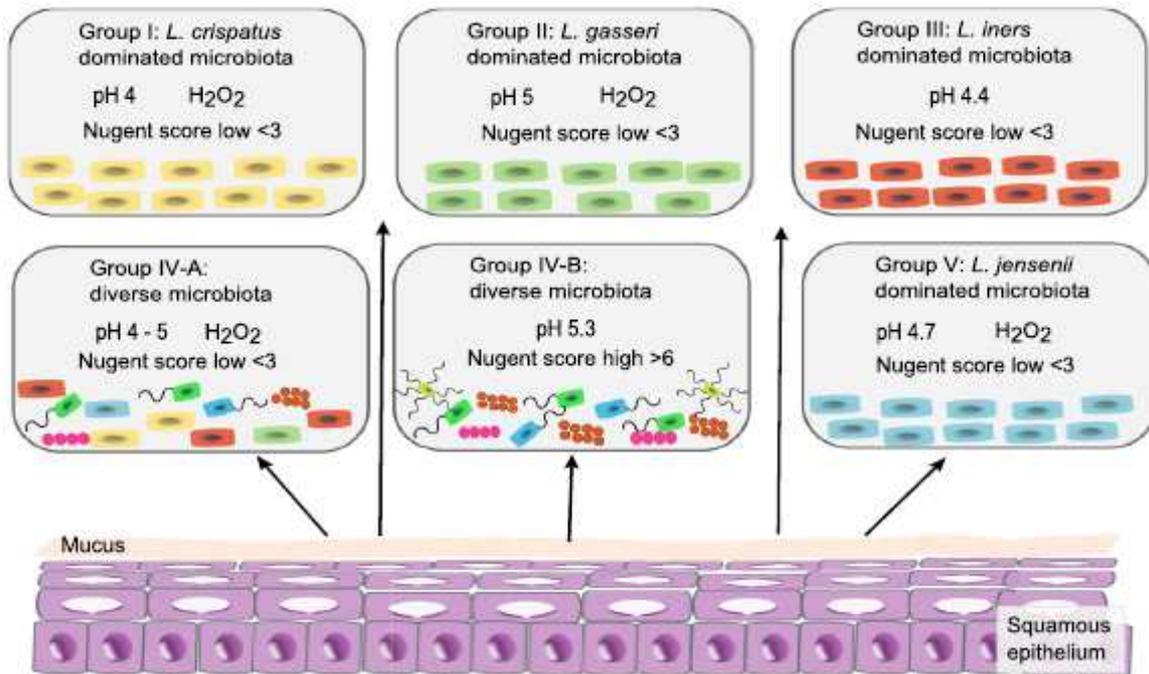


Figure 24. Cinq groupes de communautés bactériennes vaginales de femmes américaines. Identifiées par Ravel *et al* en 2011 (Repris par Petrova et al., 2013).

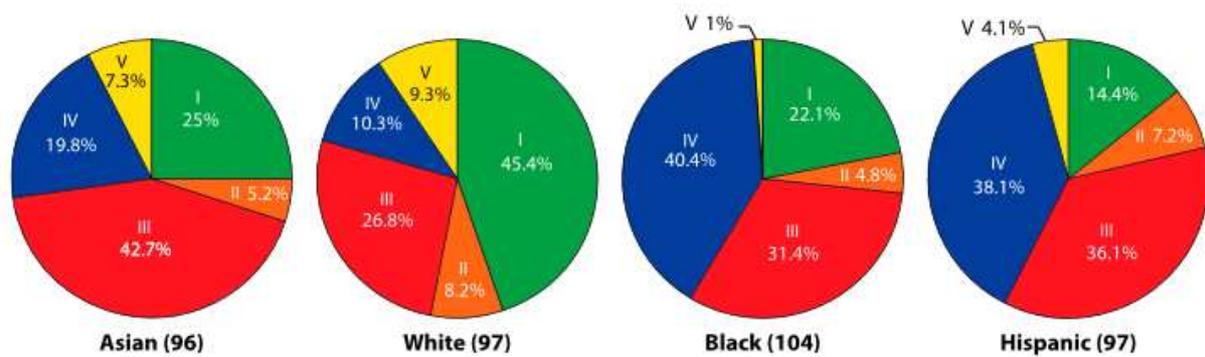


Figure 25. Représentation des communautés bactériennes vaginales parmi des groupes ethniques de femmes américaines (D'après Ravel et al., 2011).

1.1. La flore commensale vaginale

1.1.1. Composition de la flore commensale vaginale

A. Döderlein fut le premier, en 1892 à décrire cette flore qu'il considérait homogène et constituée de bacilles à Gram positif (Döderlein, 1892). Pendant de nombreuses décennies cette théorie a persisté. La flore commensale vaginale était alors composée de bacilles de Döderlein, d'où son nom, flore de Döderlein. Dans ces dernières décennies, les connaissances en biologie moléculaire ont permis d'analyser plus finement la composition de cette flore et de déterminer la présence de nombreux autres genres et espèces bactériens présents en petite quantité. La flore vaginale normale d'une femme, dès les premiers jours de vie, est composée à 85% de Lactobacilles producteurs d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (de 10⁷ à 10⁸ CFU/g de fluides vaginales) (Andreu et al., 1995). Les 15% restants sont composés par une flore diversifiée de bactéries aérobies et anaérobies et représentée pour moitié par *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*). Cette flore varie en fonction de l'âge (post-pubertaire, pré-ménopause et post-ménopause). En effet, il a été montré que la flore à la fois aérobie et anaérobie diminuait au cours du cycle menstruel (Bartlett et al., 1977; Sautter and Brown, 1980; Wilks and Tabaqchali, 1987). Cependant, la flore normale reste dominée en grande partie par des lactobacilles producteurs d'acide lactique et d'H₂O₂. Des études récentes ont montré que l'origine ethnique des femmes américaines modifiait considérablement la composition de leur flore (Ravel et al., 2011). Il a été étudié 396 femmes nord-américaines asymptomatiques représentant quatre groupes ethniques, blanches, noires, asiatiques et hispaniques. Cette étude a montré 5 groupes de communautés bactériennes numérotées de I à V. Dans les groupes I, II, III et V, la flore était dominée par des lactobacilles, respectivement, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* et *L. jensenii* (Petrova et al., 2013) (Figure 24). Le groupe IV est composé d'un microbiote divers, mélangeant des lactobacilles et une flore anaérobie importante. Les femmes américaines d'origine asiatique et les femmes blanches ont une flore composée respectivement de 80 et 90% de lactobacilles, alors que les femmes afro-américaines et d'origine hispanique ont une flore composée de seulement 60% de lactobacilles, flore normale pouvant être considérée comme le début d'une dysbiose chez une femme blanche européenne (Ravel et al., 2011; Shipitsyna et al., 2013) (Figure 25). Il existe bien une diversité dans la composition de la flore vaginale à travers le globe en fonction des origines ethniques. D'autres études par exemple, qui ont eu lieu en Inde, au Brésil ou au Mexique indiquent une flore aussi dominée par des lactobacilles mais, dans ces études, la souche dominante est la souche *L. reuteri* (Garg et al., 2009; Madhivanan et

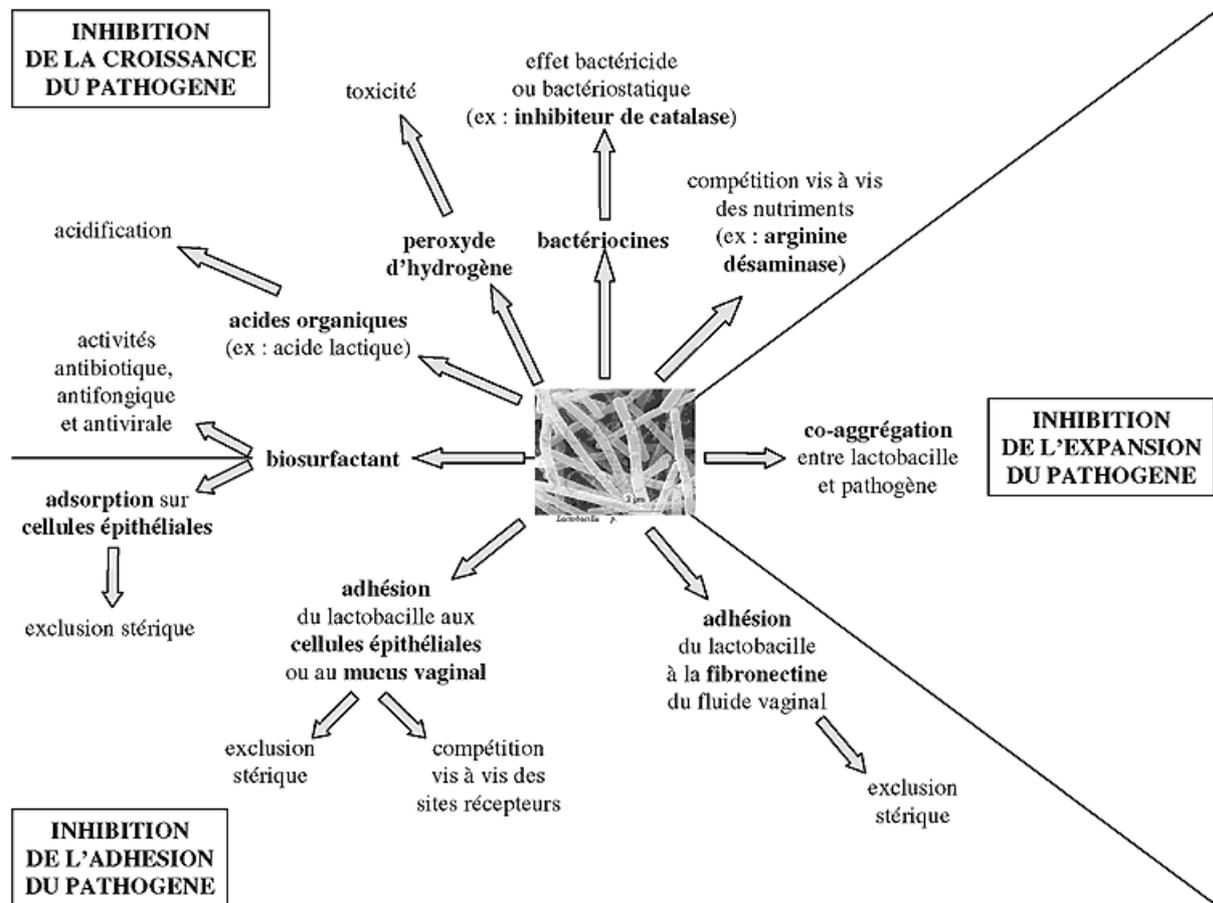


Figure 26. Mécanismes d'action bactériologiques des lactobacilles vaginaux pour lutter contre la flore pathogène (D'après Lepargneur et al., 2008).

Community State Type (CSTs)	pH	Metabolite profile
I <i>L. crispatus</i>	4.0 ^a	
II <i>L. gasseri</i>	5.0 ^a	
V <i>L. jensensii</i>	4.7 ^a	
III <i>L. iners</i> (ubiquitous regardless of BV status)	4.4 ^a	
IV-A Modest levels of <i>L. crispatus</i> , <i>L. iners</i> or other <i>Lactobacillus</i> sp. with low proportions of <i>Streptococcus</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> and <i>Fingoldia</i>	5.3 ^a	
IV-B Relatively high levels of <i>Atopobium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Sneathia</i> , <i>Prevotella</i> and several other taxa of BVAB		
BV Polymicrobial Increased diversity and bacterial load of BVAB	>4.5	

Figure 27. Profil des métabolites sécrétées en fonction de la communauté bactérienne vaginale (D'après Aldunate et al., 2015). La présence d'acides gras à courtes chaînes est synonyme d'une diminution des lactobacilles vaginaux et de la présence d'une flore polymicrobienne.

al., 2014; Martinez et al., 2008; Martínez-Peña et al., 2013). Cette flore a un rôle très important dans la protection de l'hôte face aux infections.

1.1.2. Rôle protecteur de la flore commensale vaginale

L'équilibre de l'écosystème vaginal est fragile, et son maintien est essentiel pour éviter toute infection. Pour cela, la flore commensale a une activité antimicrobienne qui stabilise le microbiote vaginal grâce à la production de composés antimicrobiens, à sa capacité à adhérer aux cellules épithéliales vaginales et à s'agréger aux bactéries pathogènes (Figure 26). Ceci correspond à l'ensemble des mécanismes bactériologiques tels que nous allons les décrire dans les paragraphes suivants, permettant de protéger le corps contre des infections vaginales (Lepargneur and Rousseau, 2008).

1.1.2.1. La sécrétion de composés antimicrobiens

La présence de lactobacilles producteurs d'acide lactique, permet de créer un environnement acide avec un pH vaginal autour de 4,5. Le pH vaginal varie en fonction des espèces de lactobacilles qui composent la flore vaginale. Chaque lactobacille a des capacités plus ou moins développées pour fermenter le glycogène de l'environnement qui est à l'origine de la production d'acide lactique. Cette acidité permet d'inhiber un grand nombre de bactéries pathogènes et de virus qui ne peuvent se développer à ce pH (Charlier et al., 2009). Un faible pH semble très important dans la prévention de la colonisation par des pathogènes mais certaines souches de levures comme *C. albicans* et certaines bactéries comme les entérocoques peuvent résister à ces pH bas (Reid et al., 2006). La diminution du pH n'est pas le seul élément permettant d'avoir un effet inhibiteur sur les pathogènes. Les groupes ethniques de femmes ayant une flore vaginale dominée par les lactobacilles ont peu de capacité à créer des acides gras à courtes chaînes (AGCC). A l'inverse, les femmes du groupe IV qui ont une flore variée et anaérobie, utiliseront le glycogène comme substrat pour former des AGCC (acétate, propionate, butyrate, succinate), qui ont beaucoup moins d'effets antimicrobiens que l'acide lactique (Aldunate et al., 2015) (Figure 27). Contrairement à l'effet tolérogène connu des AGCC au niveau colique, les AGCC vaginaux induiraient la sécrétion de l'IL-8, de l'IL-6, de l'IL-1 β pour créer un environnement pro-inflammatoire (Mirmonsef et al., 2012). Il existe des espèces de lactobacilles qui ont la capacité de sécréter plus ou moins d'H₂O₂. C'est le cas de *L.*

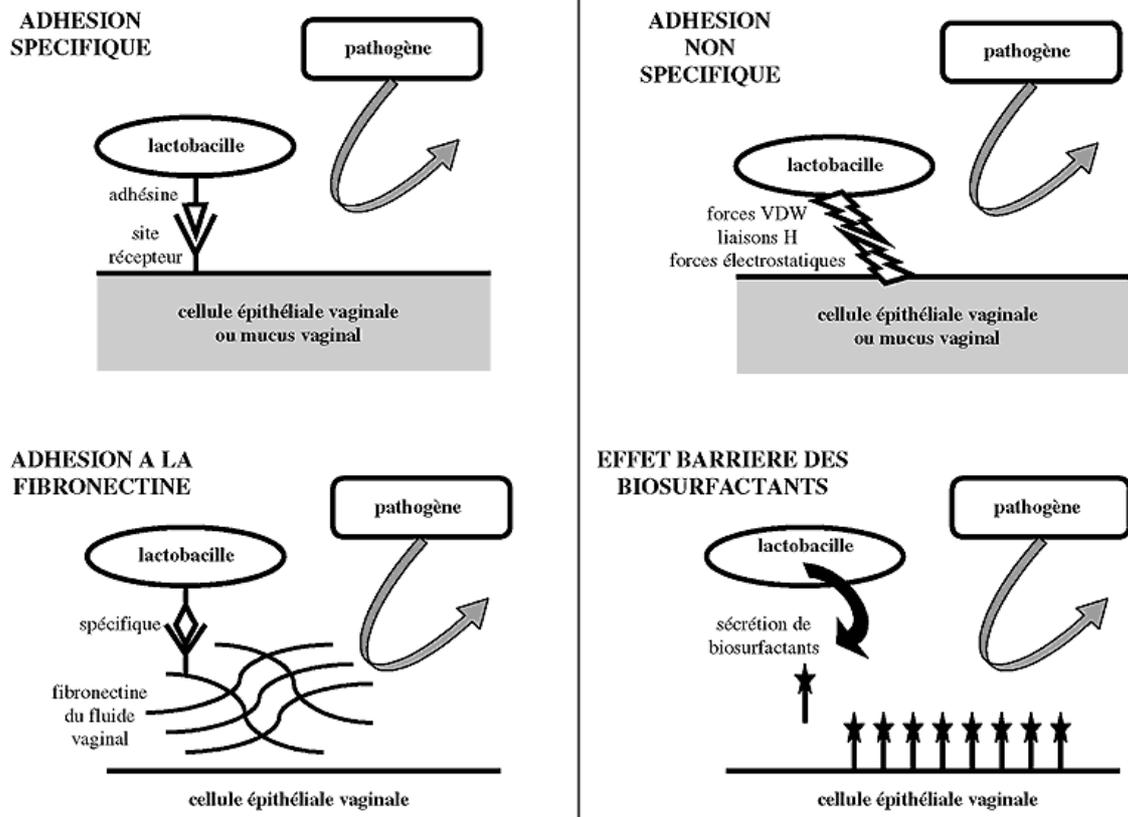


Figure 28. Quatre types d'adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales et inhibition des pathogènes (D'après Lepargneur et al., 2008).

crispatus et de *L. jensenii* qui sont des producteurs d'H₂O₂, alors que *L. gasseri* et *L. iners* n'en produisent que peu. Des études ont montré que plus les lactobacilles étaient capables de produire de l'H₂O₂, plus ils étaient présents au sein de la flore vaginale (Antonio et al., 1999; Song et al., 1999; Spear et al., 2011). De plus, leur présence est inversement corrélée au pourcentage d'infection vaginale retrouvée chez les femmes étudiées. La production d'H₂O₂ induit un effet cytotoxique sur les pathogènes et permet un maintien de l'équilibre vaginal en inhibant leur croissance (Ocaña et al., 1999). Enfin, les lactobacilles peuvent quasiment tous sécréter différentes bactériocines. Ce sont des protéines, ou complexes protéiques ayant une activité bactéricide contre des espèces taxonomiquement proches de la souche productrice. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont une activité dirigée principalement contre les bactéries à Gram positif. La membrane externe des bactéries à Gram négatif ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne qui est le siège de leur activité (Thonart and Dortu, 2009). Il existe trois classes de bactériocines en fonction de leur taille allant de moins de 5kDa à plus de 30kDa, chacune ayant des mécanismes d'action spécifiques pour tuer les pathogènes : activité nucléase, formation de pore dans la membrane cytoplasmique (Gillor et al., 2005). Des bactériocines comme la T8 et la HV219, ont pu être isolées de prélèvements vaginaux prouvant leur présence au niveau vaginal (Kwaadsteniet et al., 2006; Todorov et al., 2006).

1.1.2.2. Capacité d'adhésion à l'épithélium vaginal

La forte présence de bactéries commensales crée une compétition entre les micro-organismes pour les micronutriments du microenvironnement vaginal. Elles créent aussi une forte compétition pour les sites de fixation à l'épithélium vaginal.

Plusieurs études ont démontré la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales des lactobacilles (Andreu et al., 1995; Boris and Barbés, 2000; Sobel et al., 1981). Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les bactéries commensales se fixent sur les cellules épithéliales (Figure 28). Les lactobacilles peuvent se fixer de manière spécifique à la cellule épithéliale grâce aux acides lipotéichoïques et aux polysaccharides des bactéries se fixant sur les glycoprotéines et glycolipides du mucus ou de la membrane cellulaire. L'interaction peut-être non spécifique grâce à l'intervention de liaisons physico-chimiques (Andreu et al., 1995; Boris and Barbés, 2000). Les lactobacilles sont aussi capables d'adhérer à la fibronectine présente dans la matrice extracellulaire (Nagy et al., 1992). L'adhésion de la flore commensale sur les sites récepteurs

permet un encombrement stérique créant une compétition vis-à-vis de ces sites de fixation jouant ainsi un rôle important dans la lutte contre les infections par les pathogènes. Enfin, la production de biosurfactant inhibe l'adhésion de nombreux pathogènes en créant une barrière face aux pathogènes et en favorisant l'adhésion des lactobacilles (Velraeds et al., 1998). Au cours de la vie, plusieurs facteurs peuvent modifier la capacité d'adhésion des lactobacilles, comme, les changements hormonaux, le pH et la quantité de glycogène (Borges et al., 2013). L'ensemble de ces éléments permet d'augmenter l'imperméabilité de la membrane et éviter la translocation de bactéries pathogènes.

1.2. La muqueuse épithéliale vaginale et immunité innée

1.2.1 Les cellules épithéliales vaginales sont un premier rempart de protection face aux infections

Outre le rôle de la flore commensale comme facteur protecteur face aux infections, il existe d'autres systèmes synergiques et complémentaires, à commencer par les cellules épithéliales elles-mêmes. Tout d'abord, elles forment une barrière continue du vagin jusqu'aux ovaires, évitant physiquement aux bactéries opportunistes de traverser cette barrière. De plus, les cellules épithéliales vaginales, comme toutes autres cellules épithéliales de l'organisme expriment différents PRR. Elles expriment fortement les TLR 1 à 9 qui sont fonctionnels mais aussi des CLR comme le récepteur au mannose et les récepteurs NOD (Fanibunda et al., 2011; Fazeli et al., 2005; Witkin et al., 2007). L'expression de TLR4 est élevée dans les trompes de Fallope et décroît en descendant dans le tractus pour devenir faible dans le vagin (Nasu et al., 2010). Le TLR 10 semble ne pas être exprimé dans cet épithélium. Les cellules épithéliales vaginales sécrètent des molécules ayant une activité antimicrobienne appelées défensines. Les défensines comme SLP1 (Secretary leukocyte protease inhibitor 1), dégradent la membrane des bactéries à la fois à Gram positif et négatif, entraînant la lyse des bactéries (Witkin et al., 2007). De plus, les cellules épithéliales vaginales ont la capacité de sécréter les protéines hsp70 (Heat Shock Protein), qui ont un double rôle, de protection cellulaire et d'activité antimicrobienne. Au niveau intracellulaire, elles se lient à d'autres protéines pour éviter la dégradation de la cellule. Au niveau extracellulaire, elles se lient aux TLR et induisent une réponse immunitaire (Giraldo et al., 1999; Voellmy, 2005). De plus, l'hsp70 peut induire la sécrétion d'oxyde nitrique (NO) en réponse à la présence d'une flore vaginale anormale (Genc et al., 2006). Enfin, les cellules épithéliales vaginales ont la capacité de sécréter SP-A et SP-D (Surfactant Protein) qui jouent un rôle important dans la lutte contre de nombreux pathogènes (Leth-Larsen et al., 2004;

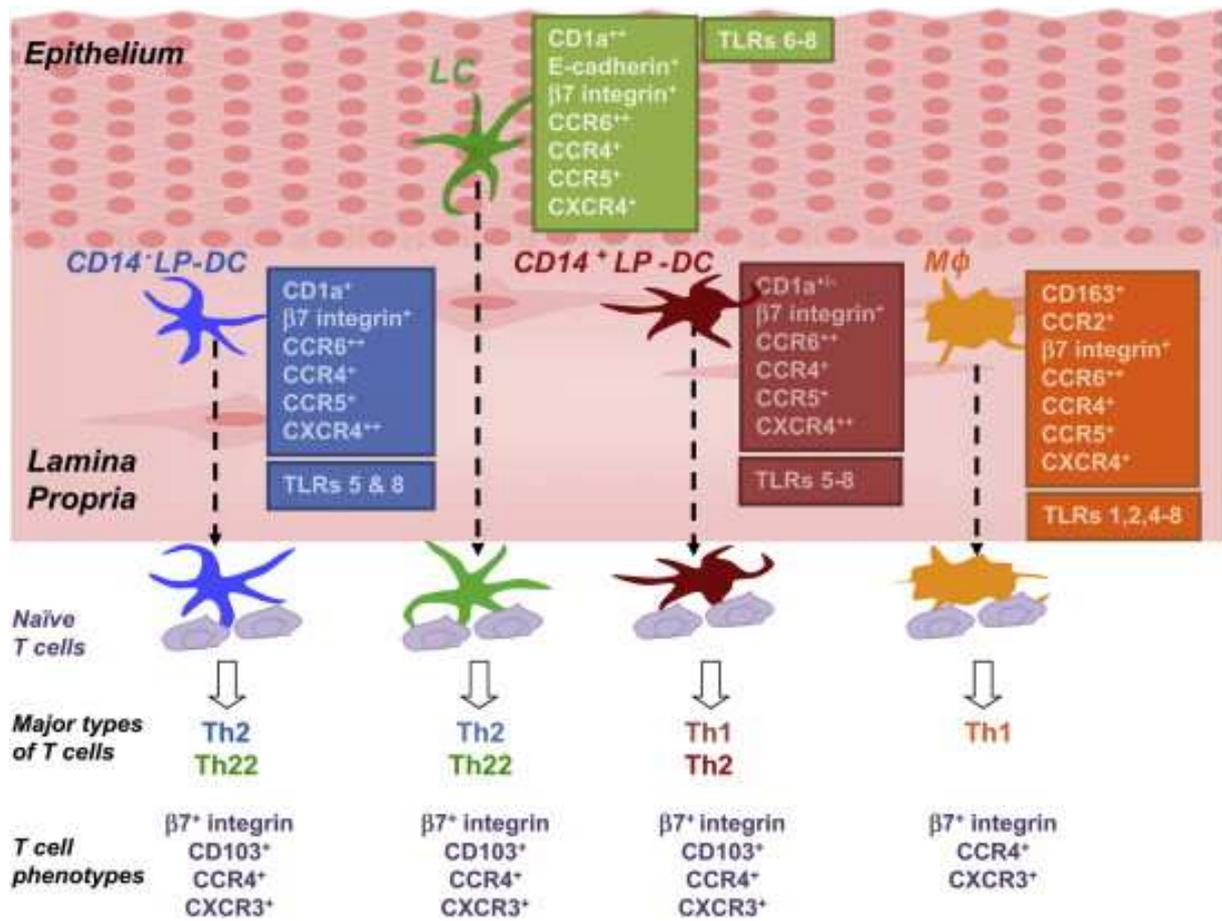


Figure 29. Sous-populations de cellules dendritiques et de macrophage décrites dans la muqueuse vaginale (D'après Duluc et al., 2013a)

MacNeill et al., 2004). Les cellules épithéliales vaginales, en plus de leur fonction barrière font partie du système immunitaire inné en reconnaissant un grand nombre de pathogènes, induisant un microenvironnement au niveau basal qui activera en fonction, les cellules du système immunitaire.

Le système immunitaire vaginal est composé de nombreux types cellulaires. Le but étant de répertorier les cellules qui ont été identifiées au niveau vaginal. Les cellules de l'immunité innée seront d'abord décrites brièvement. Dans un second paragraphe, l'intérêt sera porté sur les différentes sous-populations de Ly T CD4 vaginaux.

1.2.2. Les cellules de l'immunité innée au niveau vaginal

1.2.2.1. Classification des sous-populations de DC vaginales

Les DC sont présentes dans l'épithélium vaginal. Comme cela a été décrit dans la première partie les DC sont les principales CPA du système immunitaire et ont un rôle de sentinelle surveillant le microenvironnement. Elles captent les antigènes dans la *lamina propria* et présentent leurs peptides aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques. Ces dernières années, un changement de nomenclature et de multiples études ont permis d'identifier un grand nombre de sous populations de cellules dendritiques. Dans ce paragraphe, nous allons présenter les sous-populations intervenant dans la réponse immunitaire vaginale (Duluc et al., 2013a) (Figure 29).

- Les CD11c⁺ CD1c⁺ CD14⁻ CD11b^{low} et CD11c⁺ CD1c⁺ CD14⁺ CD11b⁺ sont les DC de la *lamina propria* (LP-DC). Ces deux sous-populations ont des dendrites et sont donc qualifiées de cellules dendritiques. Elles expriment aussi le CD1a, le CD83 et le. Au niveau des récepteurs de chimiokines, les LP-DC expriment CCR5 et CXCR4 (corécepteurs du HIV), CCR6, CCR4, CX₃CR1 et les β7 intégrines. CCR7 et CD103 ne sont pas exprimés à leur surface (Duluc et al., 2013b; Rodriguez-Garcia et al., 2016). Dans ces articles, le parallèle n'est pas fait avec les sous-populations de cDC1 et de cDC2 expliquées dans la première partie de ce travail. Le fait qu'elles soient CD1c⁺ pourrait les rapprocher des cDC2 connus. Cependant, les cDC2 n'expriment pas le CD14 et expriment le CD103 au niveau intestinal (Watchmaker et al., 2014). Le fait d'être dans un autre tissu pourrait expliquer les disparités dans l'expression de ces marqueurs. De plus, l'absence du marqueur CD141 dans ces études ne permet pas l'identification des cDC1, qui sont CD141⁺.

- CD11c^{low} CD1c⁻ CD14⁺ CD11b⁺, sont les cellules les plus abondantes dans la muqueuse vaginale. Elles ont des caractéristiques de macrophages et sont classées comme telles par les auteurs (Duluc et al., 2013b). Ces cellules ont de larges vacuoles cytoplasmiques et expriment le CD86 et le CD163 (récepteur scavenger). Cependant, elles n'expriment ni le CD1a, ni le CD83. Au niveau des récepteurs de chimiokines, elles expriment CCR2 (récepteur de « homing » des macrophages et monocytes), CCR4, CX₃CR1, CCR5 et CXCR4 (Shen et al., 2009). Elles n'expriment pas les β7 intégrines.

- Les cellules de Langherans (LC) qui comme nous l'avons vu dans la première partie, sont remises en question en tant que DC. Une étude sur un modèle murin a démontré que les LC de l'épithélium vaginal en condition homéostasique sont essentiellement renouvelées par des précurseurs dérivés de la moelle osseuse d'origine non monocyttaire (Iijima et al., 2007). Au niveau vaginal, ces cellules sont HLA-DR⁺ CD207⁺ et sont présentes dans l'épithélium (Duluc et al., 2013b). Cependant, l'expression de CD207 par les LC vaginales est inférieure à l'expression de CD207 par LC du derme (Iijima et al., 2007).

- Dans un modèle murin, il a été montré que les pDC sont peu présentes dans la muqueuse vaginale de souris. Cependant, lors d'une infection par le virus de l'herpès HSV-2, les pDC sont recrutées sur le site de l'infection. Un jour post-infection, le nombre de pDC vaginaux a doublé et continue d'augmenter jusqu'à 4 jours après l'infection (Lund et al., 2006). Ces auteurs ont montré que le recrutement se faisait grâce à l'expression de CXCR2 et de CCR5 sur les pDC. Il a été montré *in vitro* qu'une stimulation à partir de chimiokines et de cytokines induit une migration et une activation des pDC plus importante que celle des cDC, qui reste supérieure à celle des LC (Shey et al., 2016). Cependant, il a été montré que la contraception hormonale pouvait modifier cette réponse. En effet, l'utilisation de ce type de contraception réduit la capacité de circulation des pDC (Michel et al., 2015). Les ligands de CCR5 (MIP-1 par exemple) sont fortement exprimés après une infection au niveau vaginal. Une fois de plus, le VIH peut utiliser ce récepteur pour pénétrer les cellules. C'est pourquoi une infection vaginale permettant le recrutement de ces cellules en nombre peut favoriser l'acquisition du VIH.

- Dans un second modèle murin d'infection génitale par HSV-2, il a été démontré que les monocytes inflammatoires et les moDC sont requis pour induire une réponse forte de type Th1 et lutter contre cette infection. Les monocytes, lors d'une inflammation sont recrutés sur site grâce au couple récepteur/chimiokine CCR2-CCL2. Dans ce modèle murin, des souris KO pour CCR2 ont une infection plus sévère et 75% d'entre elles mourraient de cette infection

(Iijima et al., 2011). Un suivi de ces moDC au niveau vaginal a permis d'observer que durant cette infection les moDC donnent naissance à des DC proches des cDC2 (CD11c⁺ CD11b⁺) et remplacent de façon transitoire les cDC2 résidentes dans le tissu. Le marqueur murin F4/80 permet de différencier ces deux sous-populations (Iijima et al., 2011). Cependant, l'équivalent humain de ce marqueur, EMR1 est spécifique des éosinophiles et non des DC (Hamann et al., 2007). Dans cette étude, les moDC (CD11c⁺ CD11b⁺) sont nécessaires pour stimuler de nouveau de façon robuste la sécrétion d'IFN- γ et la prolifération des Ly Th1, 4 jours post-infection. La première vague de sécrétion d'IFN- γ est apportée par les NK, 2 jours post-infection (Iijima et al., 2011).

Ces cinq sous-populations décrites expriment un grand nombre de récepteurs, TLR, CLR et RLR. Les CLR exprimés sont CLEC5A, CLEC4F, DCIR, CLEC2B, CLEC16A, LOX-1, DC-ASGPR et le DC-SIGN. Ces CLR sont surexprimés par rapport aux CLR exprimés sur les DC de la peau et du sang (Duluc et al., 2014). Les TLR et RIG-1 ont la même expression que les récepteurs présents sur les autres sous-populations de DC. Lorsque ces quatre sous-populations de DC vaginales sont comparées entre elles, il est montré que les CD14⁺ (LP-DC et macrophages) expriment plus le DC-SIGN, le LOX-1, le DC-ASGPR, le DCIR, mais aussi des TLR 1, 2, 4 et 6 pour les macrophages. L'augmentation d'expression de ces TLR sur les macrophages leur confère un rôle important dans la reconnaissance de produits bactériens (Duluc et al., 2013b, 2014). Les DC vaginales surexprimant le TLR 7 ont un rôle dans l'immunité antivirale. En fonction de l'expression de ces récepteurs dans les sous-types de DC, elles sont des cibles attrayantes pour manipuler la réponse immunitaire de l'hôte, dans le but de générer des vaccins.

Les DC sont connues pour être la porte d'entrée de l'infection par le VIH. L'étude de ces récepteurs présents à la surface des différentes sous-populations de DC a permis d'identifier les DC les plus protectrices contre le VIH. Il a été démontré que la Langerine, un CLR présent sur les LC est une barrière à l'entrée du VIH car dégradé dans les granules de Birbeck, alors qu'une interaction avec le DC-SIGN permet la transmission du VIH aux Ly T (de Witte et al., 2007). Le mécanisme sous-jacent a été découvert en 2016 par Ribeiro *et al.*. Ils ont montré que la ligase TRIM5 α (tri-partite-containing motif 5 α) était un facteur de restriction humain dépendant des CLR. La fixation du VIH sur la Langerine conduit à la restriction du VIH, ce qui permet sa dégradation autophagique dans les LC. A l'inverse, les DC exprimant le DC-SIGN n'ont pas cet effet, car lorsque le VIH se fixe sur le DC-SIGN, cela conduit à la dissociation de TRIM5 α du DC-SIGN, empêchant sa dégradation (Ribeiro et al., 2016). Il y a donc un intérêt à connaître

les récepteurs présents sur les différentes sous-populations de DC dans le but de mettre en place des indications thérapeutiques.

Du fait des particularités qu'offre l'épithélium vaginal, les DC résidant dans la muqueuse vaginale et les DC migrant à partir du sang périphérique au sein de ce tissu peuvent capter les antigènes directement dans la muqueuse grâce à l'extension de leurs dendrites à travers les cellules épithéliales (Shen et al., 2011).

En plus de leur capacité à capter un grand nombre d'antigènes de façon très rapides, les différentes sous-populations de DC vaginales vont induire une réponse spécifique aux antigènes qu'elles peuvent capter en sécrétant diverses cytokines induisant la polarisation des lymphocytes T.

1.2.2.2. Autres cellules de l'immunité innée vaginale

- Les NK vaginaux représentent 10 à 30% des leucocytes vaginaux et varient peu quantitativement, pendant le cycle menstruel contrairement aux NK de l'endomètre. Les NK présents dans le tractus génital féminin ont des caractéristiques phénotypiques différentes selon leur localisation. Ils sont CD56⁺ CD16^{low} CD9⁺ CD94⁺ CD69⁺ dans l'endomètre, alors qu'ils sont CD56⁺ CD16⁺ CD9⁺ CD94⁻ CD69⁻ dans le tractus génital inférieur (Mselle et al., 2007). L'expression de CD16 par les NK au niveau vaginal les rapproche des NK sanguins. La protéine CD9 permet de les différencier des NK sanguins qui ne l'expriment pas. Le CD9 est une protéine de surface présente sur un grand nombre de cellules épithéliales et hématopoïétiques. Il peut interagir avec les molécules du CMH de classe II, des Ig et des glycoprotéines spécifiques de la grossesse. Cette expression de CD9 a été observée sur des NK de la décidua et pourrait être la conséquence des NK migrant dans le tractus vaginal lors de la grossesse. De plus, les NK retrouvés dans le tractus génital féminin sont plus gros et plus granuleux que les NK sanguins. Enfin, tous les NK du tractus génital féminin sont capables de sécréter de l'IFN- γ (Mselle et al., 2007).

- Les polynucléaires Neutrophiles (PNN), sont présents dans tout le tractus génital, avec un nombre plus important dans les trompes de Fallope décroissant considérablement jusqu'au vagin. Ils sont présents dans les tissus en conditions normales, expriment les TLR 1 à 9 et éliminent rapidement les pathogènes en les phagocytant ou en sécrétant des composés antimicrobiens. Leur nombre et leur phénotype ne semblent pas varier selon le cycle menstruel.

Cependant, leur nombre va augmenter lors d'un début d'infection, les cellules épithéliales du tractus génital jouant alors un rôle primordial dans leur chimio-attraction. En effet, une étude a montré que la chimio-attraction des neutrophiles était due à la sécrétion d'IL-8 mais aussi de GM-CSF par les cellules épithéliales. En effet, lorsque des anticorps anti-IL-8 et anti-GM-CSF ont été rajoutés dans le milieu, la migration des neutrophiles avait diminué (Shen et al., 2004).

- Au niveau du système du complément, la voie des lectines est importante dans la sphère vaginale. La MBL (Mannose Binding lectin) est un CLR soluble capable d'opsoniser différents microorganismes et plus particulièrement *C. albicans* ; opsonisation qui déclenche alors la cascade du complément (Lillegard et al., 2006; Liu et al., 2006). La présence de C3 a été détectée au niveau vaginal mais pas celle de C1q. Le fait que la MBL mais pas le C1q se fixe sur des bactéries et des champignons vaginaux suggère que la voie des lectines et la voie classique du complément jouent un rôle différent dans la défense immunitaire du tractus génital féminin (Pellis et al., 2005).

- Les ILC vaginales n'ont pas encore été complètement décrites. Les ILC étant des cellules découvertes récemment, les études s'intéressent essentiellement à leur migration dans l'intestin, la peau et les poumons (Kim and Kim, 2016). Cependant, du fait de leur rôle dans la protection des muqueuses en combattant les infections et en assurant l'intégrité des tissus, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'ils ont également un rôle dans la protection de la muqueuse vaginale. De plus, quelques études se sont intéressées aux ILC lors d'une infection par le VIH et ont montré un déclin du nombre d'ILC dès le début de l'infection au niveau sanguin et intestinal (Klose and Artis, 2016; Mudd and Brenchley, 2016; Zhang et al., 2015). Une étude effectuée dans un modèle murin a montré la présence d'ILC2 dans la muqueuse vaginale de souris traitées par antibiotiques (Oh et al., 2016).

- Les Ly $T\gamma\delta$ sont présents au niveau de la sphère génitale de la souris, à la fois au niveau des muqueuses vaginales et utérines (Pinget et al., 2016; Rakasz et al., 1997). Chez la femme, les études sur ces cellules n'ont pas permis de les identifier dans la muqueuse vaginale, contrairement aux muqueuses endocervicales et utérines (Alcaide et al., 2016). Il en existe deux sous-populations, les GD1 (Gamma Delta) et les GD2. En condition homéostasique, les Ly GD1 sont des cellules de surveillance dans les tissus alors que les Ly GD2 se retrouvent en plus grand nombre dans le sang périphérique. Lors d'une activation initiée par des microorganismes, les GD2 peuvent cependant être recrutées du sang périphérique vers les tissus (Strbo et al., 2016).

- Les macrophages représentent environ 10% des leucocytes présents vaginalement. A ce niveau, leur présence n'est pas modifiée en fonction du cycle menstruel (Wira et al., 2005). D'un point de vue phénotypique, les macrophages vaginaux diffèrent de leurs homologues intestinaux. En effet, ils ressemblent plus aux monocytes en exprimant les marqueurs CD14, CD16, CD32, CD64 et CD89 ainsi que les récepteurs et corécepteurs du HIV-1 CD4, CCR5 et CXCR4. La présence de ces corécepteurs, induit la participation des macrophages vaginaux à l'entrée dans l'organisme et à la réplication du HIV-1 lorsqu'il a traversé la barrière épithéliale (Shen et al., 2009, 2014). La présence des macrophages au niveau vaginal semble donc une arme à double tranchant. En effet, ils ont un rôle primordial dans la capture et l'élimination d'agents infectieux, cependant, dans le cadre d'une infection par le VIH, ils permettent au virus de se répliquer et donc d'avoir un rôle néfaste.

1.2.3. Les cellules composant la réponse immunitaire adaptative vaginale

Bien que n'étant pas un organe structuré comme peut l'être le GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue), la muqueuse vaginale est considérée comme un tissu lymphoïde diffus faisant parti du MALT (Mucosa- Associated Lymphoid Tissue) (Yoshinaga et al., 2004). De plus, il a été montré que malgré son manque de structure, la muqueuse vaginale peut agir comme un site inducteur et participer à l'amorçage des Ly T CD8 naïfs et à l'expansion clonale des Ly T CD8 antigène-spécifique (Wang et al., 2015) (Figure 23).

1.2.3.1. La réponse lymphocytaire T CD4 vaginale

Comme nous avons pu le voir, les Ly T sont majoritairement situés dans les organes lymphoïdes secondaires où les DC migrent pour faire de la présentation antigénique. Cependant, ils sont aussi présents dans les muqueuses comme la muqueuse vaginale où ils sont situés dans la *lamina propria*. Ce sont les cellules immunitaires les plus représentées dans tout le tractus génital féminin (Hickey et al., 2011).

La polarisation lymphocytaire est orientée en fonction des cytokines sécrétées par les DC. Comme il existe plusieurs sous-populations de DC dans la muqueuse vaginale, il faut connaître leurs capacités sécrétoires pour connaître les sous-populations de Ly T pouvant être induites.

En condition homéostasique, il semblerait que les macrophages de cette muqueuse aient peu de capacité à induire de l'expansion clonale, à l'inverse des LC qui induiraient une forte expansion clonale, ainsi que les LP-DC. De plus, il a été montré que les moDC *in vitro* avaient les mêmes capacités d'induction de prolifération que les LC et les LP-DC (Duluc et al., 2013b).

Toujours en conditions homéostatiques, les LC et les CD14⁻ LP-DC secrèteraient essentiellement de l'IL-13 et de l'IL-15, peu d'IFN- γ et de TNF- α , polarisant ainsi des Ly T naïfs en Ly Th2. A l'inverse, les CD14⁺ LP-DC et les macrophages secrèteraient autant d'IFN- γ et de TNF- α que les cellules précédentes, cependant elles ne secrèteraient pas d'IL-13 ni d'IL-5, induisant une polarisation des Ly T naïfs en Ly Th1 (Duluc et al., 2013b). Bien qu'elles soient CD14⁺, nous avons considéré précédemment que ces DC se rapprochaient phénotypiquement des cDC2. Or, les cDC2 sont plutôt connues pour induire de la tolérance alors que les cDC1 sont plutôt inductrices de Th1 (Minarrieta et al., 2017). Enfin, dans les mêmes conditions aucune de ces quatre sous-populations n'était capable de sécréter de l'IL-17. Les moDCs sécrètent essentiellement de l'IFN- γ (Duluc et al., 2013b). Concernant, la production d'IL-17, il est maintenant connu que cette cytokine soit difficile à doser intracellulairement dans des Ly T. Les connaissances accrues concernant les Ly Th17, indiquent que d'autres cytokines comme l'IL-23 et l'IL-21 ont un rôle important dans le développement des Ly Th17. Il a été montré dans le chapitre 1, que l'IL-21 permettait d'accroître la production des Ly Th17 par l'activation d'une boucle autocrine. Or, il a été montré dans l'étude de Duluc *et al.*, que les LC et les LP-DC étaient capable de produire des Ly CD4 producteurs d'IL-21. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ces cellules sont représentatives des Ly Th17. Bien que ces Ly T CD4 soient peut-être des Ly Th17, leur absence en condition homéostasique pourrait être normale, car lors d'une grossesse, la présence de Ly Th17 serait impliquée dans des avortements spontanés, des pré-éclampsies et des accouchements prématurés (Ito et al., 2010; Lee et al., 2011; Toldi et al., 2011).

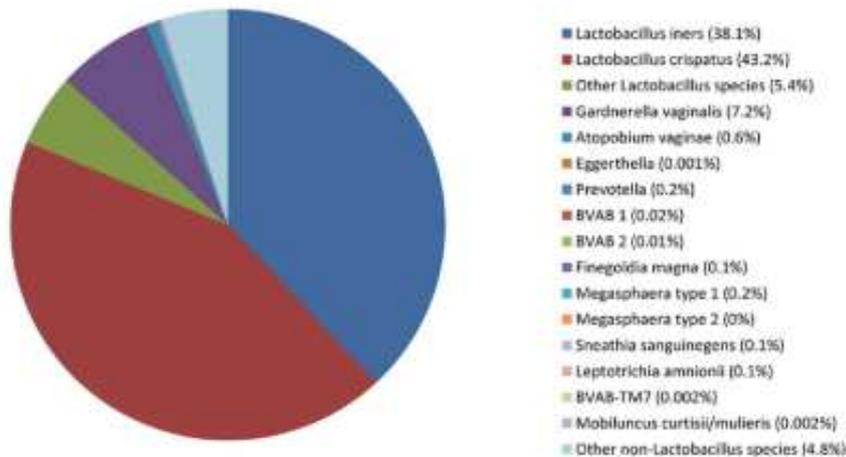
Lors d'une infection, il est possible de retrouver les différents types de réponse connue des Ly T. Dans un modèle murin, des clones de Ly T CD4 spécifique de *Chlamydia trachomatis* ont une réponse de type Th1 (Roan et al., 2006). De même, en réponse au virus de l'herpès HSV-2, une réaction inflammatoire se fait à partir des Ly Th1. Les Th17 jouent un rôle dans l'immunité vaginale car il a été montré qu'une infection à *C. albicans*, induisait une réponse forte des Ly Th17 (Conti and Gaffen, 2010). Les Ly Th17 sont aussi produits dans les premiers instants d'une infection par le VIH (Yue et al., 2008).

La présence de Ly Treg permet de limiter l'inflammation pour éviter d'endommager les tissus et de réguler la balance du trafic des cellules effectrices entre les sites d'induction et les sites d'infection (Lund et al., 2008). Les Ly Treg ont leur rôle habituel, retrouvé dans d'autres tissus, à savoir contrôler l'inflammation. Cependant, au niveau du tractus génital, ils ont un rôle primordial lors de la grossesse dans le développement et de la tolérance d'un fœtus semi-allogénique. En effet, il a été montré que la concentration en Ly T reg CD4⁺ CD25⁺ augmente localement et dans le sang dès les premiers temps de la grossesse (Somerset et al., 2004). Une étude portant sur des femmes ayant subi des avortements spontanés a montré que la concentration en Ly T CD4⁺ CD25⁺ était plus faible que chez les femmes ayant eu une grossesse normale (Sasaki et al., 2004). Enfin, un microbiote vaginal sain est capable d'induire de la tolérance (Nibali and Henderson, 2016).

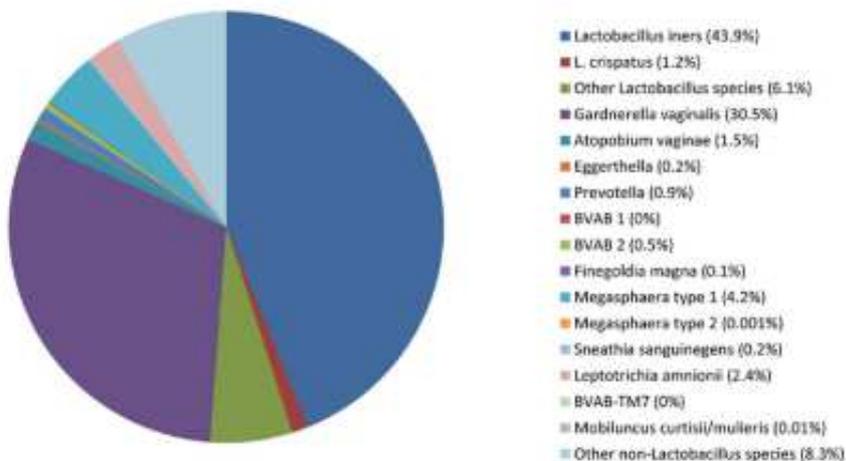
1.2.3.2. La réponse humorale vaginale

La réponse humorale est caractérisée par la sécrétion d'anticorps qui se fixent sur les pathogènes et inhibent le passage à travers l'épithélium. La fixation des anticorps sur les pathogènes induit leur élimination par phagocytose médiée par les PNN ou les macrophages ou par l'activation du système du complément. L'une des particularités de la réponse immunitaire vaginale, est que la réponse humorale, contrairement aux muqueuses digestives et respiratoires qui produisent de grandes quantités d'IgA sécrétoires, est induite par la sécrétion majoritaire d'IgG sécrétoires (Hickey et al., 2011). Au niveau vaginal la sécrétion d'IgG est deux à six fois plus importante que la sécrétion d'IgA (Kaushic and Wira, 2007). Les IgG diffusent selon un gradient d'oestradiol du sang vers les tissus puis vers la lumière du vagin. Leur diffusion est passive de façon paracellulaire ou médiée par le récepteur Fc néonatal (FcRn) (Knee et al., 2005). Cette transcytose est bidirectionnel et dépendante du pH (Lu et al., 2011). Le mécanisme d'action précis des IgG sécrétés dans la lumière vaginale n'est pas tout à fait connu. Elles travailleraient en tandem avec le mucus pour s'accumuler à la surface des pathogènes. Elles créeraient des ponts avec la mucine pour diffuser rapidement à travers le mucus et s'accumuler (Wang et al., 2014). La sécrétion d'IgA du tissu vers la lumière se fait quant à elle par transcytose, dépendante du niveau d'expression du récepteur polymérique des immunoglobulines (pIgR). Ce niveau varie en fonction du cycle menstruel (Sullivan and Wira, 1984).

Controls



Intermediate



BV

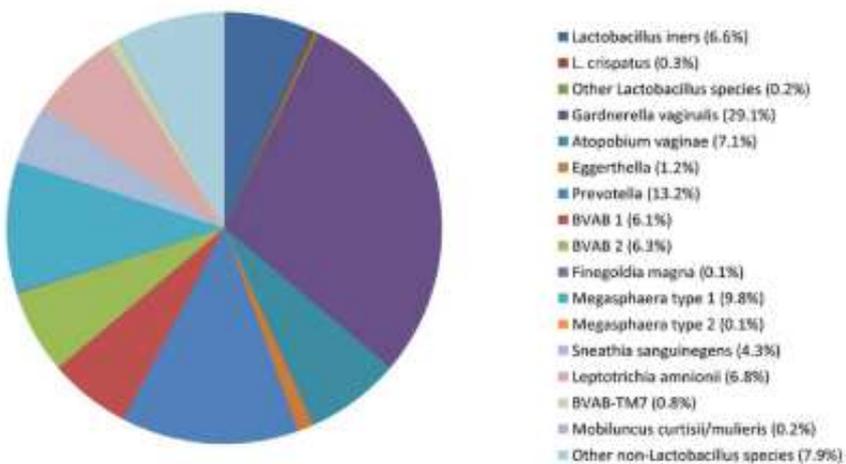


Figure 30. Constitution de la flore vaginale saine, à l'état intermédiaire et de la flore vaginale de femmes ayant une vaginose bactérienne déclarée (D'après Shipitsyna et al., 2013).

La physiologie du tractus vaginal est complexe et différente à la fois de la physiologie du reste du tractus génital et de celle de l'intestin. Il est donc intéressant de voir comment se comporte le système immunitaire vaginal dans une situation pathologique très courante caractérisée par une altération de la flore vaginale, la vaginose bactérienne. Une bactérie serait cruciale dans la création d'un environnement propice à l'apparition de cet état, *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*).

2. La vaginose bactérienne

La vaginose est l'infection génitale basse la plus fréquente chez la femme en âge de procréer. Elle est considérée comme une dysbiose de la flore vaginale et est asymptomatique dans 50 à 70 % des cas. L'étiologie est mal connue mais mettrait en jeu de multiples facteurs. Il existe au cours de cet état un déséquilibre de la balance entre la quantité de lactobacilles commensaux et la flore anaérobie. Plus précisément, il y a une diminution accrue des lactobacilles et l'augmentation d'une flore anaérobie polymorphe dominée par *G. vaginalis*. Nous traiterons aussi du diagnostic, des symptômes, des complications, ainsi que des traitements. Enfin dans une dernière partie nous détaillerons la réponse immunitaire associée à la vaginose.

2.1. La vaginose bactérienne est une dysbiose de la flore vaginale

Lors d'une vaginose bactérienne, la flore de lactobacilles producteurs d' H_2O_2 diminue quantitativement et qualitativement pour laisser place à une flore anaérobie très diverse. Avant d'avoir une vaginose déclarée, il apparaît une flore de transition dominée par le *L. iners*. En effet, *L. iners* est le seul lactobacille qui reste présent en grande quantité (environ 40% de la flore) lors du début de la vaginose et reste même détectable lors d'une vaginose avérée (environ 6%) (Shipitsyna et al., 2013) (Figure 30). Le fait que cette souche puisse rester présente lors de l'installation d'une vaginose est probablement due au fait qu'elle n'est pas productrice d' H_2O_2 et donc peu nocif pour les autres bactéries. De plus, il est possible que certaines souches codant pour des lysines formant des pores dans les cellules épithéliales puissent favoriser les dysbioses (Petrova et al., 2016). La présence de *L. iners* dans une flore de transition est à différencier du groupe III définie par Ravel *et al* (Cf 1.1.1. de ce chapitre), correspondant à une flore normale dans plus de 40% de la population asiatique (Figures 24 et 25). Il est notable que *G. vaginalis*

qui représente à l'état normal environ 7 % de la flore commensale est présente à hauteur de 30% lors d'une vaginose déclarée (Figure 30). La croissance de *G. vaginalis* dans la sphère vaginale permet ensuite à *Prevotella bivia* et à *Atopobium vaginae* de se multiplier et de représenter à elles trois, 50% de la flore vaginale. Les techniques d'identification modernes ont pu montrer qu'une dizaine d'autres espèces bactériennes anaérobies présentes en très faibles quantités dans la flore normale (autour de 0,1% voire moins) se développent lors de cette dysbiose : BVAB 1 et 2 (BV-associated bacteria), *Leptotrichia aminonii*, *Megasphaera* type I, *Mobiluncus*..... Du fait de la présence de ces espèces bactériennes en très faibles quantités dans la flore normale et non par des bactéries exogènes, la vaginose n'est pas considérée comme une infection classique. C'est pourquoi nous parlerons essentiellement de dysbiose de la flore.

La modification de la flore et le déséquilibre engendré s'explique par le déclin des lactobacilles commensaux qui comme nous l'avons vu sont producteurs d'acide lactique. La diminution de l'acide lactique intra-vaginale entraîne une augmentation du pH favorisant la croissance des bactéries anaérobies citées précédemment.

2.2. *G. vaginalis* et son rôle dans l'apparition de la vaginose bactérienne

G. vaginalis a été découverte au début des années 1950, cependant sa caractérisation a été longue. Considérée dès sa découverte en 1953 comme une espèce de type *Haemophilus* (H.), elle a porté le nom de *H. vaginalis* à partir de 1955, lorsque Gardner découvrit son rôle dans la vaginose (Gardner and Dukes, 1955; Leopold, 1953). Elle a ensuite été temporairement classée dans les *Corynebacterium*. C'est en 1980 que Greenwood et Pickett ont remarqué qu'il manquait à cette bactérie plusieurs critères appartenant à ce genre et proposa de nommer un nouveau genre *Gardnerella* en référence à l'auteur initial, Gardner dont *G. vaginalis* serait la seule représentante (Greenwood and Pickett, 1980).

Il était alors mention de théorie mono-microbienne de la vaginose avec *G. vaginalis* comme agent responsable de la vaginose. Les nouvelles techniques d'identification moléculaire ont permis d'identifier un grand nombre de bactéries présentes lors d'une vaginose. Ceci a permis de développer la théorie poly-microbienne à partir des années 80. Dans cette théorie acceptée durant 20 ans, *G. vaginalis* agit en synergie avec les autres bactéries anaérobies pour induire la vaginose (Josey and Schwebke, 2008). Néanmoins, ces dernières années, il y a eu un regain d'intérêt pour l'importance de *G. vaginalis* dans la physiopathologie de la vaginose du fait de l'existence de facteurs virulence caractéristiques et de la démonstration de son implication dans la persistance de cette dysbiose, du fait de son rôle prépondérant dans la formation d'un biofilm

vaginal (Swidsinski et al., 2008). Avant de décrypter ces facteurs de virulence, la bactériologie complexe de *G. vaginalis* sera expliquée dans le sous-paragraphe suivant.

2.2.1. Mécanismes bactériologiques de *G. vaginalis*

Après de multiples études et débats concernant sa structure, c'est Sadhu *et al* en 1989 qui détermina que *G. vaginalis* a une organisation de type Gram positif, mais que sa membrane inhabituellement fine a souvent induit en erreur les résultats des colorations de Gram qui sont négatives ou variables. De plus, elle ne contient pas de LPS sur sa membrane (sadhu K, 1989). La paroi très fine présente une structure fibrillaire et présente des particules non identifiées mais similaires à ce qui a pu être observé sur des bactéries à gram positif comme *Bacillus subtilis*. Ces structures sont observées sur *G. vaginalis* cultivée en biofilm mais pas sous forme planctonique (Muli, 1999). De plus, cette structure fibrillaire favorise son attachement aux cellules épithéliales, d'où la formation de Clue-cells (Scott et al., 1989). Les Clue-cells sont des cellules épithéliales recouvertes de bactéries anaérobies dont *G. vaginalis*. La variation de son génome est très importante selon les souches étudiées mais d'après Yeoman *et al*, *G. vaginalis* serait proche du genre *Bifidobacterium* et plus précisément des espèces *B. coryneforme* et *B. minimum* (Yeoman et al., 2010). Elle présente la caractéristique d'encoder des toxines bactéricides et de sécréter des enzymes dégradant la mucine, qui avec sa capacité à former des biofilms forment trois facteurs de virulence. Cependant, il est possible de retrouver différentes formes de *G. vaginalis*, plus ou moins pathogènes en fonction de l'expression de ces facteurs de virulence. Des études du génome d'une souche prélevée chez une femme saine, indique qu'elle est moins cytotoxique qu'une souche prélevée chez une femme ayant une vaginose alors que leur code génétique pour la cytotoxine en question n'est différent que d'un acide aminé (Harwich et al., 2010).

2.2.2. Facteurs de virulence de *G. vaginalis* et rôle dans l'étiologie de la vaginose bactérienne

Il a été démontré que certaines souches de *G. vaginalis* présentes vaginalement ont trois facteurs de virulence qui pourrait expliquer le rôle et la persistance de *G. vaginalis* dans l'étiologie de la VB.

- *G. vaginalis* a la capacité à adhérer aux cellules épithéliales vaginales contrairement à d'autres bactéries anaérobies comme *A. vaginae* ou encore *P. bivia* (Gilbert et al., 2013; Patterson et al., 2010). D'après Yeoman *et al*, cette adhésion semble être le facteur de virulence principal. En effet, les souches de *G. vaginalis* analysées n'ayant pas cette capacité n'induisaient pas de symptômes.

- *G. vaginalis* forme un biofilm épais et très résistant (Patterson et al., 2010). Cette conformation en biofilm lui permet de résister à la fois à de fortes concentrations d' H_2O_2 et d'acide lactique, ce qui peut expliquer sa présence de façon commensal (Patterson et al., 2007). Ce biofilm permet aussi de résister *in vivo* à des traitements répétés d'antibiotiques (Swidsinski et al., 2008, 2013). Ceci lui confère un rôle primordial dans les récurrences de la dysbiose. Enfin, le biofilm formé intègre en son sein d'autres bactéries pathogènes anaérobies comme *A. vaginae* et la présence de ces autres bactéries augmente la croissance de ce biofilm (Swidsinski et al., 2005). *G. vaginalis* est la bactérie prédominante dans ces biofilms. Les autres bactéries ne seraient pas capable de produire de biofilms par elles-mêmes (Alves et al., 2014). Les souches les plus pathogènes de *G. vaginalis* codent pour des protéines associées aux biofilms (BAP) (Harwich et al., 2010). Ceci indique que sa capacité à former des biofilms confère à *G. vaginalis* un rôle prépondérant dans la pathogénicité de la vaginose bactérienne

- *G. vaginalis* est la seule souche parmi les huit souches étudiées, dont *A. vaginae* et *P. bivia*, dans l'étude de Patterson en 2010 qui montre un effet cytotoxique sur les épithéliales avec une lyse complète *in vitro* de la monocouche en 4 heures. Les autres bactéries étudiées, associées à la VB, ne produisent pas de cytolysine. L'action cytotoxique serait essentiellement due à la sécrétion de vaginolysine capable de créer des pores dans la membrane des cellules épithéliales conduisant à la mort cellulaire (Patterson et al., 2010).

Ces trois caractéristiques permettent donc à *G. vaginalis* d'adhérer aux cellules épithéliales sans être dégradée par l'environnement, de former un biofilm la protégeant des traitements antibiotiques et d'attaquer la membrane épithéliale vaginale en sécrétant la vaginolysine. Ces trois facteurs faisant de *G. vaginalis* un candidat privilégié dans l'étude de la compréhension de l'étiologie de la vaginose (Schwebke et al., 2014). De plus, certaines souches de *G. vaginalis* semblant plus pathogènes que d'autres codent pour des protéines Rib qui permettent d'éviter chez d'autres pathogènes (streptocoques) une réponse du système immunitaire en altérant les antigènes de surface (Harwich et al., 2010; Yeoman et al., 2010). Ces modèles d'évitement n'ont pas été démontrés en étudiant *G. vaginalis*, mais classiquement dans d'autres modèles. En effet,

les protéines Rib sont connues pour se trouver à la surface des streptocoques du groupe B au niveau vaginal, ce qui leur confère cet effet protecteur contre les réponses immunitaires (Stålhammar-Carlemalm et al., 1993). Par exemple, il a été montré une association entre la présence de protéines Rib sur ces bactéries et la faible concentration d'IgG dosée dans le sérum maternel (Larsson et al., 2006).

2.3. Les réactions immunitaires associées à la vaginose bactérienne

Le déséquilibre de la flore et la croissance de ces bactéries anaérobies a un impact sur le système immunitaire vaginal. Il y a peu d'études qui se sont intéressées aux caractéristiques de la réponse immunitaire induite lors de la vaginose. La plupart des équipes que nous allons mentionner s'étant intéressées à l'immunité de la femme en réponse à une vaginose, ont prélevé du liquide cervico-vaginal *in vivo*, et l'ont mis en contact de lignées cellulaires *in vitro* ou ont dosé les cytokines présentes dans ce liquide. Il existe une certaine hétérogénéité dans les résultats exprimés du fait de la diversité du microbiote des hôtes ainsi que de la différence dans le design des études sur le sujet (Mitchell and Marrazzo, 2014). Par exemple, des cytokines ont pu être dosées dans certaines études mais pas dans d'autres. C'est ce à quoi nous nous intéresserons dans un premier paragraphe. Dans un second temps seront présentées quelques études ayant étudiés l'effet spécifique d'une bactérie associée à la vaginose bactérienne.

2.3.1. Activation du système immunitaire par le liquide cervico-vaginal

2.3.1.1. Détection par les PRR et réponse cytokinique

La réponse immunitaire innée débute par la détection des antigènes par les cellules épithéliales et d'autres cellules de l'immunité innée présentes dans l'épithélium grâce aux PRR dont elles sont équipées. Les PRR étudiés dans ce cas sont les TLR, essentiellement les TLR 2 et 4. Deux études de 2005 et 2008 ont montré, par prélèvement de liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose l'induction d'une surexpression de TLR 2 dans une lignée monocyttaire, les THP-1, et dans des PBMC par rapport au liquide cervico-vaginal de femmes saines (Mares et al., 2008; Zariffard et al., 2005). La surexpression de TLR2 permettrait de stimuler le NF- κ B de manière IL-8-dépendante. Ces deux études ne sont pas d'accord au sujet de l'induction d'une surexpression de TLR 4 sur ces mêmes cellules, avec pour Zariffard *et al.*

une surexpression TNF- α -dépendante mais pas de surexpression pour Mares *et al.*. Dans l'étude de Zariffard *et al.*, les auteurs se sont aussi intéressés à des lignées cellulaires épithéliales de l'endomètre HEC-1A et HEC-1B. Il n'y aurait pas d'augmentation de leur expression en présence de liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose. La différence de résultats entre ces deux études faites par le même laboratoire, pourrait s'expliquer par l'origine des femmes ayant bénéficié des prélèvements vaginaux. En effet, la première étude a été effectuée chez des femmes américaines et la seconde chez des femmes brésiliennes. Or, il a été montré que la différence d'origine joue un rôle sur la composition de la flore vaginale normale. La stimulation des TLR par des bactéries qui la composent peut alors être différente, ce qui pourrait expliquer les résultats divergents obtenus par ces auteurs (Mares *et al.*, 2008; Zariffard *et al.*, 2005). Ces deux études ont donc été menées sur des stimulations de cellules *in vitro*. Concernant la réponse immunitaire apportée par les cellules épithéliales, il a été démontré une association entre l'expression vaginale de SLP1 avec la présence de micro-organismes caractéristiques d'une vaginose (Nasioudis *et al.*, 2015). De plus, l'expression de β -défensine 2 est associée à colonisation de l'épithélium vaginal par *L.iners*, *A. vaginae*, *P. bivia* et *L. jensenii*, mais pas *G. vaginalis* (Doerflinger *et al.*, 2014; Valore *et al.*, 2006). Le dosage de cytokines directement à partir de prélèvements cervico-vaginaux indique que la sécrétion d'IL-8 n'est pas ou très peu augmentée chez les femmes ayant une vaginose par rapport aux femmes n'en ayant pas, bien que ce résultat ne fasse pas l'objet d'un consensus (Basso *et al.*, 2005; Cauci *et al.*, 2003; Fichorova *et al.*, 2013). L'absence de PNN chez la plupart des femmes avec une vaginose est probablement due au manque d'induction de la sécrétion d'IL-8. En effet, la faible concentration d'IL-8 induit un défaut de la défense immunitaire locale, car elle ne permet pas le recrutement des PNN, ce qui est une des caractéristiques de la vaginose qui est peu inflammatoire. A l'inverse, il y a un consensus sur l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 α et d'IL-1 β lors d'une vaginose (Anton *et al.*, 2008; Cauci *et al.*, 2003; Donders *et al.*, 2000; Platz-Christensen *et al.*, 1993; Sturm-Ramirez *et al.*, 2000). Cette sécrétion d'IL-1 β est corrélée à la présence des enzymes hydrolytiques sialidases et prolidases. De plus ces enzymes sécrétées par les bactéries associées à la vaginose sont négativement corrélées au ratio IL-8/IL-1 β . Une étude clinique récente a confirmé cela, en montrant que le liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose contient une concentration supérieure de l'IL-1 β mais pas de l'IL-6 ni de l'IL-8 comparé au liquide cervico-vaginal de femmes n'ayant pas d'infections (Marconi *et al.*, 2014). En revanche, une infection à *Chlamydia trachomatis* associée à la vaginose induit une augmentation de sécrétion de l'IL-1 β , mais aussi de l'IL-6 et de l'IL-8. Enfin, il a été montré que la vaginose induisait une diminution des Ly Ty δ 1 (GD1), présents essentiellement dans les

tissus suivi d'une augmentation des GD2, présents essentiellement dans le sang. Les GD1 étant intra-épithéliaux, contribuent aux premières étapes de la réponse immunitaire lors d'une infection. L'augmentation des GD2 exprimant CCR5 (Corécepteur du VIH) de façon plus importante que les GD1, pourrait conduire à un risque accru d'infection par le VIH (Alcaide et al., 2016; Strbo et al., 2016). Comme nous le verrons (Cf 2.6.3.) la vaginose est un facteur augmentant le risque d'infection par le VIH. C'est pourquoi, il est important de détecter et de soigner correctement cette pathologie.

2.3.1.2. Réponse apportée par les cellules dendritiques

Pour notre travail il est important d'analyser ce qu'il se passe au niveau de la réponse apportée par les DC. Cependant, une seule étude porte sur le sujet (St. John et al., 2007). Ils ont étudié l'effet du liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose déclarée et de femmes saines, sur des moDC, en analysant les sécrétions cytokiniques et la prolifération lymphocytaire. Le liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose induit l'augmentation de l'expression de CD83, CD40 et HLA-DR qui sont des marqueurs de maturation et d'activation des DC. Le taux d'expression des marqueurs CD83 et CD40 après mise en contact des moDC avec du liquide cervico-vaginal de femmes saines atteint 25% de l'expression de ces marqueurs induite par 1µg/mL de LPS. En revanche, le taux d'expression des marqueurs CD83 et CD40 après mise en contact des moDC avec du liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose atteint 50% de l'expression de ces marqueurs induite par 1µg/mL de LPS. La maturation des moDC a donc doublé, c'est pourquoi les auteurs concluent que le liquide cervico-vaginal induit une maturation de ces cellules. Nous parlerons plutôt ici de semi-maturation. De plus, à cette semi-maturation, s'ajoute une augmentation significative de la concentration des trois cytokines dosées (IL-12p40, IL-12p70 et IL-23), présentes dans le surnageant de culture des moDC au contact de liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose. Les auteurs concluent donc à un effet inflammatoire du liquide cervico-vaginal des femmes ayant une vaginose. Les cytokines sécrétées dans cette étude sont pro-inflammatoires, pro-Th1 et pro-Th17. Cependant, il aurait pu être intéressant, dans le but d'étudier la balance IL-10/IL-12 et juger d'un effet inflammatoire ou non de doser des cytokines comme l'IL-10 et le TGF-β, qui sont deux cytokines anti-inflammatoires.

2.3.1.3. Réponse apportée par les lymphocytes

St John *et al.*, ont étudié la prolifération lymphocytaire induite par le liquide cervico-vaginal grâce à un modèle de MLR (Réaction Leucocytaire Mixte) allogénique. Les PBMC stimulées sont déplétées en cellules adhérentes (monocytes). Dans ce modèle, le liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose induit une prolifération des PBMC accrue par rapport au liquide cervico-vaginal de femmes saines. Le liquide cervico-vaginal de femmes saines induit une prolifération des Ly T CD4 et des Ly T CD8 de 9 % pour ces deux types de cellules alors que cette prolifération atteint 42 % et 54 % respectivement au contact de moDC ayant mûri en présence de liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose (St. John *et al.*, 2007).

Une seconde équipe s'est intéressée à la distribution des populations de lymphocytes T *in vivo* chez des femmes étant séropositives pour le VIH avec ou sans vaginose. Ils ont conclu de leurs prélèvements que les femmes séropositives ayant une vaginose de façon concomitante ont un compte de Ly T CD4 et CD8 augmenté avec un ratio CD4/CD8 qui est cependant diminué ainsi qu'une proportion moindre de Ly Treg par rapport aux Ly T totaux, en comparaison avec les femmes séropositives sans vaginose (Schellenberg *et al.*, 2012). La vaginose a donc un effet sur la distribution des Ly T. Cette étude ne fait pas mention des autres sous-populations lymphocytaire T. C'est le cas d'une dernière étude qui traite de la sécrétion d'IL-17 dans le tractus génital de femmes n'ayant pas le VIH lors d'infections vaginales. Les prélèvements de liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose ne présentent pas d'augmentation de la concentration d'IL-17 en leur sein par rapport à des femmes non infectées (Masson *et al.*, 2015).

Il y a donc un effet de la vaginose sur la réponse immunitaire avec, la sécrétion de cytokines, l'activation et la modulation du système immunitaire adaptatif. D'autres laboratoires se sont intéressés aux bactéries présentes en nombre lors d'une vaginose comme *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *P. bivia* et *M. hominis* (*Mycoplasma hominis*) qui sont les principaux constituants du biofilm formé (Swidsinski *et al.*, 2005). Ces études permettent de comprendre l'effet individuel de ces bactéries principalement rencontrées lors d'une vaginose bactérienne sur la réponse immunitaire.

2.3.2. Réponse spécifique de certaines bactéries associées à la vaginose

2.3.2.1. *Gardnerella vaginalis*

G. vaginalis étant la bactérie principalement impliquée dans la mise en place d'une flore anormale lors d'une vaginose, il est intéressant d'analyser les effets que peut avoir cette bactérie sur le système immunitaire. Bien qu'elle soit primordiale dans la mise en place d'une flore anaérobie, il y a encore très peu d'études sur la réponse immunitaire induite par cette bactérie. Dans une lignée monocyttaire THP-1, *G. vaginalis* montre une augmentation de la sécrétion de TNF- α , une légère augmentation de l'expression de TLR 4 et une très légère augmentation de l'expression de TLR 2 (Zariffard et al., 2005). Dans une autre étude plus récente où *G. vaginalis* est mise vivante au contact d'une lignée monocyttaire THP-1 pendant 24 heures à une MOI de 5-10, il a été montré qu'elle induit l'expression de l'inflammasome NLRP3 et augmente la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-8 (Vick et al., 2014). A l'inverse, dans une étude menée par Libby *et al.*, sur une lignée de cellules épithéliales vaginales VK2, *G. vaginalis* inactivée n'a pas d'effet sur la sécrétion d'IL-8 et induit une légère expression d'IL-6 (quatre fois inférieure à celle d'*A. vaginae*) (Libby et al., 2008).

2.3.2.2. *Atopobium vaginae*

A. vaginae a été étudié dans différents modèles *in vitro* et mis au contact de cellules épithéliales vaginales VK2 ou V19 (Doerflinger et al., 2014; Fichorova et al., 2013; Libby et al., 2008). *A. vaginae* est capable d'augmenter l'expression de certains gènes, essentiellement des facteurs de transcription et des cytokines pro-inflammatoires. En effet, *A. vaginae* au contact de cellules épithéliales augmente l'expression d'IRF1, d'IRAK2, du NF- κ B, et la sécrétion de plusieurs cytokines dont l'IL-6, l'IL-8, les TNF- α et l'IL-1 β . De plus, cette bactérie stimule la sécrétion de CCL20, qui est chimio-attractante pour les Ly T et les DC, de β -défensine 2, de MUC1 (Mucine 1) et de RANTES. D'après Libby *et al.*, la sécrétion d'IL-8 est médiée par le TLR2.

2.3.2.3. *Prevotella bivia*

Doerflinger, dans une même étude, a analysé en parallèle l'effet d'*A. vaginae* et de *P. bivia*. Cette bactérie semble moins virulente et moins pathogène que la précédente. En effet, dans cette étude la sécrétion de β -défensine est la seule augmentation significative observée avec *P. bivia*, bien qu'elle soit capable, tout comme *A. vaginae* de coloniser l'épithélium vaginal plus rapidement que des souches de lactobacilles. Le fait que *P. bivia* contienne beaucoup de LPS à sa surface aurait pu faire penser à un effet pro-inflammatoire de plus grande ampleur (Aroutcheva et al., 2008).

2.3.2.4. *Mycoplasma hominis*

M. hominis est souvent associée avec *G. vaginalis* lors d'une vaginose (Cox et al., 2016). Dans une étude citée précédemment l'effet de *M. hominis* sur la lignée THP-1 et sur des PBMC a été étudié (Zariffard et al., 2005). Cette bactérie induit une sécrétion de TNF- α par les THP-1 et les PBMC, mais ne modifie pas ou très peu l'expression des TLR2 et 4 sur ces cellules. La présence de mycoplasme lors d'une vaginose induit l'augmentation d'IL-6 et d'IL-8 dans le liquide cervico-vaginal (Ryckman et al., 2008).

Nous avons vu que ces bactéries pathogènes se développent lors d'un déclin des lactobacilles. Il existe certains facteurs de risque pouvant expliquer cette diminution des lactobacilles.

2.4. Les facteurs de risque de la vaginose bactérienne

2.4.1. Les relations sexuelles

Les éléments obtenus après de multiples études ne sont pas concordants sur le fait que la vaginose soit considérée comme une IST (Infection Sexuellement Transmissible). D'après une méta-analyse datant de 2008, le fait d'avoir de multiples partenaires sexuels homme ou un nouveau partenaire augmente de 1,6 fois le risque d'avoir une vaginose (Fethers et al., 2008). De plus, toujours d'après cette méta-analyse, une relation sexuelle homosexuelle augmente le risque de déclarer une vaginose par 2. Ce qui fournit deux arguments en faveur de l'IST. Cependant, l'absence du port du préservatif n'est pas corrélée avec une augmentation des vaginoses chez les femmes. Dans six études ayant traité les hommes contre la vaginose de leur

partenaire, cinq n'ont pas réduit le nombre de récurrences de vaginoses. Il semblerait donc que le fait de déclarer une vaginose après une relation avec un partenaire masculin ne soit pas dû à la transmission d'agents pathogènes, ne faisant pas de la vaginose une IST. Les avis favorables ou non favorables à l'IST divergent donc. Cependant, le coït en lui-même peut-être un facteur de risque de la vaginose. Le coït, par son action mécanique et la dégradation de la flore qui s'en suit apparaît comme un potentiel perturbateur de l'équilibre vaginal. Une autre théorie propose que le sperme étant alcalin, il puisse induire une augmentation rapide du pH et perturber la flore commensale. Le temps de présence au niveau vaginal étant court, cette théorie suppose la présence d'autres facteurs (Leppäluoto, 2011). Enfin, il existe une haute prévalence de vaginoses chez de jeunes adolescentes vierges indiquant qu'une relation sexuelle à la fois homme-femme et femme-femme peut être un facteur de risque pour déclencher une vaginose mais pas l'unique facteur.

2.4.2. Le mode de vie

Comme mentionné auparavant, des bactéries associées à la vaginose sont présentes à l'état normal et n'induisent pas de vaginose. Certaines femmes resteront asymptomatiques et d'autres déclencheront une vaginose. Il est donc probable qu'il y ait une étiologie associée au mode de vie de l'hôte. La douche vaginale, pratique plus ou moins courante dans certains pays, est un facteur de risques dans de multiples infections vaginales, y compris le virus du SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise). Une étude prospective a montré qu'un lavage par une douche vaginale est associé à une augmentation par deux du risque de développer une vaginose et que cette augmentation est indépendante d'autres cofacteurs (Ness et al., 2002; Hawes et al., 1996). La sécrétion d'hormone et l'augmentation du niveau d'œstradiol dérègle à la fois les cellules épithéliales, la flore commensale et le système immunitaire. Le cycle menstruel joue donc un rôle dans la vaginose (Taylor-Robinson, 2008). Une étude suédoise a démontré que le fait d'être fumeuse est un facteur de risque de développer une vaginose (Brotman et al., 2014; Hellberg et al., 2000). Enfin, l'utilisation d'antibiotiques en raison d'une autre infection bactérienne, pas obligatoirement vaginale, peut induire une perte qualitative et quantitative des bactéries de la flore commensale.

Tableau 5. Représentation du calcul du score de Nugent après observation microscopique du prélèvement vaginal.

Morphotypes (immersion objectif 100)	Quantité / Champ				
	> 30	6 à 30	1 à 5	< 1	0
Morphotypes lactobacilles (L)	0	1	2	3	4
Morphotype anaérobies et <i>Gardnerella</i> (G)	4	3	2	1	0
Morphotypes mobilincus (M)	2	2	1	1	0

Score ≤ 3 : flore normale

Score 4-6 : flore intermédiaire

Score ≥ 7 : vaginose bactérienne

2.5. Symptômes et diagnostic de la vaginose

Environ 50 % des cas de vaginose sont asymptomatiques. Les autres 50 % présentent un ensemble de signes évocateurs, dont la caractéristique est d'être globalement peu inflammatoire. Le score clinique d'Amsel est utilisé cliniquement pour identifier ces critères. Ils sont au nombre de quatre (Amsel et al., 1983) :

- Des leucorrhées blanchâtres, épaisses adhérant à la muqueuse vaginale
- Une odeur caractéristique d'amine, dite de « poisson pourri » (traduction de l'anglais "smelly fish") qui est soit spontanée soit qui apparaît après ajout de KOH 10% (Hydroxyde de Potassium) aux sécrétions vaginales

Ces deux premiers critères sont observés par la patiente et confirmés par le médecin. Les deux critères suivants nécessitent un examen.

- Un pH supérieur à 4,5, caractéristique d'une flore pauvre en lactobacilles
- La présence de Clue-cells à l'examen microscopique. Bel exemple de la capacité de *G. vaginalis* à adhérer aux cellules épithéliales vaginales

La vaginose peut aussi être déterminée par un décompte microscopique de trois morphotypes bactériens présents au sein de la flore vaginale : les lactobacilles, les *Mobilincus* et les bactéries anaérobies dont *G. vaginalis* (Tableau 5). Cet analyse microscopique après prélèvement gynécologique est appelé score de Nugent et permet de déterminer si la flore est normale, si elle est caractéristique d'une flore intermédiaire ou d'une vaginose (Nugent et al., 1991). Un score de 1 à 3 correspond à une flore normale, un score de 4 à 6 correspond à une flore intermédiaire, et un score de 7 à 10 correspond à une vaginose.

Il existe d'autres tests qui ont été mis au point plus ou moins récemment dans le but de rendre un diagnostic plus précis que ces deux scores en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Ces tests sont basés sur l'identification microbienne de *G.vaginalis* (Affirm VP microbial identification test), sur la présence d'enzyme spécifique de la vaginose (BVBlue test), ou encore sur la détection d'ADN spécifique de *G. vaginalis* par RT-PCR (Bradshaw et al., 2005; Briselden and Hillier, 1994; Cartwright et al., 2012; Hilbert et al., 2016; Menard et al., 2008; Myziuk et al., 2003; Sumeksri et al., 2005). Plus récemment une équipe portugaise proposait d'utiliser la technique de PNA-FISH (Peptide nucleic acid fluorescence *in situ*

hybridization) dans le but de marquer des lactobacilles et *G. vaginalis* sur des lames de microscopie permettant par la suite d'obtenir un score de Nugent (Machado et al., 2015). Le PNA-FISH ayant une sensibilité de 84.6% et une spécificité de 97.6% alors que le score de Nugent traditionnel après une coloration de Gram a des scores de 64.3% et 92.6% respectivement. Toujours en 2015, une équipe a créé un multiplex PCR (M-PCR) pour screener simultanément treize bactéries associées à la vaginose bactérienne (Malaguti et al., 2015).

Bien que certaines femmes puissent ressentir une légère gêne essentiellement due à l'odeur d'amine, la grande majorité ne ressentira pas d'inconfort. En cela, cette pathologie est atypique et différente d'une infection classique car elle induit peu d'inflammation et de prurit. Bien qu'il existe toujours un débat, certains auteurs préfèrent parler de dysbiose que d'infections. La vaginose bactérienne est généralement opposée à la vaginite (infection vaginale à *C. albicans*) qui est au contraire très fortement inflammatoire et qui induit de fortes démangeaisons.

2.6. Complications de la vaginose bactérienne

Outre l'odeur caractéristique citée précédemment, qui en cas de récurrences peut devenir très dérangeante, les complications de la vaginose sont d'ordres obstétricaux mais résident aussi dans le risque de développer des infections sexuellement transmissibles comme le VIH.

2.6.1. Le risque d'accouchement prématuré

L'accouchement prématuré qui a lieu après le 6^{ème} mois de grossesse est à distinguer des fausses couches tardives qui arrivent entre la fin du premier trimestre et le début du 6^{ème} mois de gestation et des fausses couches précoces qui surviennent durant le premier trimestre. De très nombreux groupes de recherches ont étudié le lien entre une dégradation de la flore commensale, l'apparition d'une flore intermédiaire ou d'une vaginose déclarée et les accouchements prématurés. Une méta-analyse datant de 2007 a repris une trentaine d'études comprenant plus de 30.000 patientes portant sur ce sujet (Leitich and Kiss, 2007). Il a été conclu que la vaginose augmente d'un facteur deux le risque d'accouchement prématuré et d'un facteur 6 le risque de fausses couches tardives. De plus il semblerait qu'une vaginose non déclarée avec présence d'une flore intermédiaire ne contenant pas de lactobacilles entraîne aussi une augmentation du risque d'accouchement prématuré (Farr et al., 2015). Il semblerait donc

important d'analyser l'état de la flore par des techniques rapides citées précédemment, dès le premier trimestre d'une grossesse.

2.6.2. Le risque de maladie inflammatoire pelvienne

Les maladies inflammatoires pelviennes (salpingites) sont des infections du tractus génital haut, pouvant se localiser dans l'utérus, avec infection au niveau de l'endomètre, dans les trompes de Fallope ou le péritoine pelvien. Les complications de ce type d'infection peuvent être importantes, comme un risque d'infertilité, un risque de grossesse ectopique, douleur dans le bas ventre lors de rapports sexuels et la formation d'un abcès sur l'utérus (McCormack, 1994). La plupart du temps, la maladie inflammatoire pelvienne est associée à une IST à *C. trachomatis* ou à *N. gonorrhoeae* ou à une infection vaginale à *G. vaginalis*, *Prevotella spp*, *M. hominis*, ou encore à *E. coli*. Ces bactéries présentes au niveau vaginal remontent alors le tractus génital et infectent la partie supérieure de ce tractus. La vaginose étant un facteur de risque pour développer des IST, il a été démontré qu'elle est en lien avec l'augmentation de ce type de complications (Sweet, 1995, 2011).

L'endométriose est aussi une des complications importantes de la vaginose, caractérisée par un changement dystrophique de la muqueuse utérine accompagné de signes de lymphopénie du tissu et d'une augmentation de l'apoptose de l'épithélium utérin (Kovalenko et al., 2008).

2.6.3. Le risque d'infection par le virus du SIDA

La vaginose est souvent associée au risque d'augmentation des IST à *C. trachomatis* ou à *N. gonorrhoeae* mais aussi au virus de l'herpès (Balkus et al., 2014; Cherpes et al., 2003; Gallo et al., 2012; Nagot et al., 2007; Wiesenfeld et al., 2003). Dans un même temps, de nombreuses études se sont intéressées au lien entre la vaginose et l'infection par le VIH (Cohen et al., 1995, 2012; Francis et al., 2015; Royce et al., 1999; Sewankambo et al., 1997; Taha et al., 1998). Une étude clinique menée au Kenya sur 4000 femmes travailleuses du sexe a pu montrer une association significative entre l'infection par le VIH, la vaginose et le manque de lactobacilles (Martin et al., 1999; Taha et al., 1998). Il a été montré qu'avoir une vaginose augmentait de cinq fois la probabilité d'exprimer l'ARN du virus HIV-1 dans le liquide cervico vaginal (Cu-Uvin et al., 2001; Sha et al., 2005). Deux études ont montré que le risque d'acquérir

le VIH est 1,6 à 2 fois supérieur lorsqu'il y a présence d'une vaginose (Atashili et al., 2008; Myer et al., 2005). De plus, la concentration de *G. vaginalis* et d'*A. vaginae* dans le liquide cervico-vaginal de femmes ayant le VIH était supérieure à la concentration de ces bactéries chez des femmes ne l'ayant pas (Redelinghuys et al., 2017). Enfin, la vaginose a été associée à une plus grande fréquence de femmes VIH-positives parmi les afro-américaines (Chehoud et al., 2017). Il est donc d'une grande importance de détecter et de traiter la vaginose en Afrique dans le but de diminuer les facteurs de risques du VIH dans des contrées où il fait des ravages.

La disparition des lactobacilles producteurs d'acide lactique au sein de la flore vaginale pourrait en partie expliquer l'augmentation du virus dans le liquide cervico vaginal. En effet, l'acide lactique a un effet virucide sur le VIH alors que les AGCC produits par la flore anaérobie n'ont pas cet effet *in vitro* (Aldunate et al., 2013). De plus, des études *in vitro* montrent que *G. vaginalis* et d'autres bactéries associées à la vaginose peuvent augmenter l'expression de VIH dans une lignée cellulaire de monocytes contenant les HIV-1 latent (Al-Harhi et al., 1999; Olinger et al., 1999).

2.7. Traitement de la vaginose bactérienne

Le premier traitement à être efficace, découvert dans les années 1970, fut un traitement oral par 500 mg de métronidazole pendant 7 jours (Pheifer et al., 1978). La métronidazole peut maintenant s'utiliser en crème par voie vaginale pendant 7 jours également. Dix ans plus tard, la clindamycine, avec deux prises orales de 300 mg par jour pendant 7 jours, a prouvé à son tour son efficacité dans le traitement de la vaginose (Greaves et al., 1988). De nos jours, la clindamycine est majoritairement utilisée en crème par voie vaginale. Ces deux antibiotiques constituent le traitement de référence de la vaginose (Workowski et al., 2006). Ils induisent une guérison d'environ 80 % des femmes qui l'utilisent. Cependant, le suivi de ces femmes sur une année montre une récurrence de la vaginose entre 50 et 60 % des cas. De plus, 60 à 80 % des femmes présentent une flore intermédiaire de la vaginose (Bradshaw et al., 2006). L'une des raisons de ces récurrences étant la résistance, de plus en plus démontrée des bactéries associées à la vaginose aux antibiotiques. Des études récentes montrent que *G. vaginalis* peut devenir résistante au métronidazole suite au traitement classique de la vaginose tout comme *A. vaginae* (De Backer et al., 2006; Ferris et al., 2004; Tomusiak et al., 2011). De plus, plusieurs traitements à la clindamycine peuvent rapidement induire une résistance bactérienne de la flore anaérobie

Tableau 6. Etudes cliniques double bras, traitement antibiotique vs traitement antibiotique combiné à une cure de probiotiques

Auteurs	Journal et année de publications	Types d'étude	Nombre de femmes	Femmes incluses dans l'étude	Antibiotique	Probiotiques	Intervention (exemple groupe probiotique)	Effets de l'intervention probiotique	Conclusion des auteurs
Heczko et al.	BMC Women's health. 2015	Randomisée, double-aveugle, traitement vs placebo	578 femmes groupe probiotique = 285 groupe placebo = 293	Polonaises de 18 à 50 ans avec récurrences de VB	Métronidazole 500 mg 2 fois/jour pendant 7 jours per os	prOVag® (<i>L. gasseri</i> 57C, <i>L. fermentum</i> 57A et <i>L. plantarum</i> 57B) >1.08 CFU/ souche	Traitement de 10 jours, prise 2 fois/jour de prOVag en même temps que métronidazole. Pendant le suivi, 1 capsule par jour pendant 10 jours en péri-menstruel pendant 3 mois	Augmentation du délai avant récurrence de VB et de la concentration en lactobacilles vaginaux	Effets bénéfiques
Mackklaim et al.	Microbial Ecology in Health and Disease. 2015	Double bras, traitement vs placebo	62 femmes groupe probiotique = 31 groupe placebo = 31	Femmes ayant une VB	Tinidazole, dose unique de 2 g	<i>L. reuteri</i> RC-14 et <i>L. rhamnosus</i> GR-1 (concentrations non mentionnées)	Deux capsules orales/jour pendant 28 jours dès la prise de 2 g de Tinidazole	Augmentation des lactobacilles vaginaux dans une flore préalablement dominée par les bactéries anaérobies pathogènes	Effet bénéfique
Lim et al.	SPMC J Health Care Serv. 2015	Double bras, randomisée traitement vs placebo	60 femmes groupe probiotique = 30 groupe placebo = 30	Philippines de 18 à 49 ans ayant une VB	Métronidazole 500 mg 2 fois/ jour pendant 7 jours per os	1 capsule contient 10.8 CFU d'un mélange de <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. longum</i> et <i>B. breve</i>	Une capsule orale./jour pendant 7 jours après le traitement antibiotique. Guérison analysée après 14 jours de traitement, et récurrence 10 semaines après guérison	Même quantité de femmes soignées dans le groupe traitement que dans le groupe placebo. De même pour les récurrences (20 et 22 femmes soignées sur 30 et 19 récurrences à 10 semaines)	Pas d'effet
Recine et al.	Arch Gynecol Obstet. 2016	Etude double bras, randomisée	250 femmes groupe antibiotique = 125 groupe antibiotique + probiotique = 125	Femmes vivant à Rome de 18 à 45 ans	Métronidazole 500 mg 2 fois/jour pendant 7 jours per os	Normogin® (<i>L. rhamnosus</i> BXM 54). Tablettes vaginales contenant > 10.4 CFU	Après traitement antibiotique, Normogin® 1/jour pendant 10 jours, puis 2/semaines pendant 15 jours et 1/5 jours pendant 7 mois. Le suivi se fait à 2-6 et 9 mois	Guérison (Atb vs Atb + probio) : à 2 mois (79% vs 90%) à 6 mois (25% vs 75%) à 9 mois (20% vs 80%) maintien d'un pH bas (4.2) pendant 9 mois avec le probiotique. Augmentation du pH (5.05) à 9 mois sans probiotique	Effet bénéfique probant
Cianci et al.	J Womens Health, issues care. 2016	Etude double bras	53 femmes groupe antibiotique = 27 groupe antibiotique + probiotique = 26	Femmes de 18 ans ou plus	Métronidazole 500 mg 2 fois/ jour pendant 7 jour ou Clindamycine 2 % en crème 1/ jour pendant 7 jours	capsules vaginales de <i>L. plantarum</i> P 17630	1 capsule vaginale pendant 6 jours consécutifs pendant le traitement antibiotique puis 1 capsule la semaine suivante. Suivi à 15 jours après le début du traitement	Guérison à 15 jours, 83% avec le probiotique contre 48% sans probiotique	Effet bénéfique

et principalement des sous-populations de *Prevotella* (Austin et al., 2005). Bostwick *et al* en février 2016 ont étudié la proportion de gènes de résistance microbiens contre toutes classes de traitement antibiotique dans la communauté microbienne de femmes. Ils ont pu montrer une augmentation de la fréquence des gènes de résistance aux lincosamides (clindamycine) qui passe de 12,3% chez des femmes saines à 58,9% chez des femmes ayant une vaginose (Bostwick et al., 2016). Une autre explication de ces récurrences est la formation d'un biofilm épais et très résistant avec prédominance de *G. vaginalis* (Patterson et al., 2010). Sous cette forme, les bactéries sont protégées de l'action de l'antibiotique. A la fin du traitement antibiotique il y a donc une persistance de l'altération de la flore vaginale. La dysbiose peut donc perdurer et les bactéries anaérobies se développer à l'intérieur du biofilm et entraîner les récurrences de vaginose. Dans le but de lutter contre le biofilm formé par *G. vaginalis*, Hymes *et al* en 2011 propose d'utiliser de la DNase (Hymes et al., 2013). Le biofilm est formé d'une matrice extracellulaire contenant de l'ADN qui lui est essentiel pour son intégrité. L'action de la DNase permettrait de dégrader l'ADN du biofilm. Ainsi, les bactéries se retrouveraient sous forme isolées, potentialisant l'action du métronidazole *in vitro*.

C'est pourquoi, depuis plusieurs années est étudié l'ajout de probiotiques en tant que traitement de la vaginose ou en tant que complément post-traitement antibiotique. L'ajout de probiotiques (essentiellement des lactobacilles) intra-vaginaux, pourrait induire une diminution du pH vaginal, permettant de créer un microenvironnement favorable à la colonisation du vagin par les lactobacilles commensaux et à la diminution des micro-organismes pathogènes. De plus la présence de ces probiotiques pourrait avoir un effet bénéfique sur le système immunitaire pour lutter contre la flore anaérobie. L'utilisation de probiotiques dans cette indication a donc fait l'objet de nombreuses études à la fois clinique pour observer leur efficacité, et *in vitro* dans le but de comprendre les mécanismes d'actions impliqués.

2.8. Vaginose bactérienne et traitement probiotique

La question concernant la nécessité de l'apport de probiotiques dans la prévention de récurrences d'infections vaginales date de plus de 20 ans. En effet, en 1990, la question a été posée par Reid *et al.* : y a-t-il un rôle possible des lactobacilles dans la prévention contre les maladies infectieuses vaginales (Reid et al., 1990). A l'époque, il a été conclu qu'un plus grand nombre d'études cliniques ou *in vitro* devaient être effectués. Depuis, il y a eu une augmentation du

Tableau 7. Etudes cliniques simple bras, pour étudier les bénéfices de la prise de probiotiques dans le traitement de la vaginose bactérienne

Auteurs	Journal et année de publications	Types d'étude	Nombre de femmes	Femmes incluses dans l'étude	Antibiotique	Probiotiques	Intervention (exemple groupe probiotique)	Effets de l'intervention probiotique	Conclusion des auteurs
Pendarkhar et al.	BMC Infectious Diseases, 2015	Etude simple bras	8 femmes	Femmes de 26 à 49 ans ayant une VB	Clindamycine 2 % en crème avec Clindamycine en capsule orale (300 mg) pendant 7 jours. Après les menstruations suivant le traitement 5 jours de gel vaginal de métronidazole à 0.75 %	EcoVag® (L. gasseri DSM 14869, L. rhamnosus DSM 14870) 10.8 CFU/souche dans la capsule	Après les traitement à la clindamycine, une capsule d'EcoVag®/jour pendant 5 jours puis de nouveau 1 capsule/ jour pendant 5 jours après le traitement au métronidazole	Guérison 50 %, Récidives 50 %	Bien qu'il n'y ait pas de comparaison et que ces deux études ont été faites à des périodes différentes, il est possible de conclure d'un effet potentiellement bénéfique de la prise régulière d'EcoVag® dans la lutte contre les récidives
Pendarkhar et al.	BMC Infectious Diseases, 2015	Etude simple bras	9 femmes	Femmes de 26 à 49 ans ayant une VB	Clindamycine 2 % en crème avec Clindamycine en capsule orale (300 mg) pendant 7 jours. Après les menstruations suivant le traitement 5 jours de gel vaginal de métronidazole à 0.75 %	EcoVag® (L. gasseri DSM 14869, L. rhamnosus DSM 14870) 10.8 CFU/souche dans la capsule	Après les traitement à la clindamycine, une capsule d'EcoVag®/jour pendant 10 jours puis de nouveau 1 capsule/ jour pendant 10 jours après le traitement au métronidazole. Une capsule par semaine d'EcoVag® après la deuxième période de menstruation	Guérison 67 %, Récidives 33 % Corrélation entre guérison et présence des souches de probiotique au niveau vaginal	
Schwartz et al.	Gynecol Obstet, 2015	Etude simple bras	103 femmes	Berlinoises avec VB déclarée	Aucun	SymbioVag® (L. gasseri, L. acidophilus) 10.9 CFU/ g de chaque souche et de l'inuline	un suppositoire vaginal/jours pendant 10 jours. Visite 2 à 7 jours après la fin du traitement.	Réduction du pH chez 83% des femmes, Augmentation de la concentration en lactobacilles et diminution de G. vaginalis et A. vaginae chez 60 % des femmes	Effets bénéfiques

nombre d'études à la fois cliniques et *in vitro* à travers le monde. Les études *in vitro* ont pu démontrer un effet inhibiteur de plusieurs souches sur la croissance de *G. vaginalis*. Leurs effets étant essentiellement dus à des mécanismes bactériologiques, c'est à dire à leur capacité à sécréter de l'acide lactique, de l'H₂O₂ et des bactériocines (Falagas et al., 2007). En parallèle de nombreuses études cliniques ont été réalisées dans le but d'analyser les effets *in vivo* de probiotiques en traitement, de la vaginose et en prévention secondaire, en complément d'un traitement antibiotique pour éviter les récurrences (Falagas et al., 2007). Des études ont montré des effets bénéfiques de l'ajout de *L. rhamnosus* GR-1 et *L. fermentum* RC-14 sur le score de Nugent (Reid et al., 2001, 2003). A l'inverse d'autres n'ont montré aucun effet (Eriksson et al., 2005; Hallén et al., 1992). En 2009, une méta-analyse concernant l'utilisation de probiotiques dans le traitement de la vaginose fut publiée dans la base Cochrane (Senok et al., 2009). Les auteurs ont conclu que les résultats des études à cette date n'apportaient pas de preuves suffisantes pour ou contre l'utilisation de probiotiques dans le traitement de la vaginose bactérienne. L'utilisation de probiotiques en complément d'un traitement antibiotique semblait prometteuse, seulement, les études portant sur le sujet devaient être plus randomisées, avec une méthodologie standardisée et des groupes de patientes plus grand. Depuis le début des années 2010, les études et les revues se sont multipliées avec plus d'une dizaine d'articles publiés ces deux dernières années. Bien que certaines études, peu nombreuses, n'indiquent pas d'effet de la prise de probiotique sur les récurrences (Gille et al., 2016; Lim and Lasala, 2015), la grande majorité des publications indiquent un effet bénéfique sur le taux de récurrence, sur la recolonisation plus importante d'une flore de lactobacilles et surtout prouvent l'inocuité de la prise de probiotiques (Cianci and Cicinelli, 2016; Heczko et al., 2015; Lim and Lasala, 2015; Macklaim et al., 2015; Pendharkar et al., 2015; Recine et al., 2016; Schwiertz et al., 2015) (Tableaux 6 et 7). A l'heure actuelle, en 2016, il n'y a pas eu d'autres méta-analyses publiées à ce sujet dans la base Cochrane.

2.9. Vaginose bactérienne et Lcr35

Le Lcr35, a fait l'objet d'une étude *in vitro* dans laquelle il a été montré sa capacité à inhiber l'adhésion à une lignée de cellules épithéliales vaginales VK2, ainsi que la croissance de *G. vaginalis* (Coudeyras et al., 2009). Très récemment, une étude *in vitro* a démontré que le lactate et le surfactant présents dans le surnageant de culture du Lcr35 agissaient de concert pour augmenter la sensibilité à un antibiotique (Sgibnev and Kremleva, 2016). Le Lcr35 a aussi

Tableau 8. Etudes cliniques analysant l'effet du Lcr35 sur la flore vaginale de femmes ayant une vaginose

Auteurs	Journal et année de publications	Types d'étude	Nombre de femmes	Femmes incluses dans l'étude	Antibiotique	Probiotiques	Intervention (exemple groupe probiotique)	Effets de l'intervention probiotique	Conclusion des auteurs
Petricevic et Witt	General gynecology 2008	Etude randomisée	171 femmes groupe antibiotique = 88 groupe antibiotique + probiotique = 83	Femmes de 18 à 45 ans avec score de Nugent entre 7 et 10	Clindamycine 300 mg 2 fois/jour pendant 7 jours	Gynophilus® (Lcr35) capsules de 10.9 CFU	Après traitement antibiotique, Gynophilus® 1 ovule/jour pendant 7 jours, puis prélèvements vaginaux 4 semaines après la fin du traitement	83 % des femmes du groupe traitement ont eu une baisse du score de Nugent d'au moins 5 points contre 35 % dans le groupe avec antibiotique seul	Effet bénéfique probant avec amélioration du score de Nugent
Kovachev et al.	Akush gynecol 2013	Etude randomisée	60 femmes groupe antibiotique = 30 groupe antibiotique + probiotique = 30	ND	Métronidazole 500 mg per os 2 fois/jour pendant 5 jours + ovules de métronidazole 1000 mg à J1 et J3	Gynophilus® (Lcr35) capsules de 10.9 CFU	Après traitement antibiotique, Gynophilus® 2 ovules/jour pendant 7 jours, puis prélèvements vaginaux 4 semaines après la fin du traitement	88.5 % des femmes du groupe traitement ont eu une amélioration sur les deux scores cliniques contre 60 % dans le groupe avec antibiotique seul	Effet bénéfique avec amélioration sur les deux scores cliniques
Kovachev et al.	Ulutas Med J 2008	Etude randomisée	141 femmes groupe probiotique = 85 groupe antibiotique + probiotique = 56	Femmes de 17 à 50 ans avec score de Nugent entre 7 et 10	Métronidazole 500 mg per os 1 fois/jour pendant 7 jours	Gynophilus® (Lcr35) capsules de 10.9 CFU	Après traitement antibiotique, Gynophilus® 1 ovule/jour pendant 10 jours, puis prélèvements vaginaux 4 semaines après la fin du traitement. Dans le groupe sans antibiotique, même traitement Gynophilus®	77 % des femmes du groupe antibio + probio ont eu une amélioration de la flore contre 41 % dans le groupe traité par probiotique seul	Effet bénéfique essentiellement en complément d'un traitement antibiotique.

fait l'objet d'études *in vivo* chez des femmes ayant une vaginose (Tableau 8). Le but était de démontrer son efficacité dans l'amélioration de l'état de la flore vaginale, c'est-à-dire obtenir un score de Nugent inférieur à cinq, ainsi que son efficacité dans la lutte contre les récurrences d'une vaginose. La première étude sur 171 femmes ayant une vaginose, datant de 2008, a montré un effet bénéfique de la prise de capsule de Lcr35 contenant 10^9 CFU après un traitement antibiotique (clindamycine) de 7 jours (83 femmes) comparé à un traitement antibiotique suivie de la prise d'un placebo (88 femmes), sur les récurrences de la vaginose. En effet, 83% des femmes du groupe traitement et 35% des femmes du groupe contrôle (antibiotique seul) avaient un score de Nugent inférieur à cinq, quatre semaines après le traitement (Petricevic and Witt, 2008). La seconde étude, datant de 2013, compare les mêmes groupes (excepté que l'antibiotique utilisé est le métronidazole) que la précédente (26 femmes avec probiotique, 25 femmes groupe contrôle) et trouve une amélioration de la flore vaginale lorsque le probiotique a été ajouté après le traitement antibiotique (88,5% vs 60%) (Kovachev and Dobrevski-Vacheva, 2013). Enfin, dans la dernière étude datant de 2016 il a cette fois été comparé, l'effet curatif d'une monothérapie avec le Lcr35 seul (85 femmes) comparé à un traitement au métronidazole avec addition concomitante du Lcr35. Les résultats indiquent que la thérapie combinée, donne de meilleurs scores de Nugent, donc moins de récurrence un mois après le traitement (47.1% vs 89.3%) (Kovachev and VatchevaDobrevska, 2016). Ce qui ressort de ces trois études est l'efficacité que semble avoir le Lcr35 dans la lutte contre les récurrences de la vaginose en complément d'un traitement antibiotique. Pour confirmer cela, une étude plus large (> 300 femmes) que les précédentes, multicentrique dans trois pays européens a été menée ces dernières années avec comme promoteur la société Biose, productrice de la souche. L'étude vient de se terminer et les résultats sont en cours de traitement.

D'après les données citées précédemment, les probiotiques et le Lcr35 en particulier semble avoir un impact bénéfique sur la flore vaginale dans le contexte de la vaginose bactérienne. Les mécanismes d'action bactériologiques sous-jacents à ces effets sur le score de Nugent sont relativement connus : compétition, sécrétion d'agents antimicrobiens... . Notre but, expliqué ci-après dans la partie objectif sera donc de savoir si le Lcr35 peut moduler la réponse immunitaire, et si cette modulation peut être bénéfique dans la lutte contre la vaginose.

Objectifs du travail

Objectif général

La vaginose bactérienne est une dysbiose de la flore vaginale. Nous avons vu que *G. vaginalis* a un rôle prédominant dans le développement de la flore anaérobie pathogène. Le fonctionnement bactériologique de *G. vaginalis* est maintenant connu. Ses trois facteurs de virulence et sa présence, même faible, au sein de la flore commensale d'une majorité de femmes font de *G. vaginalis* une bactérie clé de la vaginose bactérienne. Il existe cependant peu d'études ayant traité l'effet de la flore vaginale lors d'une dysbiose, en particulier de *G. vaginalis*, sur la réponse immunitaire. Notre but a donc été d'analyser les effets que pouvaient avoir *G. vaginalis* sur la réponse immunitaire de son interaction avec les moDC à la réponse lymphocytaire T. Cette dysbiose dont le traitement de référence est l'antibiothérapie montre un nombre important de récurrences. Elles sont dues à une altération persistante de la flore polymicrobienne anaérobie qui n'est pas totalement détruite après le traitement antibiotique. Pour lutter contre ces récurrences, un traitement avec des probiotiques a été envisagé. De nombreuses études ont été réalisées dans le but de tester l'efficacité de souches de probiotiques en traitement primaire de la vaginose bactérienne ou en prévention secondaire, après antibiothérapie pour lutter contre les récurrences. Il semblerait que l'utilisation de probiotique sur une longue période en prévention secondaire soit plus efficace. Le Lcr35 est un probiotique qui a été testé dans ces circonstances. Il a montré des effets bénéfiques encourageants. Cependant, ses effets bénéfiques sont-ils seulement dus à ses effets bactériologiques (diminution du pH, sécrétion de composés antimicrobiens...), ou a-t-il une action sur le système immunitaire. *In vitro*, des effets bactériologiques ont été montrés, comme sa capacité à inhiber la croissance de *G. vaginalis*. Cependant, une fois de plus, il existe peu d'études concernant l'effet du Lcr35 sur la réponse immunitaire. Il a été montré en 2011, sa capacité à activer des moDC et à induire la sécrétion de cytokines à la fois pro-Th1 et pro-Th17 (Evrard et al., 2011). Le but de cette étude était d'analyser de façon plus globale la réponse des moDC au contact du Lcr35 et d'étudier son effet sur la réponse lymphocytaire T.

Pour répondre à nos interrogations sur les DC et leur interaction avec le Lcr35 et *G. vaginalis*, nous avons mis au point plusieurs modèles *in vitro* nous permettant d'analyser la réponse des moDC, de l'interaction-internalisation du Lcr35 en microscopie électronique, en passant par la maturation ainsi que la mortalité induite en cytométrie en flux (CMF), pour finir par la sécrétion de cytokines. Enfin, nous avons étudié la prolifération lymphocytaire induite par le Lcr35 et *G. vaginalis*, dans des modèles de test de transformation lymphoblastique (TTL) et de réaction

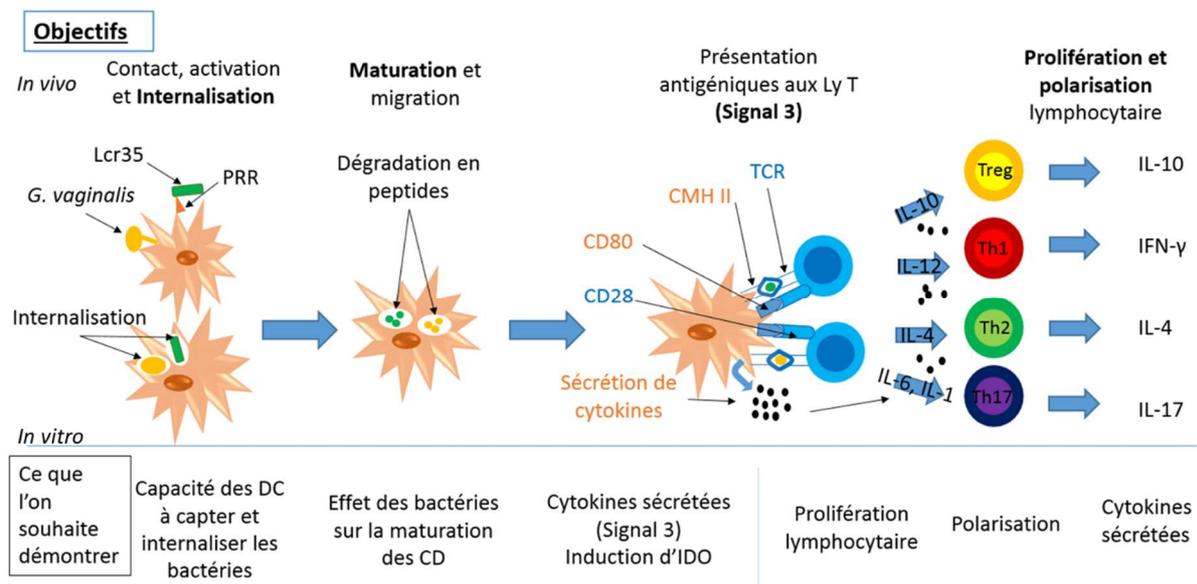


Figure 31. Représentation des différentes phases de la réponse immunitaire induite par *G. vaginalis* et/ou le Lcr35 étudiées dans nos travaux.

leucocytaire mixte (MLR). Dans un second temps nous avons étudié la sécrétion de cytokines dans ces modèles ainsi que les sous-populations de Ly T CD4 induites par le Lcr35.

Deux questions ont donc été posées :

- Quel effet *G. vaginalis*, qui joue un rôle majeur dans la mise en place d'une pathologie particulière très peu inflammatoire, induira sur les DC puis sur la réponse lymphocytaire ?

- Quelle réponse est induite par le Lcr35 sur les DC ainsi que sur les sous-populations de lymphocytes T ? Les effets bénéfiques observés *in vivo* dans la lutte contre les récurrences de la vaginose bactérienne, peuvent-ils en partie s'expliquer par une réponse immunitaire adaptée ?

Le travail suivant, présenté par ces deux articles permettra en partie de répondre à ces deux problématiques.

Enfin, *in vivo*, ces deux bactéries sont présentes simultanément lors d'un traitement avec le Lcr35 lors d'une vaginose bactérienne. C'est pourquoi, dans les modèles de moDC, nous avons mis le Lcr35 et *G.vaginalis* à différentes concentrations à leur contact. Les résultats obtenus concernant la maturation des moDC induite par ces deux bactéries simultanément fera l'objet de résultats complémentaires (Figure 31)

Travaux personnels

Article n°1

**Slight pro-inflammatory immunomodulation properties of dendritic cells
by *Gardnerella vaginalis*: “The invisible man” of bacterial vaginosis?**

Bertran T., Brachet P., Vareille-Delarbre M., Falenta J., Dosgilbert A., Vasson MP., Forestier
C., tridon A., Evrard B.

Journal of Immunology Research, Accepté le 10 janvier 2016

Objectif de cette étude

Cette étude s'est effectuée en deux parties :

- **L'effet de *G. vaginalis* sur les différentes étapes caractérisant la réponse des cellules dendritiques dérivées de monocytes :**

- l'interaction et internalisation de *G. vaginalis*
- les changements phénotypiques et la maturation induite des DC en réponse à *G. vaginalis*
- l'effet de *G. vaginalis* sur la mortalité des DC
- le profil de sécrétion cytokinique en réponse au contact avec des DC avec *G. vaginalis*

- **L'effet de *G. vaginalis* sur la réponse lymphocytaire :**

- la modulation de la prolifération des PBMC stimulées à la PHA
- la modulation de la sécrétion de cytokines par les PBMC en réponse au contact avec *G. vaginalis*

Research Article

Slight Pro-Inflammatory Immunomodulation Properties of Dendritic Cells by *Gardnerella vaginalis*: The “Invisible Man” of Bacterial Vaginosis?

Thomas Bertran,¹ Patrick Brachet,² Marjolaine Vareille-Delarbre,¹ Julie Falenta,¹ Annie Dosgilbert,³ Marie-Paule Vasson,⁴ Christiane Forestier,⁵ Arlette Tridon,^{1,3} and Bertrand Evrard^{1,3}

¹UFR Médecine-Pharmacie, Clermont Université, Université d'Auvergne, UMR 1019 UNH, ECREIN, Laboratoire d'Immunologie, 63001 Clermont-Ferrand, France

²INRA de Theix, UMR 1019 UNH, ECREIN, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

³Service d'Immunologie, CHU Clermont-Ferrand, 63001 Clermont-Ferrand, France

⁴UFR Pharmacie, Clermont Université, Université d'Auvergne, UMR 1019 UNH, ECREIN, Laboratoire de Biochimie, 63001 Clermont-Ferrand, France

⁵UFR Pharmacie, Clermont Université, Université d'Auvergne, UMR CNRS 6023 LMGE, Laboratoire de Bactériologie, 63001 Clermont-Ferrand, France

Correspondence should be addressed to Bertrand Evrard; bevrard@chu-clermontferrand.fr

Received 22 October 2015; Revised 4 January 2016; Accepted 10 January 2016

Academic Editor: Silvia Beatriz Boscardin

Copyright © 2016 Thomas Bertran et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bacterial vaginosis (BV), the most common genital infection in reproductive-aged women, is associated with increased risk of sexually transmitted infections. Its etiology remains unclear, especially the role of *Gardnerella (G.) vaginalis*, an anaerobic bacterium characteristic of the BV-alteration of the vaginal ecosystem. In the genital mucosa, dendritic cells (DCs) sense bacteria of the microenvironment via receptors and then orchestrate the immune response by induction of different T cell subtypes. We investigated the interactions between *G. vaginalis* and human monocyte-derived DCs using a wide range of bacterial concentrations (multiplicity of infection from 0.01 to 100), and the effects of this pathogen on PHA-induced lymphocyte proliferation. As observed by electron microscopy and cytometry, *G. vaginalis* reduced the internalization ability of DCs by forming extracellular clusters and induced neither DC maturation, nor DC secretion of cytokines, except at the highest dose with a very early DC maturation state. The same profile was observed on lymphocytes with significant increases of proliferation and cytokine secretion only at the highest bacterial concentration. Our findings indicate that *G. vaginalis* possesses slight immune-stimulating activities against DCs and T cells, reflecting thus a defective inflammatory response and giving rise to the atypical, non- or low-grade, inflammatory clinical disease profile.

1. Introduction

Bacterial vaginosis (BV) is the most common low genital infection among reproductive-aged women, with a prevalence of 29% among 14- to 49-year-old US women and almost 40% in individuals at high risk for sexually transmitted infections (STIs) [1]. BV is associated with serious medical complications, including adverse pregnancy outcomes, endometritis, and pelvic inflammatory disease such

as endometriosis [2, 3]. BV also increases women's risk of acquiring STIs, particularly HIV infections [4, 5].

Clinically, one-half of BV-positive women are asymptomatic while the others suffer only from mild symptoms, such as homogeneous white vaginal discharge and amine (fishy) odor [6]. These signs are associated with a vaginal pH > 4.5 and the presence of characteristic “clue cells” on microscopic examination. These four manifestations constitute Amel's clinical criteria [6]. The microbiological diagnosis

of BV is usually based on Nugent's score, which includes assessment of lactobacilli by Gram's stain of vaginal fluid samples. BV is associated with an alteration of the vaginal ecosystem, characterized by a decrease in hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* (*L.*) species such as *L. crispatus* and *L. jensenii* and a concomitant increase in polymicrobial anaerobic bacteria like *Gardnerella* (*G.*) *vaginalis* [7, 8].

The microbial etiology of BV is unclear and a matter of debate [9]. Two opposing hypotheses exist [10]. In the monomicrobial hypothesis, historically the first one, *G. vaginalis* is the single, specific etiologic agent of BV [11]. In the polymicrobial hypothesis, which has gained general acceptance in the last 20 years, *G. vaginalis* acts synergically with other anaerobes to unbalance the vaginal flora and trigger the disease [12]. Vaginal inoculation experiments in the monkey show that the co-occurrence of anaerobes and *G. vaginalis* is required to induce BV [13]. Moreover, *G. vaginalis* is frequently isolated in healthy women without BV [14]. Nevertheless, recent works have relaunched the debate by confirming its importance in the pathophysiology of the disease. *G. vaginalis* predominates in vaginal BV-associated biofilms, which are implicated in persistent BV, thus constituting a major factor of resistance to standard treatment [15].

Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells (APCs) which, by inducing both tolerance and immunity, are critical for the orchestration of the adaptive immune response [16]. Immature DCs reside in peripheral mucosa, where they sense the microenvironment *via* pattern recognition receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PRRs include toll-like receptors (TLRs) and C-type lectin receptors (CLRs) [17]. PRR stimulation triggers a DC maturation process with up-regulation or down-regulation of membrane molecules (CD83, CD86 and HLA-DR, and DC-SIGN and Mannose Receptor, resp.) and cytokine production. DC activation by several PAMPs, via distinct PRRs with antagonistic or synergistic effects, modulates their differentiation, which secondarily determines the polarization of the effector T cell responses, *that is*, the balance between Th1, Th2, Th17, and T regulatory (Treg) subsets [18]. Cytokine production by DCs is an important factor in this process. IL-12 production drives polarization towards Th1 cells, whereas synthesis of IL-1 β , IL-6, TGF β and IL-23, and IL-10 promotes induction of Th17 or Treg cells, respectively [19]. These different stages of the immune response have been recently described in the human genital mucosa. Notably, in both the upper and lower tracts, several DC subsets exist and express specific TLRs, such as TLR-6, TLR-7, and TLR-8, and CLRs, such as langerin and DC-SIGN, and are able to induce different T cell subpopulations [20–22].

The effects of mucosal fluids from women with BV or healthy flora, without analysis of implicated bacterium species, were examined on DC function [23, 24]. BV samples induced IL-12 and IL-23 production, as well as expression of maturation markers (HLA-DR, CD40, and CD83) by monocyte-derived DCs (moDCs). Concerning T cells, there has been yet no investigation on the impact of BV on the polarization of the different lymphocyte subpopulations.

Only one study reported effects of BV on the percentage of Treg cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). However, this study did not test the possibility of a specific impact of *G. vaginalis* and it did not objectify differences in the distribution of Treg in BV+ versus BV- HIV-negative women, decreased Treg being solely observed in BV+/HIV+ women compared to BV-/HIV+ women [25]. Many studies have attempted to measure cervicovaginal production of cytokines in BV, but disparate results were obtained. Most articles reported an elevation in IL-1 β , and less consistently in IL-6 and IL-8, in BV-affected women [26–29]. Additionally, BV mucosal fluid was found to increase proliferation of T cells in allogeneic mixed-leukocyte reaction (MLR) [23]. Finally, the specific effects of *G. vaginalis* on DC and T cells have never been evaluated yet.

Unlike conventional vaginitis that is characterized by burning, dysuria, dyspareunia, and frequent pruritus, BV causes scant inflammatory signs without primary pain or pruritus in affected women [14]. Likewise, a relative paucity of inflammatory cells and a near normal number of vaginal neutrophils are characteristic of BV status. In view of the literature data, we hypothesized that BV corresponds to a unique local immunological environment, with a low-grade inflammation, potentially mediated by so far unknown immunomodulatory mechanisms of action of *G. vaginalis* on the vaginal immune system, particularly on the DCs and T cells. In the present study, we investigated this hypothesis in *in vitro* models by monitoring (i) the internalization, maturation, and cytokine secretion of moDCs; (ii) lymphocyte proliferation and subset cytokine production, after cell exposure to *G. vaginalis* or to commensal or pathogenic microorganisms potentially found in the vaginal mucosa.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial Strains and Culture Conditions. *G. vaginalis* ATCC14018 was grown in brain heart infusion (Biomérieux) supplemented with maltose (0.1%), glucose (0.1%), yeast extract (1%), and horse serum (10%) in 5% CO₂ at 37°C for 72 h. *L. reuteri* ATCC23272 was grown in De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) medium (BD Difco™) at 37°C overnight. *Candida albicans* ATCC10231 was grown in Sabouraud broth at 37°C overnight. Microbial cells were harvested by centrifugation (11,000 ×g for 10 min), and the pellet was washed twice and then resuspended in RPMI 1640 (Cambrex Bio Science). Optical density (OD) measurements were performed at 620 nm to adjust the final concentration of the microbial suspension, and the exact number of colony forming units (CFU) was determined by plating serial dilutions of the inocula onto adapted agar plates (Columbia 5% Sheep Blood Agar, MRS, or Sabouraud). Before being added to the cell samples, the microbial cells were inactivated by exposure to UV for 1 h. The effectiveness of the inactivation was evaluated by plating 20 μ L of the irradiated inocula on adapted agar plates.

2.2. Ethics Statement. The human cells used in this study were generated from the buffy-coat of healthy volunteers obtained

from the local French blood agency (Etablissement Français du Sang, EFS, Saint-Etienne). It is a statutory requirement that blood donors be given full necessary information (article R.1221-5 of the Public Health Code, 12/01/2009 and 11/06/2006 decrees). Written informed consent was obtained by the EFS from all volunteers involved in our study.

2.3. In Vitro Differentiation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. DCs were generated from PBMCs. Briefly, PBMCs were isolated from the buffy-coats of healthy volunteers by Ficoll-Histopaque (Sigma) density gradient centrifugation. PBMCs were washed twice in RPMI 1640 and resuspended at a final concentration of 5×10^7 cells per mL of phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 2% fetal calf serum (FCS, Biowest-Abcys) and 1mM EDTA. Monocytes were purified by negative selection using the EasySep[®] Human Monocyte Enrichment Kit, as recommended by the manufacturer (StemCell Technologies). They were then cultured for 5 days in RPMI 1640 supplemented with 1% L-glutamine (Sigma), 10% FCS, and 0.5% penicillin-streptomycin (Sigma), in the presence of 500 U/mL IL4 (R&D systems) and 800 U/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, R&D systems). After 3 days of incubation, one-half volume of fresh culture medium containing 2x concentrations of IL4 and GM-CSF was added to each well.

2.4. Electron Microscope Observations. DCs obtained as previously described were plated in a sterile 12-well plate at a concentration of 1×10^6 cells/mL. *G. vaginalis* was added to wells at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 1h (Scanning Electron Microscopy, SEM) and at a MOI of 0.01, 1, or 100 for 3h (Transmission Electron Microscopy, TEM). Cells were harvested, centrifuged (400 xg for 10 min), rinsed with Sodium Cacodylate (0.2 M pH 7.4) for 10 min, and then fixed at 4°C overnight with glutaraldehyde 1.6% in Sodium Cacodylate buffer. The samples were then rinsed, postfixed with 1% Osmium Tetroxide (1h, room temperature), rinsed again, and dehydrated with graded series of ethanol (70 to 100%) and eventually with 100% hexamethyldisilazane. Finally, after overnight drying, samples were placed on a Jeol SEM filter and metallised with carbon (40 s). For TEM, dried samples were embedded in a polymerized 2 mm thick Epon coating, and ultrathin sections were picked up with Formvar-coated copper grids (300 mesh). Sections were counterstained with 4% aqueous uranyl acetate. For negative staining, bacteria were grown overnight in M63B1-0.4% Glu medium and negatively stained with 2% phosphotungstic acid on Formvar-coated copper grids (300 mesh). Images were captured at the Centre d'Imagerie Cellulaire Santé (CICS) of the Université d'Auvergne with a Jeol JSM-6060LV (SEM) and a Hitachi H-7650 (TEM).

2.5. Flow Cytometry Analysis of DC Maturation and Viability. On day 6, the immature DCs from each well were harvested, pooled, centrifuged, and reseeded at 1×10^5 cells/mL. UV-killed bacteria were then added at $10 \mu\text{L}$ of suspension per well to reach a final concentration ranging from 10^3 to 10^7 CFU/mL, that is, a MOI between 0.01

and 100. Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (Sigma) at a final concentration of 100 ng/mL was used as positive control. Immature DCs without addition of LPS or bacteria were used as negative control. After 48 h of maturation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, DCs were collected, centrifuged, and resuspended in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma). Cell surfaces were stained with the appropriate fluorescence-labeled murine antibodies: APC-Cy7-conjugated anti-CD14 (LPS coreceptor specific to monocytes), PE-conjugated anti-CD86 (costimulatory molecule, activation marker), V450-conjugated anti-HLA-DR, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-DC-SIGN (DC-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin or CD209, member of the CLR family, specific marker of immature DCs), Alexa Fluor[®] 488-conjugated anti-MR (Mannose Receptor or CD206, member of the CLR family, specific marker of immature DCs and macrophages), and streptavidin APC-conjugated anti-TLR4 (biotin antibody, an LPS receptor with activation functions). Antibodies were obtained from BD Biosciences, except anti-MR (Biolegend). Corresponding murine isotype-matched and non-labeled antibodies (BD Biosciences or Biolegend) were used as controls. The cells were analyzed by a BD-LSRII flow cytometer with FACSDiva Software (BD Biosciences) at the CICS. Fluorescence compensation adjustments were performed. Gates were set on living DCs based on their forward/side scatter (FSC/SSC) properties. The analysis was halted at a count of 3,000 DCs. The level of staining was expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). Culture supernatants were collected and stored at -20°C until cytokine analysis. To determine cell viability, dye LIVE/DEAD[®] beads (Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation Life technologies) were added to cells and used as markers of dead cells. DC mortality was assessed by gating together dead cells and live DCs on SSC/FSC diagram. Two other gates were created from this gate to separate the two populations. From the dead cell gate, cells that expressed LIVE/DEAD marker were considered as effectively dead. This dead cell number was expressed as a ratio of the first created overall gate to obtain a dead DC percentage.

2.6. Lymphocyte Proliferation Assays. The mitogenic response to plant lectins, as phytohemagglutinin A (PHA), is conventionally used to measure cell-mediated immunity in mammals in general and especially in humans [30]. These tests are named lymphocyte proliferation assays or lymphocyte transformation test (LTT). They were performed here to study the functional properties of *G. vaginalis* and especially its capabilities to modulate PHA-induced T cell proliferation. On day 1, PBMCs collected from a buffy-coat as previously described were adjusted to a concentration of 1×10^6 cells per mL of complete medium, that is, RPMI 1640 supplemented with 1% L-glutamine and 10% FCS. The cell suspension was deposited in a sterile 96-well plate (100 μL per well). Each measurement was done in triplicate. Polyclonal proliferation of lymphocytes was induced with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PHA (Sigma). Cells without PHA or bacteria were used as a negative control and cells with PHA without bacteria as a positive one. *G. vaginalis* was added to other PHA-treated wells

to obtain concentrations ranging from 10^3 to 10^7 CFU/mL. After a 72 h incubation at 37°C under 5% CO₂, 1 μCi of tritiated thymidine (Perkin Elmer) was added to each well and the cells were further incubated for 4 h. Labeling was stopped by cooling the plate to 4°C. The cells were then collected under vacuum onto a Whatman filter paper and incorporation of tritiated thymidine was measured using a β counter (Tri-Carb 2300TR, Canberra-Packard). Proliferation results were expressed as mean cpm (counts per min) values of triplicate measurements. Identical incubations, however, without addition of tritiated thymidine, were carried out in parallel to collect supernatants for cytokine quantification.

2.7. Cytokine Quantification. For DC maturation experiments, the cytokines IL-10, TNF-α, IFN-γ, and IL-12p70 were assayed in culture supernatants with Biologend enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions. For lymphocyte proliferation assays, the cytokines IFN-γ, IL-4, IL-17A, IL-10, IL-12p70, and TNF-α were quantified in supernatants of PBMC cultures using Pro Human Cytokine Group 1 6-Plex 1 × 96 kit (Bio-Rad) on a Bio Plex^Y 200 (Bio-Rad).

2.8. Statistical Analysis. All data were expressed as means + SD. After variance dispersion test, three different statistical tests were performed. Two-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test, Friedman's test with Nemenyi's group, and Kruskal-Wallis test with Dunn test were used to analyze the significant effect of bacteria on DCs or PBMCs with XLStat 7.5.2 software (Addinsoft, Paris, France). *p* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Electron Microscopy Observation of *G. vaginalis*-DC Interaction. *In vivo*, the first step of the immune response in the vaginal mucosa corresponds to the interactions between bacteria and immature DCs, which lead to the internalization of bacteria. To mimic this initial phenomenon *in vitro*, we put in contact DCs with *G. vaginalis* during 1 to 3 h and took SEM and TEM pictures. SEM produced 3D images of cell and bacteria surfaces after 1 h of contact (Figures 1(a) and 1(b)). *G. vaginalis* bacteria were rarely found on isolated cell forms (in contrast with what we observed with *Lactobacillus*, data not shown) and were in general organized in clusters (Figure 1(a)). However, DC dendrites interacted with this cluster of bacteria and sometimes surrounded it (Figure 1(b)). TEM realized at 3 h, to allow the cells to have time to internalize bacteria, confirmed interactions of DC dendrites with clusters of *G. vaginalis* (Figures 1(c) and 1(d)). Figure 1(c) shows additionally that the cluster is composed of bacteria enrobed in an extracellular matrix which may interact with DCs. TEM also shows internalized intracellular *G. vaginalis* bacteria, but only in their isolated form, without intracellular clusters (Figure 1(e)). At a MOI of 0.01 no DCs with internalized *G. vaginalis* were found, very few at a MOI of 1, and only 35% at a MOI of 100 (count on 100 DCs). For each DC with internalized *G. vaginalis*, the

number of bacteria ranged from 1 to 9 bacteria per cell. This experiment was performed in parallel with *L. reuteri* at the same concentrations. Internalization of *Lactobacillus*, unlike *G. vaginalis*, could be observed on few cells at a MOI of 0.01, a majority of cells at a MOI of 1, and up to 82% of cells at a MOI of 100 (count on over 160 DCs). The number of *Lactobacillus* internalized in those cells was higher than with that of *G. vaginalis* since it ranged from 6 to 18 bacteria per cell (data not shown). To conclude on this part, we showed that DCs were able to interact with *G. vaginalis* and to internalize it, but less effectively than lactobacilli, probably due to *G. vaginalis* ability to form extracellular clusters.

3.2. Flow Cytometric Analysis of Microbial Effects on DC Phenotype. During the immune response, bacterium internalization can then induce DC activation and maturation, resulting in modifications detectable by cytometry of numerous membrane markers and permitting to distinguish immature DCs from mature ones. In our study, DC activation and maturation were assessed by changes affecting an extensive phenotype of the cell membrane. As expected, immature DCs were characterized by low levels of CD86, HLA-DR, and CD14 expression (the latter was compared to its initial level in monocytes before IL-4 and GM-CSF treatment, data not shown), together with high levels of DC-SIGN and MR expression (Figures 2 and 3). Comparatively, LPS-induced DCs expressed a phenotype characteristic of fully mature DCs with increased levels of CD86 and HLA-DR (Figures 3(a) and 3(b)) associated with decreased levels of DC-SIGN, MR, TLR4, and CD14 (Figures 3(c), 3(d), 3(e), and 3(f)).

Incubation with low or medium doses of *G. vaginalis* (10^3 – 10^6 CFU/mL, *i.e.*, MOI from 0.01 to 10) did not alter immature DC cell surface phenotype, as shown by the absence of significant change in either membrane marker (Figures 2 and 3). At the highest concentration (10^7 CFU/mL, *i.e.*, MOI 100), *G. vaginalis* caused a very slight increase in HLA-DR expression (statistically non-significant, Figure 3(b)) combined with moderate decreases in MR and CD14 expressions (both non-significant, Figures 3(e) and 3(f)), which reflect early signs of maturation. However, the lack of increase in CD86 expression and decrease in DC-SIGN and TLR4 expressions indicated that this maturation process was incomplete.

Taken together, our overall cytometric results indicate that *G. vaginalis* induced no maturation of DCs or an incomplete DC maturation process at high doses.

Unlike *G. vaginalis*, *L. reuteri* and *C. albicans* induced a clear dose-dependent higher expression of CD86 and HLA-DR upon maturation of DCs (Figures 3(a) and 3(b)). Combined with decreased expressions of DC-SIGN, MR, CD14, and TLR4 (Figures 3(c), 3(d), 3(e), and 3(f)), these results show that the last two microorganisms induced fully mature DCs, similarly to LPS extract.

3.3. Flow Cytometric Analysis of *G. vaginalis* Effects on DC Mortality. Given the very low level of maturation of DC by *G. vaginalis* observed in our experiments, we hypothesized that this strain would not induce DC cytotoxicity. To test

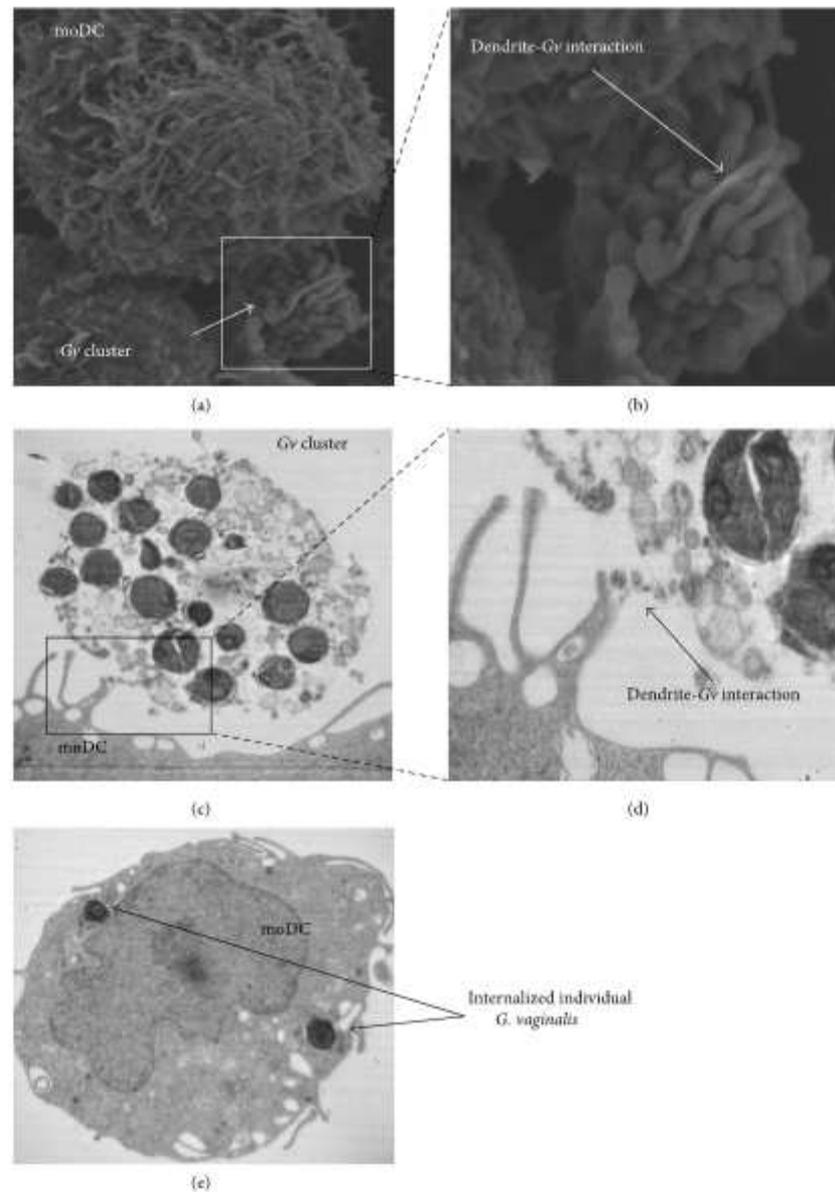


FIGURE 1: Pictures of DCs after exposure to *G. vaginalis*. (a) SEM ($\times 5500$), after a 1 h exposure, DC dendrites surrounding clusters of *G. vaginalis*. (b) Zoom ($\times 13000$) on the contact zone between DCs and bacteria. (c) TEM ($\times 12000$), after a 3 h exposure, a cluster of *G. vaginalis* in contact with DC dendrites. (d) Enlargement of DC dendrite-*G. vaginalis* interaction zone. (e) TEM cutting, internalized *G. vaginalis* in one DC. moDC: monocyte-derived dendritic cell, Gv: *Gardnerella vaginalis*.

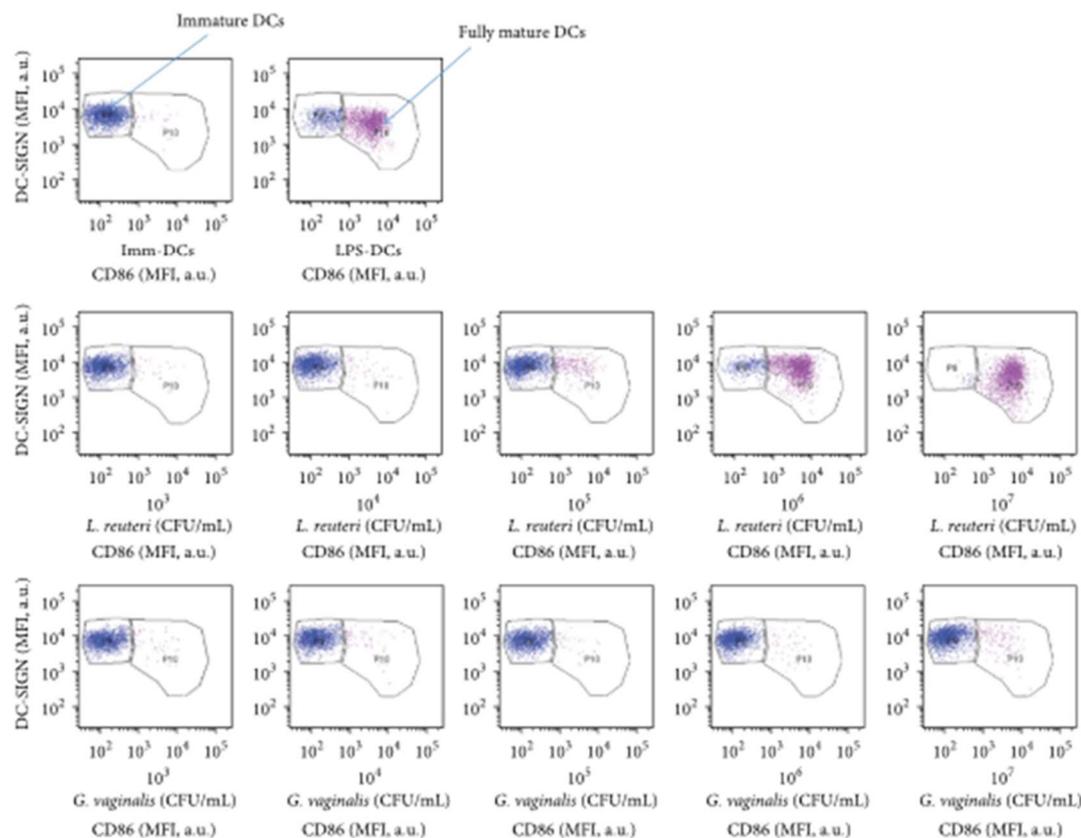


FIGURE 2: Surface phenotype of human DCs after exposure to a range of *G. vaginalis* or *L. reuteri* concentrations. The dot plots and histograms show MFI values on gated DCs. DC-SIGN/CD86 dot plots gated on human DCs. Data from a representative experiment comparing *G. vaginalis*-induced DC process of maturation with that induced by *L. reuteri*.

this assertion, a viability marker was added during flow cytometric experiments. Immature DCs alone had almost no mortality. In comparison, exposure of DCs to LPS extract induced a slight, but significant, increase in mortality (Figure 4). Three concentrations of *G. vaginalis* were tested to analyze their impact on DC survival. Results showed that, from 10^3 to 10^7 CFU/mL (MOI 0.01 to 100), *G. vaginalis* induced no increase in dead DCs.

3.4. Cytokine Secretion by Microbial-Matured DCs. *In vivo*, mature DCs migrate to secondary lymphoid organs and present the antigen to T cells. During this interaction, DCs deliver three signals, notably a cytokinic signal polarizing the differentiation of lymphocytes into several subpopulations. To decipher the preferential pathway of T cell polarization induced by *G. vaginalis*, four cytokines assumed to be of particular interest were selected for ELISA measurements. Compared to untreated immature DCs, DCs incubated with *G. vaginalis* did not significantly increase the production of TNF- α or IL-10, except at the upper dose of 10^7 CFU/mL

(Figures 5(a) and 5(b)). Additionally, the production of IL-12p70 and IFN- γ was not or barely detectable in *G. vaginalis*-treated or immature DCs (Figures 5(c) and 5(d)). Conversely, a strong dose-dependent increase in the production of TNF- α and IL-10 was induced by *L. reuteri* and *C. albicans* and, to a lesser extent, of IL-12p70 by *L. reuteri* and of IFN- γ by *C. albicans* (Figures 5(a), 5(b), 5(c), and 5(d)). The fold changes determined by comparing the level of cytokines produced by DCs exposed to 10^7 CFU/mL *G. vaginalis* (i.e., a MOI of 100) to that produced by immature DCs were equal to 8.9 for IL-10, 6.5 for TNF- α , and only 1.1 and 1.3 for IL-12p70 and IFN- γ , respectively. By comparison, the fold changes induced by the same dose of *L. reuteri* or *C. albicans* ranged from 70 to 307 for IL-10 and TNF- α production. Whatever the concentration of *G. vaginalis*, the level of DC-produced cytokines attained only 10 to 28% of that generated by LPS-treated DCs. Overall, these results show that *G. vaginalis* barely induces cytokinic secretion, in accordance with our findings on DC maturation (Figure 3), thus indicating absence, or slight induction, of DC activation by *G. vaginalis*.

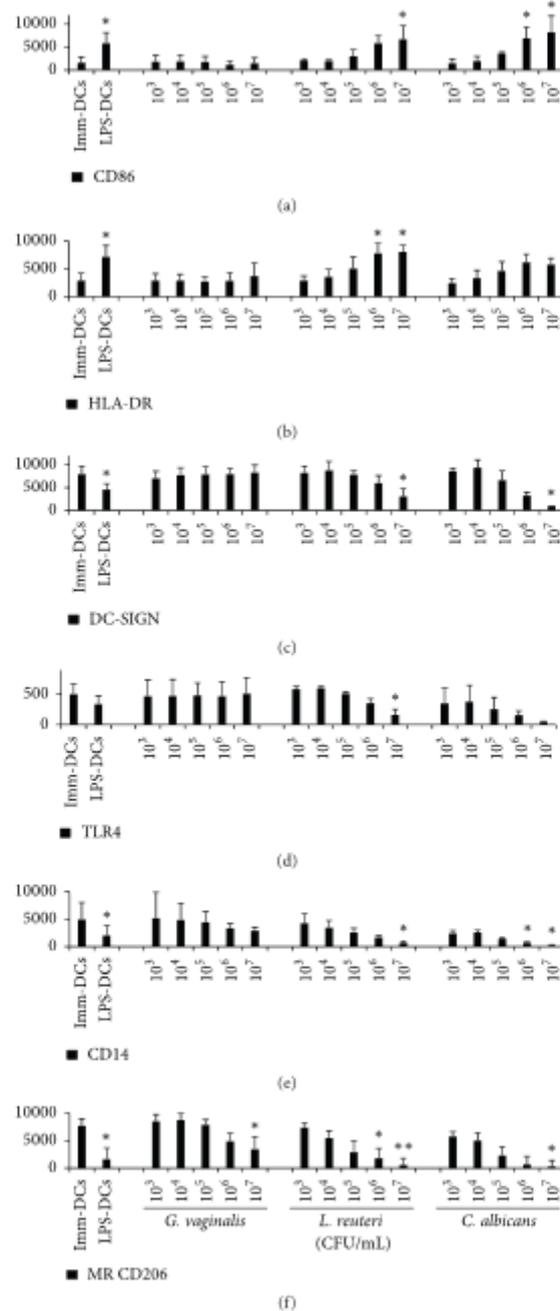


FIGURE 3: Human DC membrane marker expression after exposure to a range of *G. vaginalis*, *L. reuteri*, or *C. albicans* concentrations. (a, b) Differential expression of CD86 and HLA-DR, two membrane markers typically increasing during DC maturation. (c, d, e, f) Differential expression of DC-SIGN, TLR4, CD14, and MR CD206, four membrane markers typically decreasing during DC maturation. Data are means (+ SD). For every marker, the isotypic control values were subtracted from the MFI values. Imm-DCs: immature DCs, LPS-DCs: DCs matured by a 48 h exposure to 100 ng/mL *E. coli* LPS; *G. vaginalis*, *L. reuteri*, and *C. albicans*: DCs matured after a 48 h incubation at different concentrations (10^3 to 10^7 CFU/mL, i.e., MOI = 0.01 to 100) of *G. vaginalis* ($n = 5$), *L. reuteri* ($n = 3$), and *C. albicans* ($n = 2$). Kruskal-Wallis test with Dunn comparison. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, as compared to the Imm-DCs.

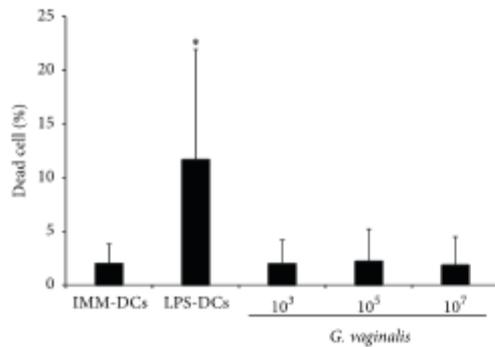


FIGURE 4: DC viability after 48 h of culture with *G. vaginalis*. Histogram shows the dead cell percentage, calculated from SSC/FSC diagram and live/dead marker. LPS induced a significant increase in DC mortality compared to immature DCs alone in the medium. Low and high concentrations of *G. vaginalis* did not induce any increase in DC mortality, even at a MOI of 100. Data are means (+ SD) from 6 individual experiments. Imm-DCs: immature DCs, LPS-DCs: DCs matured by a 48 h exposure to 100 ng/mL *E. coli* LPS; *G. vaginalis*. DCs matured after a 48 h incubation at different concentrations (10³ to 10⁷ CFU/mL, i.e., MOI = 0.01 to 100) of *G. vaginalis*. Friedman's test with Nemenyi's comparison * $p < 0.05$.

3.5. Slight Increase in PHA-Stimulated Lymphocyte Proliferation by *G. vaginalis*. To investigate lymphocyte activation, the next classical stage of the immune response, we carried out functional tests of bacterium-induced modulation of lymphocytic proliferation, using a model of PHA-induced T cell proliferation. Addition of the strain to the medium caused a slight dose-dependent increase in PHA-stimulated lymphocyte proliferation in comparison to lymphocyte control assays without bacteria (Figure 6). The increase in proliferation was only significant at a dose of 10⁷ CFU/mL ($p < 0.001$) and attained an upper average value of 20% compared to that of PHA-stimulated control cells. Lower concentrations of *G. vaginalis* did not cause any significant modulation of PHA-stimulated lymphocyte proliferation. Similar experiments we performed in parallel showed that *L. reuteri* and *C. albicans* did not induce a similar pattern (data not shown).

3.6. *G. vaginalis*-Dependent Increase in Cytokine Secretion by PHA-Stimulated Leukocytes. To depict the type of immune response involved during the *G. vaginalis*-dependent increase in PHA-stimulated lymphocyte proliferation, secretion of cytokines by the four main subpopulations of T cells (IFN- γ , IL-4, IL-17A, and IL-10 corresponding to Th1, Th2, Th17, or Treg, resp.) or by APCs (IL-12p70 and TNF- α) was measured in extracellular media of lymphocyte proliferation assays. PHA (2 μ g/mL) alone induced a strong secretion of IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-12p70, and TNF- α from PBMCs (Figure 7). A clear dose-dependent increase in IFN- γ and IL-17A production was observed in PHA-stimulated PBMCs exposed to varying concentrations of *G. vaginalis* (Figures 7(c) and 7(d)). As shown previously for PHA-stimulated

proliferation, only the highest dose of *G. vaginalis* tested induced a significant augmentation in the production of these two cytokines, compared to the PHA control without bacteria. For TNF- α , IL-12p70, and IL-10, the increases were non-significant, even at high doses (Figures 7(a), 7(b), and 7(e)). Compared to the control conditions without bacteria, exposure to 10⁷ CFU/mL *G. vaginalis* induced fold increases of 4.9, 4.0, 3.0, 2.2, and 2.2 for IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-17A, and IL-12p70 production, respectively. Contrastingly, the secretion level of IL-4 was barely measurable or undetectable at any dose of *G. vaginalis* (not shown). Furthermore, at their highest concentration, *L. reuteri* and *C. albicans* caused an increase in cytokine secretion that, depending on the cytokine, was 4- to 5-fold higher than that caused by *G. vaginalis* (data not shown). Overall, these data show that *G. vaginalis* can induce a slight dose-dependent secretion of cytokines on both the inflammatory (IFN- γ , TNF- α , IL-17A, and IL-12p70) and anti-inflammatory (IL-10) sides.

4. Discussion

DCs, the main sentinels of the immune system, are abundant in the human vaginal mucosa, both in the epithelium and in the lamina propria [21]. In this mucosal area, DCs can interact with luminal microorganisms, either indirectly via epithelial transport mechanisms or directly via dendrites extended across epithelial cells that take up bacteria from the vaginal lumen [31, 32]. As BV is characterized by an imbalance of the normal H₂O₂-producing *Lactobacillus* flora toward a polymorphic anaerobic flora with predominant *G. vaginalis*, it is likely that the PRRs of vaginal DCs are subsequently affected by this alteration. To gain insight into the pathophysiological role of *G. vaginalis* in BV, we decided to characterize the interactions between this bacterium and DCs.

We first carried out an electron microscope study of bacteria-DC interactions, the first stage in the immune response, to determine whether *G. vaginalis* can internalize DCs. This was confirmed by using TEM, but we observed that the bacteria were very sparsely represented in free form in culture medium and rather formed clusters coated in an extracellular matrix. As compared to a *Lactobacillus* species which remained in free form, *G. vaginalis* was internalized by DCs much less efficiently. It can reasonably be assumed that this difference is related to the propensity of *G. vaginalis* to form clusters. In addition, *G. vaginalis* forms, *in vivo*, biofilms in the vagina, a process that is involved in BV pathogenesis [33]. These clusters might be the beginning of biofilm formation. Biofilms reduce the host-immune response by decreasing bacteria internalization owing to their large size and to the fact that their extracellular matrix can prevent antigen recognition by APCs [34]. This conformation might thus allow bacteria like *G. vaginalis* to be less internalized by DCs comparatively to strains like *Lactobacillus* that are unable to form biofilms.

We then studied the impact of internalization of *G. vaginalis* on DC maturation status. The maturation state of DCs is a critical determinant of the balance between their

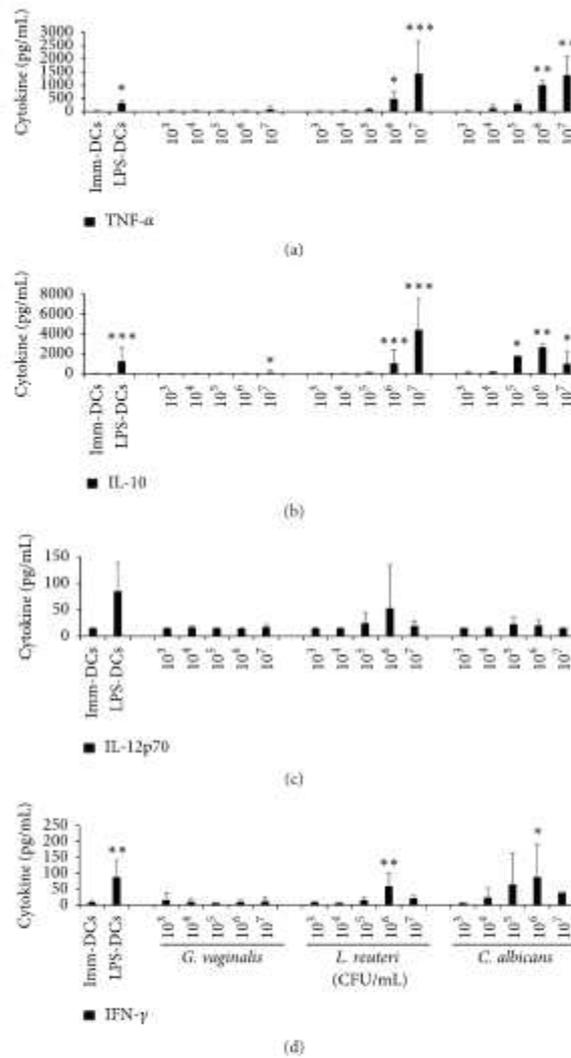


FIGURE 5: Cytokine production by human DCs exposed to a range of *G. vaginalis*, *L. reuteri*, or *C. albicans* concentrations. (a, b) TNF- α and IL-10 cytokine production. *G. vaginalis* induced a slight increase in IL-10 secretion at high doses but no significant production of TNF- α . (c, d) IL-12p70 and IFN- γ cytokine production. *G. vaginalis* induced no significant production of the 2 cytokines, even at the highest bacteria concentrations. Data are means (+ SD) of measurements from 6 independent experiments, except for *C. albicans* (3 experiments). Imm-DCs: immature DCs; LPS-DCs: DCs matured by a 48 h exposure to 100 ng/mL *E. coli* LPS; *G. vaginalis*, *L. reuteri*, and *C. albicans*: DCs matured after a 48 h incubation at different concentrations (10^3 to 10^7 CFU/mL, i.e., MOI = 0.01 to 100) of *G. vaginalis*, *L. reuteri*, and *C. albicans*, respectively. Friedman's test with Nemenyi's comparison * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ as compared to the Imm-DCs.

tolerogenic and immunogenic abilities [35]. Immature or semi-mature DCs generally promote tolerogenic responses whereas mature DCs promote immunogenic responses [36]. Flow cytometry analysis showed that, whatever bacterial concentrations, *G. vaginalis* elicited minimal changes in the DC membrane phenotype, thus inducing a very incomplete maturation of human DCs. Concurrently, cytokine

production remained very low compared to that from LPS-induced fully mature DCs or *L. reuteri*- or *C. albicans*-matured DCs, even at high doses of microorganisms. Taken together, our cytometric and cytokinetic data characterize a non-inflammatory DC response at low *G. vaginalis* doses and a very slight pro-inflammatory DC response at the highest concentration, *G. vaginalis* concentrations interacting

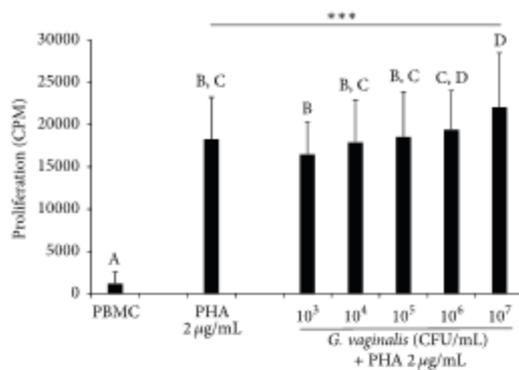


FIGURE 6: Modulation of PHA-induced lymphocyte proliferation after exposure to a range of *G. vaginalis* concentrations. As expected, 2 µg/mL PHA induced a strong proliferation of the lymphocyte control cells, reaching on average about 20 000 cpm. Compared to the PHA-stimulated control cells, a significant slight increase in lymphocyte proliferation was observed with the *G. vaginalis*-treated cells at a high dose. Data are means (+ SD) of measures from 13 independent experiments. PBMC: PBMCs cultured for 72 h without any effector; PHA control: PBMCs only exposed to PHA (2 µg/mL) for 72 h; *G. vaginalis*: PBMCs exposed for 72 h to PHA (2 µg/mL) in the presence of 10^3 to 10^7 CFU/mL of *G. vaginalis*. Two-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test (***) $p < 0.001$). A, B, C, and D: means with different superscript letters are significantly different from each other.

in vivo with mucosal DCs in the human genital tract have not been widely assessed. However, in women with BV, the number of bacteria present can be equal or superior to 10^8 per mL of vaginal fluid, including about 10^7 CFU/mL of *G. vaginalis* [37, 38]. Although unknown, the actual number of bacteria in direct contact with vaginal DCs within the mucosa is certainly much lower than this number. Thus, the concentrations of *G. vaginalis* interacting with vaginal DCs in the mucosa of women with BV probably correspond to the low or intermediate MOIs used in our model and causing no or very little DC maturation. The results obtained with *G. vaginalis* were compared to those obtained with two other microorganisms potentially present in the vaginal mucosa, a commensal bacterium (*L. reuteri*) and a pathogenic yeast responsible for mycotic vaginitis (*C. albicans*). Each induced a clear-cut maturation of the DCs, similar to that we previously observed with other pathogens and probiotic strains [39, 40] but in strong contrast to the *G. vaginalis* DC response. In our model, *G. vaginalis* did not induce DC mortality, unlike the two other microorganisms (data not shown). Overall, our findings show that *G. vaginalis* is slightly pro-inflammatory, but less than the *Lactobacillus* strain we used as control.

The effects of *G. vaginalis* on DCs observed in our study were slighter than those reported in other studies, which showed activation and maturation of human moDCs when exposed to the mucosal fluid of women with BV [23, 24]. In these previous studies, DCs were exposed to a mixture of numerous bacterial products secreted by the characteristic polymorphic BV flora and to molecules produced by the

mucosal immune system of women with BV. By contrast, in our model, DCs were placed in the presence of *G. vaginalis* alone to find new evidence of its role as a putative BV etiologic agent. Thus, the absence of or the very slight *G. vaginalis*-induced DC maturation by *in vitro* direct contact is not inconsistent with a DC maturation induced by substantially secreted products of the overall BV flora, like, for example, the LPS of *Prevotella bivia*. In the vaginal mucosa, *G. vaginalis* could have local specific modulatory effects on immune cells, independently of an overall effect on the maturation of BV flora.

We next performed functional tests of lymphocytic proliferation using a model of PHA-stimulated PBMCs to investigate the activation of lymphocytes, the following stage in the classical immune response. We observed no significant variation in lymphocyte proliferation at all doses of *G. vaginalis* that we used, except the highest one where a significant increase was measured. These findings are consistent with the variations observed in DC status and confirm that *G. vaginalis* induces very few immunologic effects at low doses and a slight pro-inflammatory response at the highest concentrations, which are unlikely to be encountered *in vivo*. This profile of the immunological response to *G. vaginalis* could explain the characteristic lack of external inflammatory signs during BV, in contrast with bacterial or mycotic vaginitis, despite increased pro-inflammatory TLR2 and TLR4 signaling and IL-1 β secretion reported elsewhere [41–43]. In light of our results, we hypothesize that, depending on its actual amount in contact with the mucosal immune cells, *G. vaginalis* could either go unnoticed or induce low-grade inflammation *in vivo*.

To explore the mechanism of the slight *G. vaginalis*-induced increase in lymphocyte proliferation, a large panel of cytokines was measured in the cell supernatants including molecules secreted by APCs (IL-10, IL-12p70, and TNF- α) and/or by T cells (IFN- γ , IL-4, IL-17A, and IL-10). We evidenced a similar *G. vaginalis* dose-dependent profile of secretion for all these cytokines, except for IL-4, which remained undetectable. The higher the dose of the pathogen was, the stronger the PHA-stimulation of cytokine secretion was. Thus, this cytokine secretion profile is clearly related to that of the proliferation of PHA-stimulated PBMCs, irrespective of the anti- or pro-inflammatory nature of the cytokines. With regard to the response to *G. vaginalis* of the four main subpopulations of T cells, cytokine secretion suggests a clear dose-dependent induction of Th1 (IFN- γ , IL-12p70) and Th17 (IL-17A) and Tregs (IL-10), but not of Th2 (IL-4). Thus, Th1, Th17, and Tregs could be involved in the immune response to high doses of *G. vaginalis*. This topic deserves further investigation in future studies of T cell polarization.

Taken together, our findings show that *G. vaginalis*, by forming clusters and reducing the internalizing ability of DC, induces a slight immunological host response including maturation of DCs, lymphocyte proliferation, and pro-Th1, pro-Th17, and pro-Tregs cytokine production. These immunomodulatory properties are consistent with the atypical clinical profile of BV, which is characterized by a low-grade inflammatory process, as we observed in our *in vitro* model at the highest dose of the bacterium. Our results

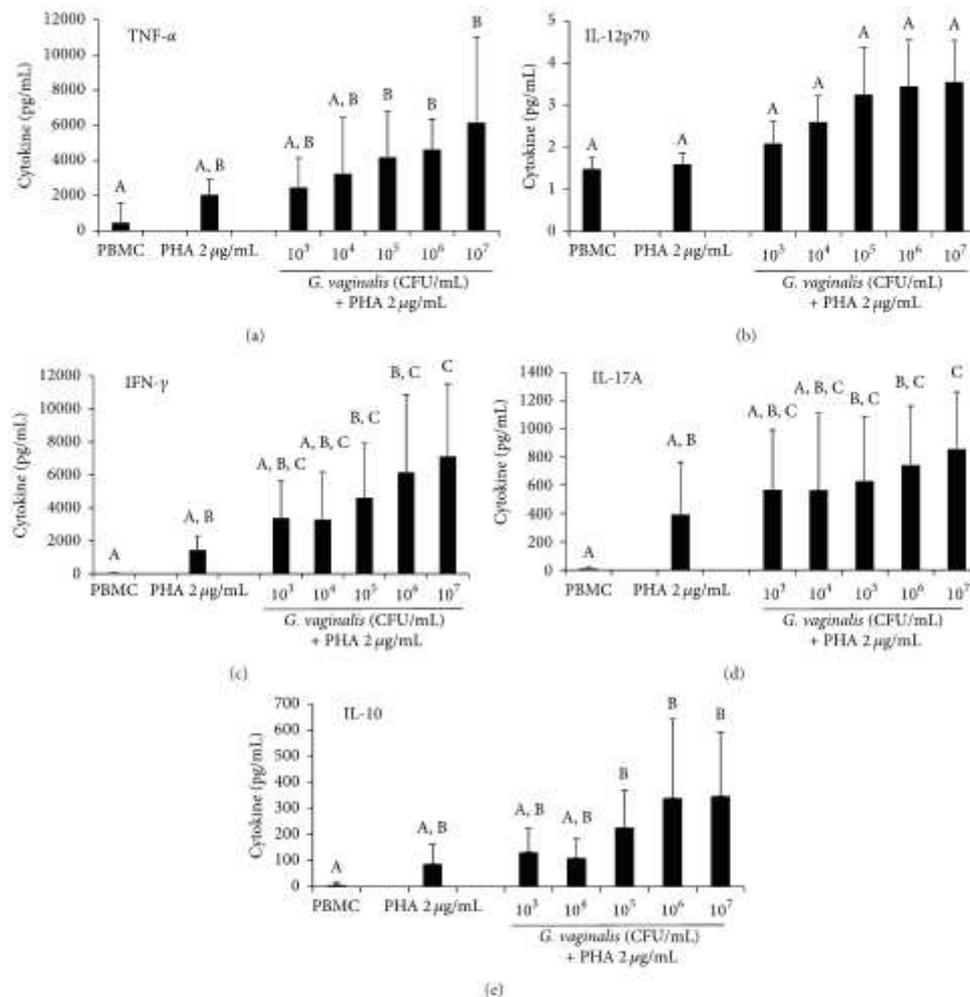


FIGURE 7: Modulation of PHA-induced cytokine secretion after exposure to a range of *G. vaginalis* concentrations. (a) TNF- α secretion ($n = 6$). (b) IL-12p70 secretion ($n = 8$). (c) IFN- γ secretion ($n = 7$). (d) IL-17a secretion ($n = 8$). (e) IL-10 secretion ($n = 8$). Compared to the PHA-stimulated control cells, a significant and dose-dependent increase in cytokine secretion was observed for IL-17a and IFN- γ with the *G. vaginalis*-treated cells. Other cytokines showed no significant increase in secretion. Data are means (\pm SD). PBMC: PBMCs cultured for 72 h without any effector; PHA control: PBMCs only exposed to PHA (2 μ g/mL) for 72 h; *G. vaginalis*: PBMCs exposed for 72 h to PHA (2 μ g/mL) in the presence of 10³ to 10⁷ CFU/mL of *G. vaginalis*. Friedman's test with Nemenyi's comparison ($p < 0.05$). A, B, and C: means with different superscript letters are significantly different from each other.

show the potential immunological effects of the bacteria of the vaginal flora and suggest the existence of a mechanism whereby BV and its associated changes in flora composition could affect host vaginal immunity. Finally, these results lend weight to the putative role of *G. vaginalis* in the pathophysiology of BV and open up broader prospects, in particular for the understanding of the contribution of local immunological alterations to the increased risk of STIs in women with BV.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank the CICS of Clermont-Ferrand and are very grateful to Christelle Blavignac, Claire Szczepaniak, and

Lorraine Novais Gameiro for their generous cooperation. This work was partially supported by a grant of the regional council of Auvergne.

References

- [1] J. E. Allsworth and J. F. Peipert, "Prevalence of bacterial vaginosis: 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Survey data," *Obstetrics and Gynecology*, vol. 109, no. 1, pp. 114–120, 2007.
- [2] H. Leitich, B. Bodner-Adler, M. Brunbauer, A. Kaidler, C. Egarter, and P. Husslein, "Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 189, no. 1, pp. 139–147, 2003.
- [3] S. L. Hillier, R. P. Nugent, D. A. Eschenbach et al., "Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant," *The New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 26, pp. 1737–1742, 1995.
- [4] J. Atashili, C. Poole, P. M. Ndumbe, A. A. Adimora, and J. S. Smith, "Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies," *AIDS*, vol. 22, no. 12, pp. 1493–1501, 2008.
- [5] N. Sewankambo, R. H. Gray, M. J. Wawer et al., "HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis," *The Lancet*, vol. 350, no. 9077, pp. 546–550, 1997.
- [6] E. H. Koumans, L. E. Markowitz, and V. Hogan, "Indications for therapy and treatment recommendations for bacterial vaginosis in nonpregnant and pregnant women: a synthesis of data," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 35, no. 2, pp. S152–S172, 2002.
- [7] M. A. D. Antonio, S. E. Hawes, and S. L. Hillier, "The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 180, no. 6, pp. 1950–1956, 1999.
- [8] D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, and J. M. Marrazzo, "Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 18, pp. 1899–1911, 2005.
- [9] U. Forsum, E. Holst, P. G. Larsson, A. Vasquez, T. Jakobsson, and I. Mattsby-Baltzer, "Bacterial vaginosis—a microbiological and immunological enigma," *APMIS*, vol. 113, no. 2, pp. 81–90, 2005.
- [10] J. R. Schwebke, "New concepts in the etiology of bacterial vaginosis," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 11, no. 2, pp. 143–147, 2009.
- [11] H. L. Gardner and C. D. Dukes, "New etiologic agent in nonspecific bacterial vaginitis," *Science*, vol. 120, no. 3125, p. 853, 1954.
- [12] W. E. Josey and J. R. Schwebke, "The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment," *International Journal of STD and AIDS*, vol. 19, no. 3, pp. 152–154, 2008.
- [13] P. A. Mårdh, E. Holst, and B. R. Møller, "The grivet monkey as a model for study of vaginitis. Challenge with anaerobic curved rods and *Gardnerella vaginalis*," *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology Supplement*, vol. 86, pp. 201–205, 1984.
- [14] J. D. Sobel, "Vaginitis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 337, no. 26, pp. 1896–1903, 1997.
- [15] A. Swidsinski, W. Mendling, V. Loening-Baucke et al., "An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 198, no. 1, pp. 97.e1–97.e6, 2008.
- [16] N. Cools, P. Ponsaerts, V. F. I. Van Tendeloo, and Z. N. Berneman, "Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 82, no. 6, pp. 1365–1374, 2007.
- [17] J. Sabaté, J. Maggini, K. Nahmod et al., "Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 18, no. 1–2, pp. 5–17, 2007.
- [18] A. Mazzoni and D. M. Segal, "Controlling the Toll road to dendritic cell polarization," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 75, no. 5, pp. 721–730, 2004.
- [19] J. Zhu and W. E. Paul, "Heterogeneity and plasticity of T helper cells," *Cell Research*, vol. 20, no. 1, pp. 4–12, 2010.
- [20] T. Kaldensjö, P. Petersson, A. Tolf, G. Morgan, K. Broliden, and T. Hirbod, "Detection of intraepithelial and stromal langerin and CCR5 positive cells in the human endometrium: potential targets for HIV infection," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 6, Article ID e21344, 2011.
- [21] D. Duluc, J. Gannevat, E. Anguiano et al., "Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses," *Mucosal Immunology*, vol. 6, no. 3, pp. 626–638, 2013.
- [22] L. de Witte, A. Nabatov, and T. B. H. Geijtenbeek, "Distinct roles for DC-SIGN⁺-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 12–19, 2008.
- [23] E. P. St John, J. Martinson, J. A. Simoes, A. L. Landay, and G. T. Spear, "Dendritic cell activation and maturation induced by mucosal fluid from women with bacterial vaginosis," *Clinical Immunology*, vol. 125, no. 1, pp. 95–102, 2007.
- [24] E. P. St John, M. R. Zariffard, J. A. Martinson, J. A. Simoes, A. L. Landay, and G. T. Spear, "Effect of mucosal fluid from women with bacterial vaginosis on HIV trans-infection mediated by dendritic cells," *Virology*, vol. 385, no. 1, pp. 22–27, 2009.
- [25] J. J. Schellenberg, C. M. Card, T. B. Ball et al., "Bacterial vaginosis, HIV serostatus and T-cell subset distribution in a cohort of East African commercial sex workers: retrospective analysis," *AIDS*, vol. 26, no. 3, pp. 387–393, 2012.
- [26] G. Anton, J. Rid, I. Mylonas, K. Friese, and E.-R. Weissenbacher, "Evidence of a TH1-shift of local vaginal inflammatory response during bacterial vaginosis," *Infection*, vol. 36, no. 2, pp. 147–152, 2008.
- [27] S. Cauci, S. Guaschino, D. De Aloysio et al., "Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1 β and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women," *Molecular Human Reproduction*, vol. 9, no. 1, pp. 53–58, 2003.
- [28] S. Cauci, J. F. Culhane, M. Di Santolo, and K. McColm, "Among pregnant women with bacterial vaginosis, the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase are positively associated with interleukin-1 β ," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 198, no. 1, pp. 132.e1–132.e7, 2008.
- [29] C. Mitchell and J. Marrazzo, "Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 71, no. 6, pp. 555–563, 2014.
- [30] C.-Y. Li, H.-C. Lin, C.-H. Lai, J. J.-Y. Lu, S.-F. Wu, and S.-H. Fang, "Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on both murine and human mitogen-activated T cells," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 156, no. 2, pp. 128–136, 2011.

- [31] M. Rescigno, M. Urbano, B. Valzasina et al., "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria," *Nature Immunology*, vol. 2, no. 4, pp. 361–367, 2001.
- [32] D. M. LeBlanc, M. M. Barousse, and P. L. Fidel Jr., "Role for dendritic cells in immunoregulation during experimental vaginal candidiasis," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 6, pp. 3213–3221, 2006.
- [33] A. Swidsinski, W. Mendling, V. Loening-Baucke et al., "Adherent biofilms in bacterial vaginosis," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 106, no. 5, part 1, pp. 1013–1023, 2005.
- [34] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318–1322, 1999.
- [35] S. Manicassamy and B. Pulendran, "Dendritic cell control of tolerogenic responses," *Immunological Reviews*, vol. 241, no. 1, pp. 206–227, 2011.
- [36] M. B. Lutz and G. Schuler, "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" *Trends in Immunology*, vol. 23, no. 9, pp. 445–449, 2002.
- [37] A. N. Masfari, B. I. Duerden, and G. R. Kinghorn, "Quantitative studies of vaginal bacteria," *Genitourinary Medicine*, vol. 62, no. 4, pp. 256–263, 1986.
- [38] C. A. Spiegel, R. Amsel, D. Eschenbach, F. Schoenknecht, and K. K. Holmes, "Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 303, no. 11, pp. 601–607, 1980.
- [39] B. Evrard, D. Balestrino, A. Dosgilbert et al., "Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*," *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 1, pp. 210–219, 2010.
- [40] B. Evrard, S. Coudeyras, A. Dosgilbert et al., "Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 4, Article ID e18735, 2011.
- [41] A. R. Goepfert, M. Varner, K. Ward et al., "Differences in inflammatory cytokine and Toll-like receptor genes and bacterial vaginosis in pregnancy," *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 193, no. 4, pp. 1478–1485, 2005.
- [42] M. R. Zariffard, R. M. Novak, N. Lurain, B. E. Sha, P. Graham, and G. T. Spear, "Induction of tumor necrosis factor- α secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 191, no. 11, pp. 1913–1921, 2005.
- [43] S. Cauci, "Vaginal immunity in bacterial vaginosis," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 6, no. 6, pp. 450–456, 2004.

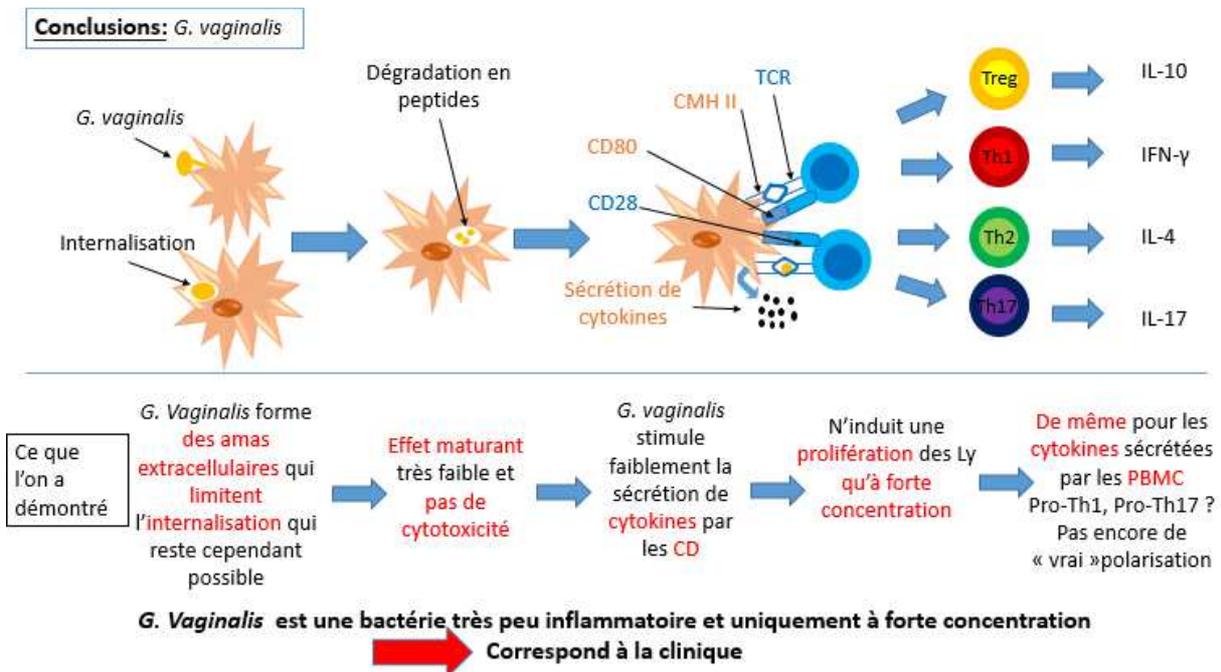


Figure 32. Récapitulatif des résultats obtenus après nos expérimentations *in vitro* sur *G. vaginalis*.

Les principaux points à retenir de cette étude (Figure 32)

Sur la réponse des cellules dendritiques :

- *G. vaginalis* est internalisée par les DC. Cependant, la formation en cluster, caractéristique de cette bactérie qui a la capacité à former des biofilms ralentit ou inhibe fortement cette internalisation.

- *G. vaginalis* induit une maturation des DC qui est dose-dépendante. A faible concentration aucune modification phénotypique de DC n'est observée. A forte concentration, *G. vaginalis* induit une légère augmentation de l'expression des molécules de costimulation, synonyme de faible maturation.

-*G. vaginalis* n'augmente pas le taux de mortalité des DC dans le modèle *in vitro* étudié.

- L'induction de cytokine sécrétée par les DC est faible. La seule cytokine augmentant légèrement mais significativement est l'IL-10.

Sur la réponse des PBMC :

- *G. vaginalis* module de façon dose-dépendante la prolifération induite par la PHA. Aucun effet n'est observé à faible concentration. A forte dose, les résultats indiquent une légère mais significative augmentation de la prolifération induite par *G. vaginalis*.

- La faible augmentation de prolifération observée est accompagnée par une légère augmentation d'IFN- γ et d'IL-17A.

G. vaginalis est par conséquent une bactérie peu inflammatoire, presque invisible pour le système immunitaire. Ces différents points seront approfondis dans la discussion.

Article n°2

**Dose-dependent immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus*
Lcr35 on human dendritic cells and T cells**

Bertran T., Brachet P., Dosgilbert A., Vasson MP., Forestier C., Evrard B.

Objectif de cette étude

Cette étude s'est articulée autour de deux thèmes principaux :

- **L'effet du Lcr35 sur les différentes étapes caractérisant la réponse des cellules dendritiques dérivées de monocytes :**

- l'interaction et internalisation du Lcr35
- les changements phénotypiques et la maturation induite des DC en réponse au Lcr35
- l'effet du Lcr35 sur la mortalité des DC
- l'induction de l'indoleamine-2,3-dioxygénase
- le profil de sécrétion cytokinique en réponse au contact des DC avec le Lcr35

- **L'effet du Lcr35 sur la modulation de la prolifération lymphocytaire et des sous-populations de lymphocytes T :**

- la modulation de la prolifération des PBMC stimulées à la PHA
- la modulation de la sécrétion de cytokines par les PBMC en réponse au contact avec le Lcr35
- la modulation des sous-populations lymphocytaires T

Introduction

Studies of the microbiome has been done form decades and, as technical tools evolved, the number of bacteria found into the human body, especially in skin and mucosa, largely increased. It is now known that human gastrointestinal tract is the most colonized part of the body with approximately 10^{14} and 10^{11} commensal bacteria in the colon and in the small intestine, respectively [1]. This huge amount of commensal bacteria is continuously in direct contact with the immune system *via* immature dendritic cells (DCs). DCs are numerous, as the principal antigen presenting cells (CPAs), in the mucosal barrier as well as in the epithelium and the Peyer's patches where they sense the gastrointestinal environment. Immature DCs recognize microbe-associated molecular patterns (MAMPs) through their pattern recognition receptors (PRRs). Toll-like receptors (TLRs) and C-type Lectin receptors (CLRs) are two types of PRRs. Their stimulation by MAMPs leads to phenotypical changes in DCs called maturation, like chemokine-receptor expression changes, inducing DC migration from the gastrointestinal tract to the lymph node where they present antigens to lymphocytes [2]. In the lymph node, interaction between MHC class II molecules of DCs and the complex TCR/CD3 of lymphocytes starts the response and antigen recognition. CD80, CD86 and CD28 expression and interaction enhance the response and T cell proliferation by stimulating intracellular signaling pathways. In the same time, DCs secrete cytokines inducing naïve T cell polarization to mature T cell subpopulations [3]. These cytokines are essential for T cell polarization: production of IL-12 and IFN γ , on the one hand, and IL-4, on the other hand, drives polarization towards Th1 and Th2, respectively, while IL-23, IL-6 and TGF- β induce Th17 and IL-10 induces regulatory T cells (Treg) [4]. From an immunological point of view, he contact between immature DCs and bacteria is a Janus checkpoint inducing potentially two opposite responses: (i) to recognize the trillion of commensal bacteria and then to induce a tolerogenic response (Treg), but also (ii) to identify pathogens among them to induce an adaptive response by driving naïve T cells in a

specific subpopulation of T helper (Th1, Th2, Th17) [5]–[7]. These responses are tightly regulated and a dysregulation of the gut microbiota may induce several pathologies involving T cell response and known as dysimmune diseases, such as allergy, inflammatory bowel disease (IBD) and multiple sclerosis [8]–[10].

Probiotics have shown to be of particular interest both microbiologically and immunologically. According to World Health Organization (WHO) and validated by a consensus document, probiotics are “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” [11]. Thanks to their MAMPs, probiotics are recognized by DCs and may induce either a tolerogenic or a specific immune response. Lactobacilli are part of the commensal bacteria and constitute one of the most used strains as probiotics. *In vitro*, some of these strains modulate DCs and induce a regulatory response by decreasing the secretion of pro-inflammatory mediators and enhancing that of IL-10 [12]–[14]. These strains are interesting in pathology like IBD to regulate the excess of inflammation. However, they may also induce Th1 cytokine secretion [15], [16] and thereby be used to counterpart allergic symptoms or infectious diseases. Lcr35, a *Lactobacillus rhamnosus* strain, is used since decades for the treatment of post-antibiotic diarrhea. A first study was published in 2011 about *in vitro* effects of Lcr35 on monocyte-derived DCs (moDCs) showing that high doses of this strain induced moDC semi-maturation with pro-inflammatory effects [17].

The aim of the present study was to characterize Lcr35 effects on both moDCs and T cells. We investigated responses of these cells after contact with a wide range of Lcr35 concentrations using electron microscopy, flow cytometry, proliferation assays, cytokine assays and T cell intracellular staining. Our results bring new information on the usefulness of Lcr35 against pathogenic infections.

Material and methods

Bacterial strains and culture conditions

Lactobacillus rhamnosus 35 (Lcr35) was grown overnight at 37°C in De Man, Ragoza, Sharp (MRS) medium (BD Difco TM, BD diagnostics, Le pont-de-Claix, France). Bacterial cells were harvested by centrifugation (8609 x g for 1 min), washed twice with sterile water and resuspended in Phosphate Buffered Saline (PBS). Optical density (OD) measurements were performed at 620 nm to adjust the final concentration, then the exact number of Colony Forming Units (CFU) was determined by plating serial dilutions of the inocula onto MRS agar plates. Before being added to the cell samples, bacteria were inactivated by exposure to UV-C for 1 h. The effectiveness of the UV inactivation was evaluated by plating 20 µL of the irradiated inocula onto MRS agar plates.

Ethics statement

The human cells used in this study were generated from the leucodepletion filter of healthy volunteers obtained from the local French blood agency (Etablissement Français du Sang, EFS, Saint-Etienne). It is a statutory requirement that blood donors be given full necessary information (article R.1221-5 of the Public Health Code, 12/01/2009 and 11/06/2006 decrees). Written informed consent was obtained by the EFS from all volunteers involved in our study.

Obtaining of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

PBMCs were obtained from leucodepletion filter of healthy volunteers by Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) density gradient centrifugation. Then, PBMCs were washed four times in PBS (Sigma-Aldrich) by centrifugation (10 min, 400 g) to remove platelets, then they were counted on a Malassez cell with an optical microscope. Finally, depending on the experiment (see below), PBMCs were resuspended at the final concentration needed. For Mixed Leucocyte Reaction (MLR) experiments, some PBMCs were frozen at 1.5×10^7 cells/mL in Fetal Calf Serum (FCS, Biowest-Abcys, Nuaille, France) supplemented with 10% DMSO (Sigma-Aldrich).

In vitro differentiation of moDCs

PBMCs were resuspended at a final concentration of 5×10^7 cells/mL in PBS supplemented with 2% FCS and 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich). moDCs were purified by negative selection using the EasySep[®] Human Monocyte Enrichment Kit, as recommended by the manufacturer (StemCell Technologies, Grenoble, France). Then, they were cultured for 5 days in RPMI 1640 (Pan-Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% FCS, 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich) and 0.5% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich), in the presence of 500 U/mL IL4 (Miltenyi biotec, Paris, France) and 800 U/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, Miltenyi biotec). After 3 days of incubation, one-half volume of fresh culture medium containing 2X concentrations of IL4 and GM-CSF was added to each well.

Electron microscope observations of DC interaction with Lcr35

DCs obtained as previously described were plated in a 12-well sterile plate at a concentration of 1×10^6 cells/mL. UV-killed Lcr35 was added to wells at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 1 h (Scanning Electron Microscopy, SEM) and 0.01, 1 or 100 for 3 h (Transmission Electron Microscopy, TEM). Cells were harvested, centrifuged ($400 \times g$ for 10 min) and rinsed with sodium cacodylate (0.2 M, pH 7.4) for 10 min, then fixed at 4°C overnight with 1.6% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer. The samples were then rinsed, post-fixed with 1% osmium tetroxide (1 h, room temperature), rinsed again, and dehydrated with graded series of ethanol (70 to 100%) and eventually with hexamethyldisilazane. Finally, after overnight evaporation, samples were placed on a Jeol SEM filter and metallised with carbon (40 sec). For TEM, dried samples were embedded in a polymerized 2 mm thick Epon coating, and ultrathin sections were picked up with Formvar-coated copper grids (300 mesh). Sections were counterstained with 4% aqueous uranyl acetate. For negative staining, bacteria were grown overnight in M63B1-0.4% Glu medium and negatively stained with 2% phosphotungstic acid on Formvar-coated copper grids (300 mesh). Images were captured at the Centre d'Imagerie Cellulaire Santé (CICS) of the Université d'Auvergne with a Jeol JSM-6060LV (SEM) and a Hitachi H-7650 (TEM).

Analysis of DC maturation and viability

On day 5, the immature DCs from each well were harvested, pooled, centrifuged and reseeded in 12-well plates at 1×10^5 cells/mL. UV-killed bacteria were then added at $10 \mu\text{L}$ of suspension per well to reach a final concentration ranging from 10^3 to 10^7 CFU/mL, *i.e.* a MOI between 0.01 and 100. Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 100 ng/mL was used as positive control. Immature DCs without addition

of LPS or bacteria were used as negative controls. After 48 h of maturation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, DCs were collected, centrifuged and resuspended in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma). Cell surfaces were stained with the appropriate fluorescence-labeled murine antibodies: APC-Cy7-conjugated anti-CD14 (LPS co-receptor, specific of monocytes), PE-conjugated anti-CD86 (co-stimulatory molecule, activation marker), V450-conjugated anti-HLA-DR, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-DC-SIGN (DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin or CD209, member of the CLR family, specific marker of immature DCs), Alexa Fluor® 488-conjugated anti-MR (Mannose Receptor or CD206, member of the CLR family, specific marker of immature DCs and macrophages) and streptavidin APC-conjugated anti-TLR4 (biotin antibody, an LPS receptor with activation functions). Antibodies were obtained from BD Biosciences, except anti-MR (Biolegend, Ozyme, St Quentin Yvelines, France). Corresponding murine isotype-matched and non-labeled antibodies (BD Biosciences or Biolegend) were used as controls. The cells were analysed by a BD-LSRII flow cytometer with FACSDiva Software 6.1.3 (BD Biosciences) at the CICS. Fluorescence compensation adjustments were performed with compensation beads labelled with the appropriate fluorochromes. Gates were set on living DCs based on their forward/side scatter (FSC/SSC) properties. The analysis was halted at a count of 3,000 DCs. The level of staining was expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). Culture supernatants were collected and stored at -20°C until cytokine analysis. To determine cell viability, LIVE/DEAD® dye (Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation Life technologies) was added to cells and used as marker of dead cells. DC mortality was assessed by gating together dead cells and live DCs on SSC/FSC diagram. Two other gates were created from this gate to separate the two populations. From the dead cell gate, cells that expressed LIVE/DEAD marker were considered as effectively dead. This dead cell number was expressed as a ratio of the first created overall gate to obtain a dead DC percentage.

Lymphoblastic Transformation Test (LTT)

The mitogenic response to plant lectins, as phytohemagglutinin A (PHA), is conventionally used to measure cell-mediated immunity in mammals in general and especially in humans (Li et al, 2011). This test is named lymphocyte proliferation assay or lymphocyte transformation test (LTT). It was performed here to study the functional properties of Lcr35 and especially its capabilities to modulate PHA-induced T cell proliferation. On day 1, PBMCs obtained as previously described were adjusted to a concentration of 1×10^6 cells per mL of complete medium, *i.e.* RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and 1% L-glutamine. The cell suspension was deposited in a 96-well sterile plate (100 μ L per well). Each measurements was done in triplicate. Polyclonal proliferation of lymphocytes was induced with 2 μ g/mL of PHA (Sigma-Aldrich). Cells without PHA or bacteria were used as a negative control and cells with PHA without bacteria as a positive one. Lcr35 was added to other PHA-treated wells to obtain concentrations ranging from 10^3 to 10^7 CFU/mL. After 72 h incubation at 37°C under 5% CO₂, 1 μ Ci of tritiated thymidine (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) was added to each well and the cells were further incubated for 4 h. Labeling was stopped by cooling the plate to 4°C. The cells were then collected under vacuum onto a Whatman filter paper and incorporation of tritiated thymidine was measured using a β counter (Tri-Carb 2300TR, Canberra-Packard). Proliferation results were expressed as mean counts per min (cpm) values of triplicate measurements. Identical incubations, however without addition of tritiated thymidine, were carried out in parallel to collect supernatants, for cytokine quantification and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity. The same protocol, also without adding tritiated thymidine, was done for LTT intracellular staining (see below).

Mixed Leukocyte Reaction (MLR)

PBMCs were quickly thawed in water bath at 37°C and resuspended with RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and cultured overnight at 37°C in 5% CO₂. PBMCs (10⁵ cells/well) were cocultured in triplicate with allogeneic DCs (at a 10:1 ratio) matured under different concentrations of Lcr35 (as previously described) in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1% L-Glutamine. After allogeneic PBMC-DC coculture for 5 days at 37°C (5% CO₂) in 96-well round bottom plates, tritiated thymidine was added to the wells for 16 h. Proliferation assay was performed. Identical incubations without tritiated thymidine were carried out in parallel to collect cells for intracellular staining.

T cell intracellular staining

At the end of proliferation assays (day 3 and 5 for LTT and MLR, respectively), cells were stimulated again for 6 h by CytoStim (20 µL for 10⁷ cells/mL, Miltenyi Biotec). After 1 h, Brefeldin A (10 µg/mL, Sigma) was added to each well for 5 h. Cell triplicates were then harvested, pooled, fixed, permeabilized (FoxP3 Staining Buffer Set Human, Miltenyi Biotec) and stained. The cell surface was stained with the appropriate fluorescence-labeled murine antibodies: VioBlue-conjugated anti-CD3, PerCP-conjugated anti-CD4, VioGreen-conjugated anti-CD8 (all from Miltenyi Biotec) and PE-Cy5-conjugated anti-CD25 (BioLegend). Intracellular cytokines and transcription factors were stained with the appropriate fluorescence-labeled murine antibodies: APC-Vio770-conjugated anti-IFN γ , PE-conjugated anti-IL-4, PE-Vio770-conjugated anti-IL17A and APC-conjugated anti-FoxP3 (all from Miltenyi Biotec). Corresponding murine isotype-matched and non-labeled cells were used as controls. The cells were analysed by a BD-LSRII flow cytometer with FACSDiva Software 6.3.1 (BD

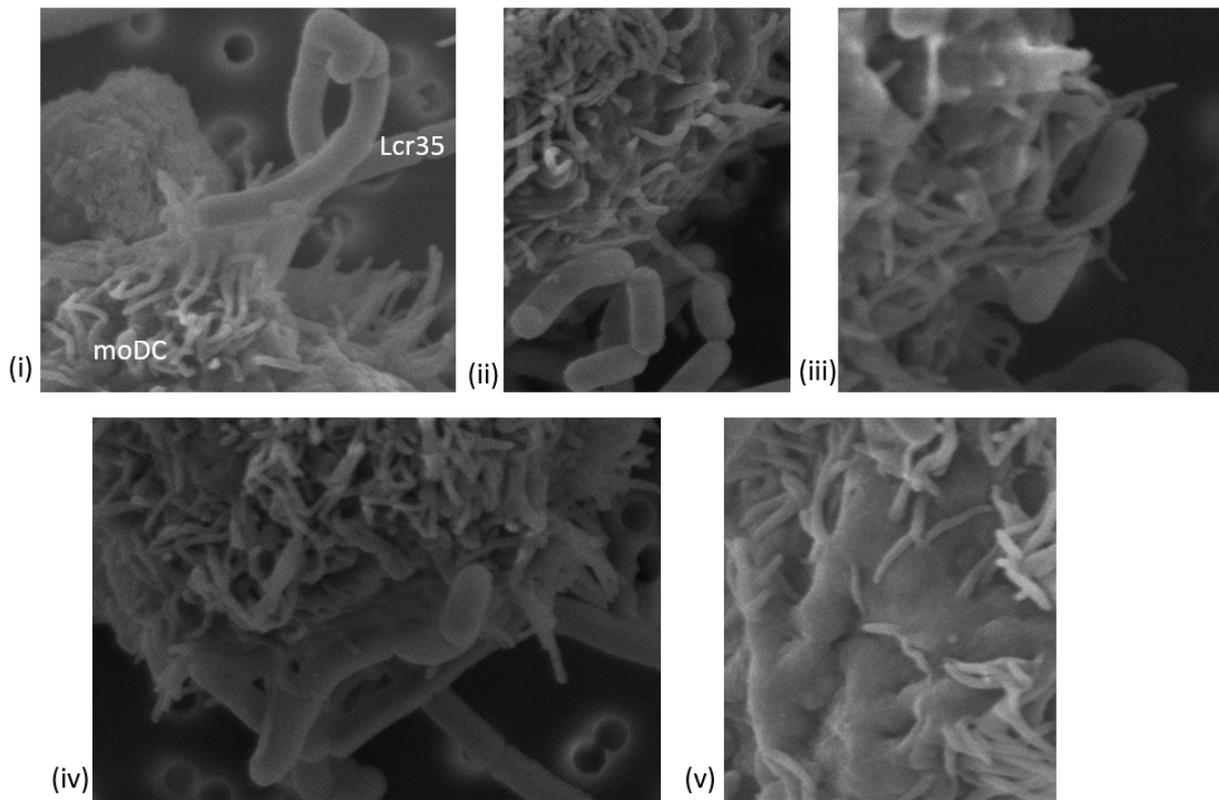


Figure 1: SEM pictures of DCs after 1 h of exposure to Lcr35. (i) DC dendrite interacts with Lcr35 (x10000). (ii) DC dendrites catch Lcr35 (x11000). (iii) DC dendrites surround Lcr35 (x7000). (iv) DC starts to internalize Lcr35 (x7000). (v) Lcr35 is internalized in DC and appears under DC membrane (x6000). MoDC = monocyte derived dendritic cells.

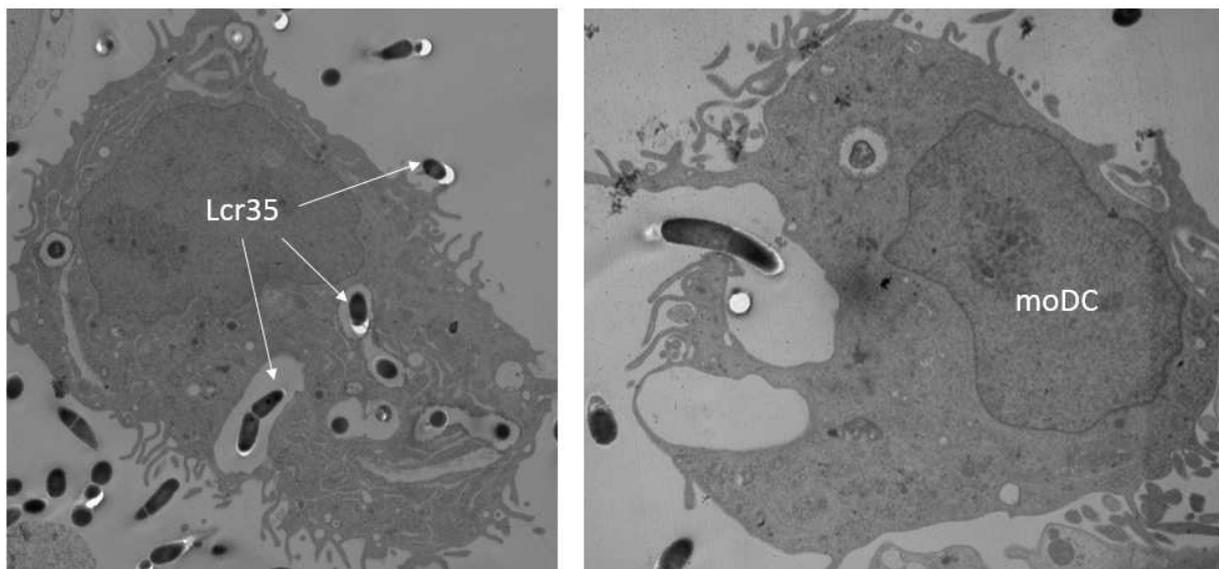


Figure 2: TEM pictures of DCs after 3 h of exposure to Lcr35. Both pictures shows internalized Lcr35 in DC (x7000). MoDC = monocyte derived dendritic cells.

Biosciences) at the CICS. Fluorescence compensation adjustments were performed with compensation beads labeled with the appropriate fluorochromes. Gates were set on T cells based on their forward/side scatter properties. The analysis was halted at a count of 5,000 T cells. The level of staining was expressed as the mean fluorescence intensity (MFI).

Kynurenine and tryptophan assay for estimation of IDO activity

Frozen PBMC medium (200 μ L) obtained after 72 h of cell culture was rapidly thawed and mixed to 15 μ L of 0.37 mM 6-methyltryptophan (6-mTRP) (Sigma-Aldrich), used as internal standard, and 10 μ L of 70 % perchloric acid (Sigma-Aldrich). Then, the mixture was shortly vortexed and allowed to stand at 4°C for 30 min to precipitate proteins. After centrifuging the mixture for 20 min at 3000 g, the resulting supernatant was carefully sampled and directly submitted to kynurenine (KYN) and tryptophan (TRP) assay.

The latter was performed by reversed phase-HPLC as previously described by Zhang et al. (2009) with the following modifications. The chromatographic system consisted of PE LC-250B analytical pump coupled with a Series 200 automated sample injector (PerkinElmer), and an ODS Hypersil (250 x 4.6 mm, 5 μ m particle size) reversed-phase column (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France). Detection of KYN, TRP and 6-mTRP was achieved using PerkinElmer Series 200 UV/Vis spectrophotometer and Diode Array detector. KYN, on the one hand, and TRP and 6-mTRP, on the other hand, were detected at 360 and 285 nm, respectively. The system was monitored and the data were acquired and processed with the PerkinElmer TotalChrom software. Chromatographic separation was achieved by a gradient elution program with a constant flow rate of 0.8 mL/min at ambient temperature. After injection (20 μ L injected) the sample was eluted for 13 min with a mobile phase consisting of 100% of 15 mmol/L acetate buffer (pH 4.0) and acetonitrile (90:10, v/v)(solvent A), followed with a 1-min linear gradient

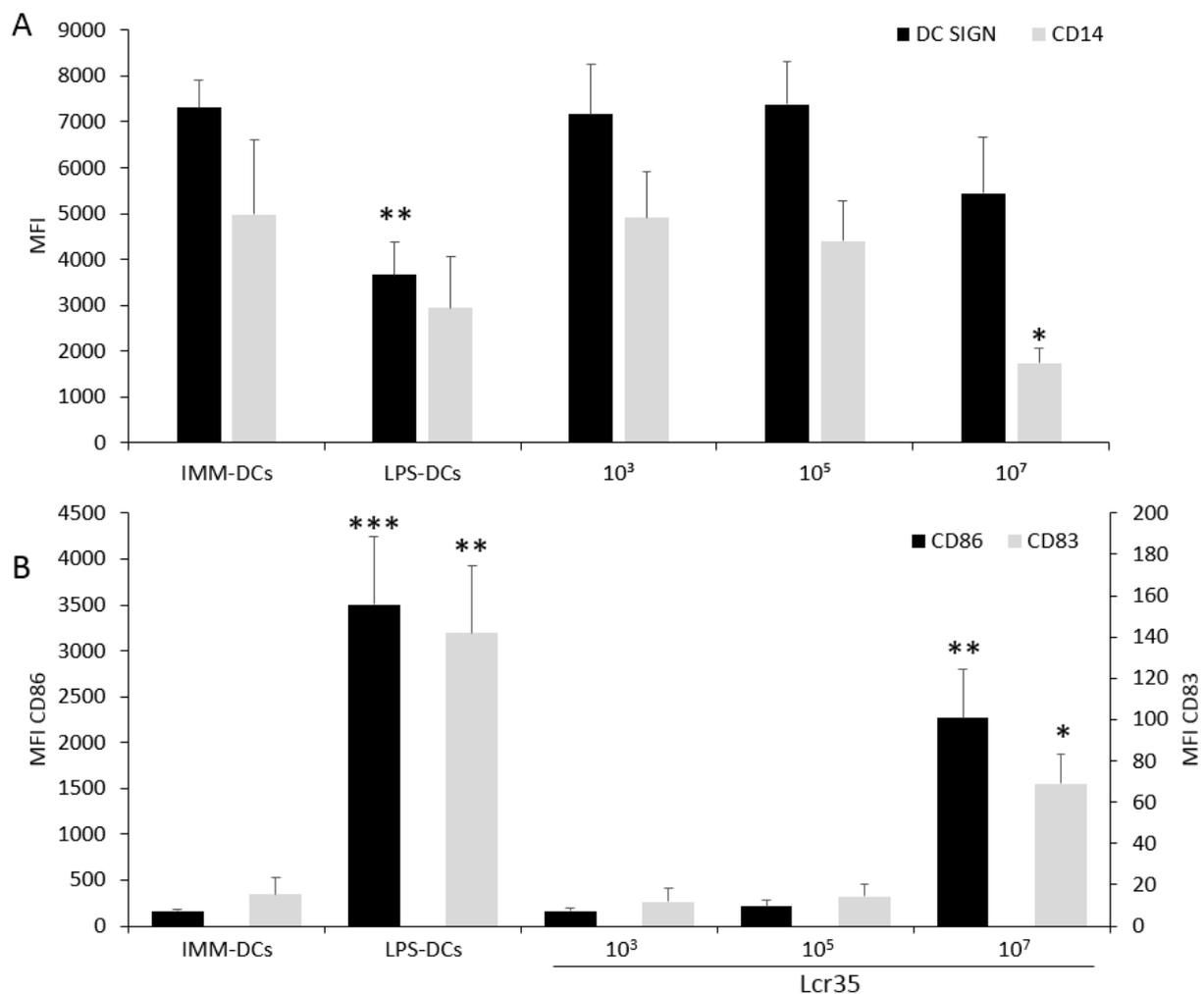


Figure 3: Surface phenotype of Human DCs after exposure for 48 h to a range of Lcr35 concentrations (CFU/mL). (A) Histograms represent MFI values of DC-SIGN and CD14 on gated DC. (B) Histograms represent MFI values of CD86 and CD83 on gated DC. Data are means (+ SEM) of measurements from 7 independent experiments. IMM-DCs: Immature DCs, LPS-DCs: DCs matured by a 48 h exposure to 100ng/mL *E.coli* LPS. Kruskal-Wallis test with Dunn comparison * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared to the Imm-DCs.

to 80% of solvent A and 20% of acetonitrile/water (75:25, v/v) (solvent B), then a 10-min isocratic period with 80 and 20% of solvents A and B (v/v) and finally a 1-min linear gradient to 100% of solvent A before re-equilibration to the initial condition for 5 min. Total run time was 30 min.

For KYN and TRP quantification in samples, series of mixed standard working solutions of KYN, TRP and 6-mTRP with different concentrations (0.5 - 26.4 μ M, 0.5 - 26 μ M and 25.6 μ M, respectively) were prepared by extemporaneous dilution of standard stock solutions (stored at - 20°C) in 3% perchloric acid. A standard diluted solution was run after every four sample injections. IDO activity was estimated by calculating the ratio of KYN to TRP concentrations in the culture medium of PBMC.

Cytokine quantification

For DC maturation experiments and lymphocyte proliferation assays, 17 cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β and TNF- α) were quantified in supernatants using Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex 1 x 96 kit (Bio-Rad) with a Bio Plex® 200 (Bio-Rad).

Statistical analysis

All data were expressed as means + SEM. After variance dispersion test, three different statistical tests were performed. Two-way ANOVA with *post-hoc* Bonferroni test, Friedman's test with Nemenyi's group or Kruskal-Wallis test with Dunn test were used to analyze the significant effect of bacteria on DCs or PBMCs with XLStat 7.5.2 software (Addinsoft, Paris, France). P-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

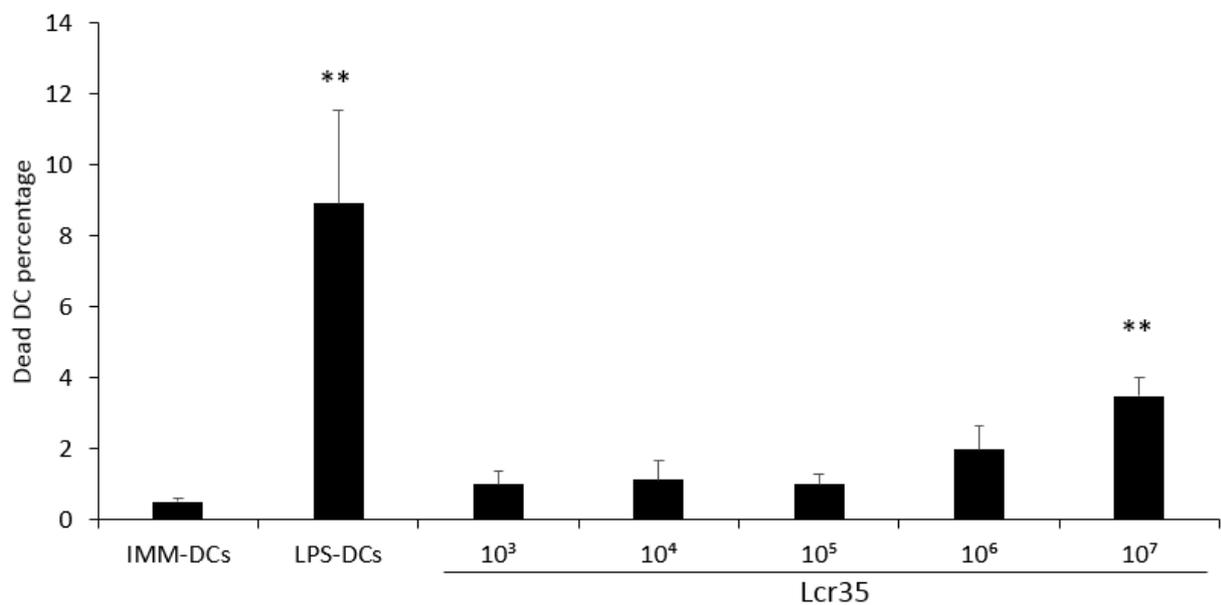


Figure 4: DCs viability after 48 h of exposure to a range of Lcr35 concentrations (CFU/mL). Histograms show the dead cell percentage, calculated from SSC/FSC diagram and live/dead marker. Data are means (+ SEM) of measurements from 11 independent experiments. IMM-DCs: Immature DCs, LPS-DCs: DCs matured by a 48 h exposure to 100ng/mL *E.coli* LPS. Kruskal-Wallis test with Dunn comparison * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared to the Imm-DCs.

Results

Electron microscopy observation of Lcr35-DC interaction.

In vivo, the first step of the immune response in the epithelial mucosa involves interactions between bacteria and immature DCs, leading to bacteria's internalization. To mimic this initial phenomenon *in vitro*, we put in contact DCs with Lcr35 during 1 to 3 h and captured SEM and TEM pictures. After 1 h, SEM-produced 3D images showed Lcr35 chains composed by a range of 3 to more than 10 bacteria with however apparent interaction with DC dendrites (Fig. 1). SEM observation permitted to identify four steps of Lcr35 internalization: (i) close contact between dendrites and Lcr35, (ii) dendrites catch Lcr35 and (iii) bring it closer to DC, (iv) beginning invagination of DC membranes and (v) internalization with the bacteria enveloped by DC membranes. TEM at 3 h confirmed the presence of bacteria intracellularly (Fig 2). DCs appeared to internalize Lcr35 easily since, for instance, we estimated that approximately 90% of DCs (at a MOI of 100) had internalized 6 to 20 bacteria per cells. As also shown by Fig. 2, Lcr35 did not have to occur as an isolated form to be taken up by DCs since part of chains were observable in DC vacuoles.

Flow cytometric analysis of Lcr35 effects on DC phenotype

During the immune response, bacterium internalization could induce DC activation and maturation, resulting in modifications of numerous membrane markers detectable by cytometry techniques. As expected, immature DCs were herein characterized by a high expression of the receptor DC-SIGN and a concomitant low expression of CD83, CD86 and CD14, relatively to their expression (Data not shown) in initial monocytes (Fig. 3a,b). At compared with immature DCs, LPS-induced DCs expressed a phenotype characteristic of fully mature DCs with

increased levels of CD86 and CD83 (Fig 3a) associated with decreased levels of DC-SIGN and CD14 (Fig. 3b). On the other hand, DC incubation with low or medium doses of Lcr35 (10^3 and 10^5 CFU/mL, *i.e.* MOI from 0.01 to 1) did not induce any significant phenotypical changes in either membrane marker. Significant increases in CD83 and CD86 and decreases in DC-SIGN and CD14 expression occurred simultaneously when the concentration of Lcr35 was raised to 10^7 CFU/mL. However, as observed on Figs. 3a and 3b, the magnitude of upregulation of CD83 and CD86 or downregulation of DC-SIGN by the latter was lower than that evoked by LPS.

Flow cytometric analysis of Lcr35 effects on DC mortality

Given the level of DC maturation caused by a high dose of Lcr35, we verified the absence of cytotoxic effect of the latter by using a viability marker to gate out dead DCs in our flow cytometric experiments. Immature DCs alone had almost no mortality in contrast to DCs exposed to LPS where the percentage of dead cells increased from 0.5% to 9% (Fig 4). Among the five concentrations of Lcr35 applied to DCs, only the highest one (10^7 CFU/mL) caused a slight but significant increase in DC mortality that reached 3.5% of the total population (Fig 4).

Cytokine secretion induced by Lcr35-DC interaction

In vivo, mature DCs migrate to secondary lymphoid organs and present the antigen to T cells. During this interaction, DCs deliver three signals, notably a cytokinic signal polarizing the differentiation of lymphocytes into several subpopulations. In our *in vitro model*, we studied the effect of Lcr35 on DC secretion of 17 cytokines assumed to be of particular interest (pro-inflammatory or not pro-Th, growth factor). Comparing the level of cytokines produced by DCs after 48 h of exposure to 5 doses of Lcr35 ranging from 10^3 to 10^7 CFU/mL or maturation by LPS to that produced by immature DCs revealed a significant increase for (i) IL-2, IL-8, IL-

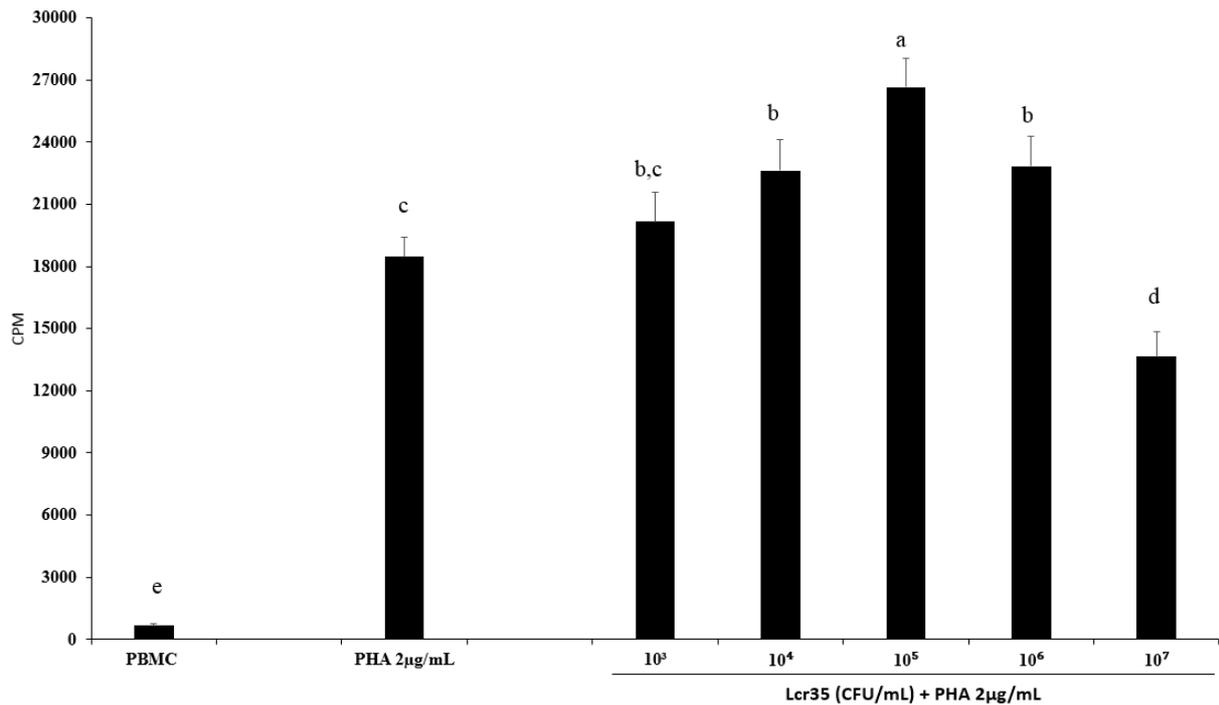


Figure 5: Modulation of PHA-induced lymphocyte proliferation after exposure to a range of Lcr35 concentrations. Results are expressed in CPM. Data are means (+ SEM) of measurements from 15 independent experiments. CPM: Count per minute; PBMC: PBMCs cultured for 72 h without any effector; PHA control: PBMCs only exposed to PHA (2 µg/mL) for 72 h; Lcr35: PBMCs exposed for 72 h to PHA (2 µg/mL) in the presence of 10³ to 10⁷ CFU/mL of Lcr35. Two-way anova with *post-oc* Bonferroni test. a, b, c, d and e: means with different superscript letters are significantly different from each other.

12p70 and IL-17 at 10^6 CFU/mL and (ii) IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, G-CSF, IFN- γ and TNF- α at 10^7 CFU/mL with fold increases comprised between 1.8 (IL-7) and 300 (IL-6) (Table 1). Overall, these results indicate that Lcr35 may affect secretion of both pro- and anti-inflammatory cytokines but also of pro-Th1, Th2, Th17 and Treg ones. Furthermore, IL-5 secretion was unchanged at either dose of Lcr35, whereas changes in IL-4, GM-CSF and MIP-1 β could not be evaluated because of out of range (OOR) levels, as predictable for IL-4 and GM-CSF which were added to the medium.

Dose-dependent modulation in PHA-stimulated PBMC proliferation by Lcr35

To investigate lymphocyte activation, the next classical stage of the immune response, we carried out functional tests of the modulation of lymphocytic proliferation by Lcr35, using a model of PHA-induced T cell proliferation. Adding increasing concentrations of bacteria to the medium caused dose-dependent modifications in PHA-stimulated lymphocyte proliferation when compared with control proliferation assays without bacteria. Particularly, significantly increased proliferations were observed at the three lowest concentrations with a peaking response of +44% at 10^5 CFU/mL (Fig. 5). On the contrary, a dose of 10^7 CFU/mL gave rise to a significant inhibition of proliferation (-26%) comparatively to control assays without bacteria.

Cytokine secretion by PHA-stimulated PBMCs exposed to Lcr35

To depict the type of immune response involved during the Lcr35-dependent increase in PHA-stimulated lymphocyte proliferation, secretion of the aforementioned 17 cytokines was assessed in culture supernatants. Fold changes were expressed by comparing cytokine secretions by PHA-stimulated PBMCs with and without Lcr35 addition. As shown in Table 2, 10^3 to 10^6 CFU of Lcr35 per mL did not alter cytokine secretion, except for IL-10 at 10^6

Table 2: Cytokine production by PBMC exposed to PHA (2 µg/mL) and a range of Lcr35 concentrations. Results are expressed in fold change compared to means (measurement of 3 independent experiments) obtained with PBMC stimulated with PHA (2 µg/mL). OOR: Out of Range. IL-6 > 28307 pg/mL, IL-8 > 29291 pg/ mL, MIP-1β > 8589 pg/mL. Kruskal-Wallis test with Dunn comparison.

	PHA	Lcr35 10 ³	Lcr35 10 ⁴	Lcr35 10 ⁵	Lcr35 10 ⁶	Lcr35 10 ⁷
Survey and expansion cytokines						
IL-2	x1	x0.8	x1	x1.1	x1.4	x2 (P=0.048)
IL-7	x1	x0.9	x1.1	x1.2	x1.4	x1.3
Systemic inflammation cytokines						
IL-8	x1	OOR>	OOR>	OOR>	OOR>	OOR>
TNF-α	x1	x0.6	x1.1	x1.7	x3.2	x6.1 (P=0,065)
pro-Th1 Cytokines						
IL-12(p70)	x1	x0.8	x1.2	x1.4	x2.4	x2.4
IFN-γ	x1	x0.5	x0.9	x1	x1.6	x1.3
pro-Th2 Cytokines						
IL-13	x1	x0.8	x0.9	x0.8	x0.6	x0.6
IL-5	x1	x1.5	x1	x0.5	x0.3	x0.3
IL-4	x1	x0.8	x1	x1	x1.2	x1.4 (P=0.061)
pro-Th17 Cytokines						
IL-1β	x1	x0.7	x1.3	x2	x3.7	x5.5 (P=0.05)
IL-6	x1	OOR>	OOR>	OOR>	OOR>	OOR>
IL-17	x1	x0.7	x0.8	x0.8	x0.8	x0.5
Anti-inflammatory Cytokine						
IL-10	x1	x0.8	x1.1	x1.5	x2 (P=0,056)	x1.5
Monocytes and macrophages chemokines						
MCP-1	x1	x1.1	x1.2	x0.9	x1	x0.9
MIP-1β	x1	OOR>	OOR>	OOR>	OOR>	OOR>
Growth factors						
G-CSF	x1	x0.8	x1.1	x1.2	x1.4	x1.4
GM-CSF	x1	x0.6	x1	x1.1	x1.3	x2.5

CFU/mL (x1.5) by PHA-stimulated PBMCs. IL-1 β , IL-2 and TNF- α were the only three cytokines significantly increased by Lcr35 at 10⁷ CFU/mL with fold increases of 5.5, 2.0 and 6.1, respectively (table 2). These results indicate that Lcr35 could somewhat modulate the proliferative effects of PHA on lymphocytes, essentially by stimulating pro-inflammatory cytokines at high doses. As formerly explained, changes in IL-6, IL-8 and MIP-1 β secretion could not be assessed because of OOR levels.

Indoleamine-2,3-deoxygenase (IDO) activity after LTT with Lcr35

To explore the effect of Lcr35 on IDO expression, we treated PBMC for 72 h with a range of Lcr35 doses in the presence of PHA 2 μ g/mL and evaluated IDO activity through HPLC assays of the kynurenine to tryptophan ratio in the extracellular medium. Compared to control without bacteria addition, slight but not significant increases in IDO expression (+10.6% and +33.5%) were measured in PHA-stimulated lymphocytes exposed to low doses of Lcr35 (10³ and 10⁴ CFU/mL, respectively) (Fig. 6). Interestingly, augmenting the bacteria dose from 10⁵ and up to 10⁷ CFU/mL evoked a dose-dependent decrease in IDO activity ranging from 1.3 to 5.0 fold, respectively.

Intracellular staining of CD4 T cells after LTT with Lcr35

In order to better identify Lcr35-modulated lymphocyte subpopulations, intracellular staining of CD4 T cells was done after LTT. Th1, Th2, Th17 and Treg cells were intracellularly labelled with the specific cytokines or transcription factors IFN- γ , IL-4, IL-17a and FoxP3, respectively. Compared to PHA-stimulated PBMCs without Lcr35 addition (control) PHA-stimulated PBMCs exposed to 10⁵ CFU/mL of Lcr35 exhibited a substantial (+ 41.8%), although not significant, increase in their content of IFN- γ (Fig. 7). No change in IFN- γ

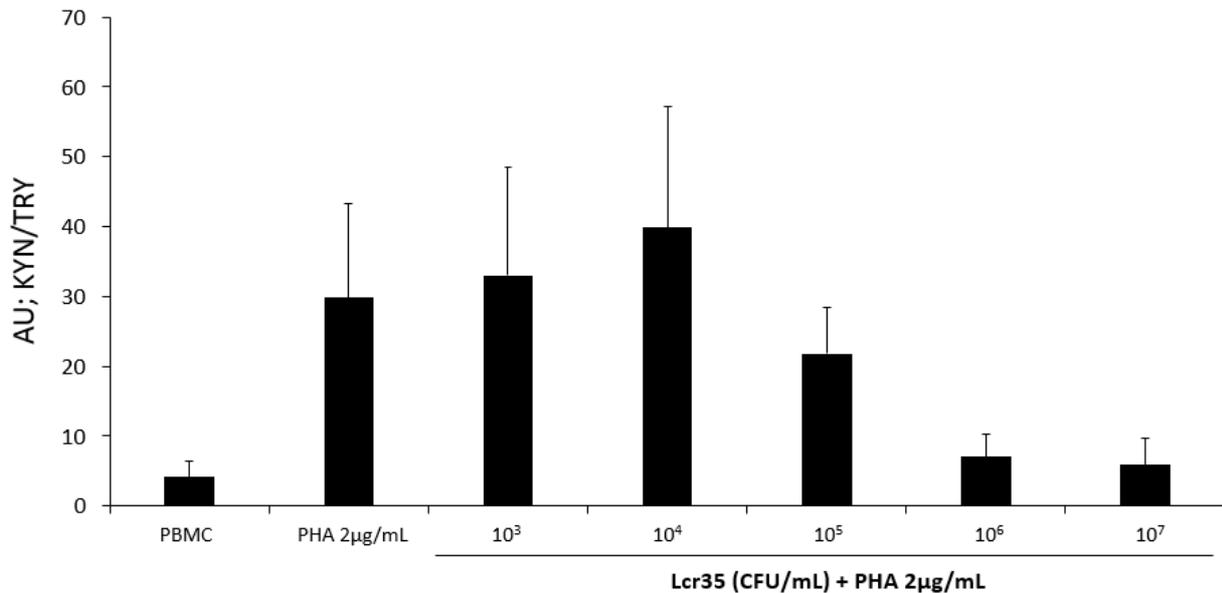


Figure 6: IDO activity induced by PBMC after 72 h of exposure with PHA (2 µg/mL) and a range of Lcr35 concentrations. IDO activity is expressed in arbitrary unit (AU) through HPLC assays of the kynurenine to tryptophan ratio in extracellular medium. Are expressed, the mean results of three independent experiments. PBMC: PBMCs cultured for 72 h without any effector; PHA control: PBMCs only exposed to PHA (2 µg/mL) for 72 h; Lcr35: PBMCs exposed for 72 h to PHA (2 µg/mL) in the presence of 10³ to 10⁷ CFU/mL of Lcr35.

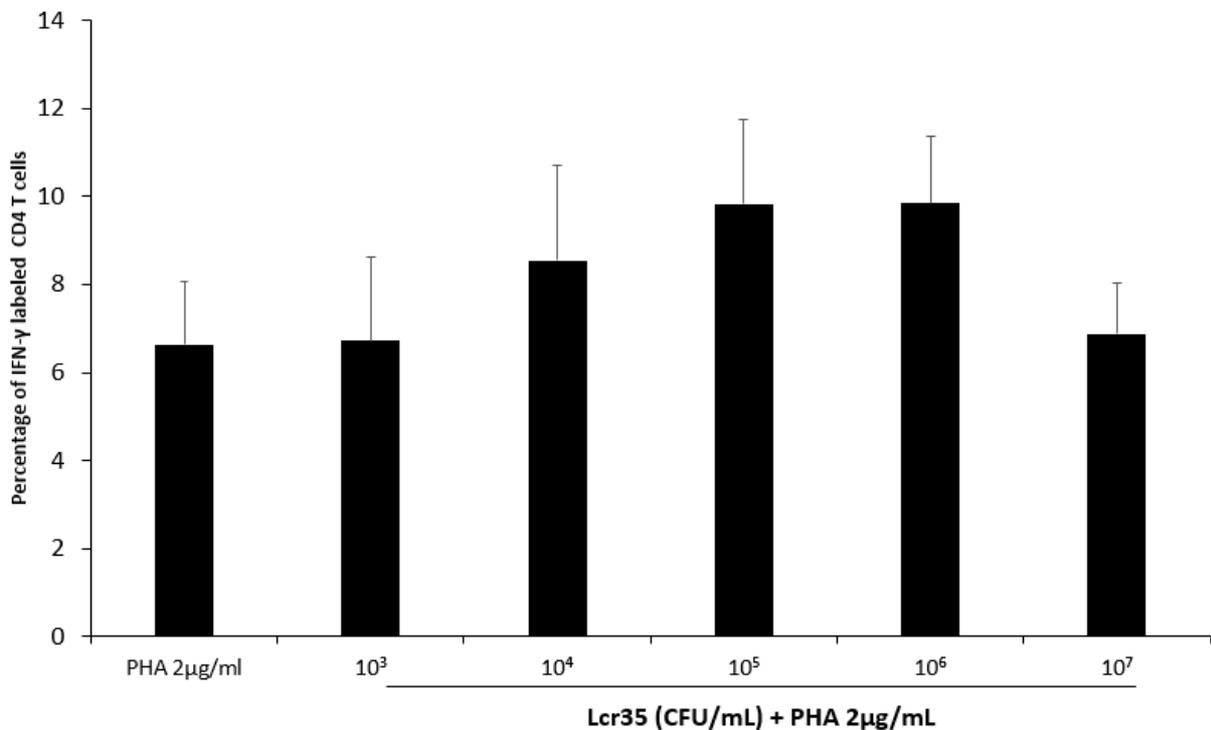


Figure 7: Intracellular IFN-γ staining of CD4 T cells after PBMC 72 h of exposure to PHA and a range of Lcr35 concentrations. Data are means of percentage of IFN-γ labeled CD4 T cells (+ SEM) from 10 independent experiments. ; PHA control: PBMCs only exposed to PHA (2 µg/mL) for 72 h; Lcr35: PBMCs exposed for 72 h to PHA (2 µg/mL) in the presence of 10³ to 10⁷ CFU/mL of Lcr35.

concentration was observed at 10^7 CFU/mL so that the Lcr35 dose-dependent response of IFN- γ in PHA-stimulated PBMCs looked like that of cell proliferation (Fig. 5). Moreover, none dose of Lcr35 yielded changes in IL-4, IL-17 and FoxP3 levels in PHA-stimulated PBMC compared to control (data not shown).

Dose-dependent modulation of PBMC by Lcr35-matured DC

DCs play a key role in antigen presentation. We investigated the effect of Lcr35-induced DC maturation (results shown previously Figure 3) on the proliferation of thawed allogeneic PBMCs (essentially lymphocytes) by using a Mixed Leukocyte Reaction (MLR) procedure. As shown in Fig. 8, the pattern of tritiated thymidine incorporation by the cells roughly resembled that previously found in LTT experiments on PHA-stimulated PBMCs exposed to various doses of Lcr35 (Fig. 8). Indeed, comparatively to immature DCs, Lcr35-matured DCs exhibited a proliferation (i) unchanged after previous exposure to 10^3 CFU/mL dose of bacteria and (ii) significantly increased at higher doses of Lcr35 with a peak at 10^5 CFU/mL. Compared to LTT experiments, the MLR ones did not display a significant decrease in lymphocyte proliferation at the 10^7 CFU/mL dose of Lcr35.

Intracellular staining of CD4 T cells after MLR with Lcr35-matured-DC

With the same purpose than for LTT, intracellular cytokine staining of CD4 T cells was performed in the MLR experiments. Once again, a significant increase in IFN- γ staining was achieved in DCs exposed to 10^5 CFU/mL of Lcr35 unlike any other dose, as compared with immature DCs (Fig. 9). None effect of Lcr35 concentrations was also observed on IL-4, IL-17 and FoxP3 (data not shown).

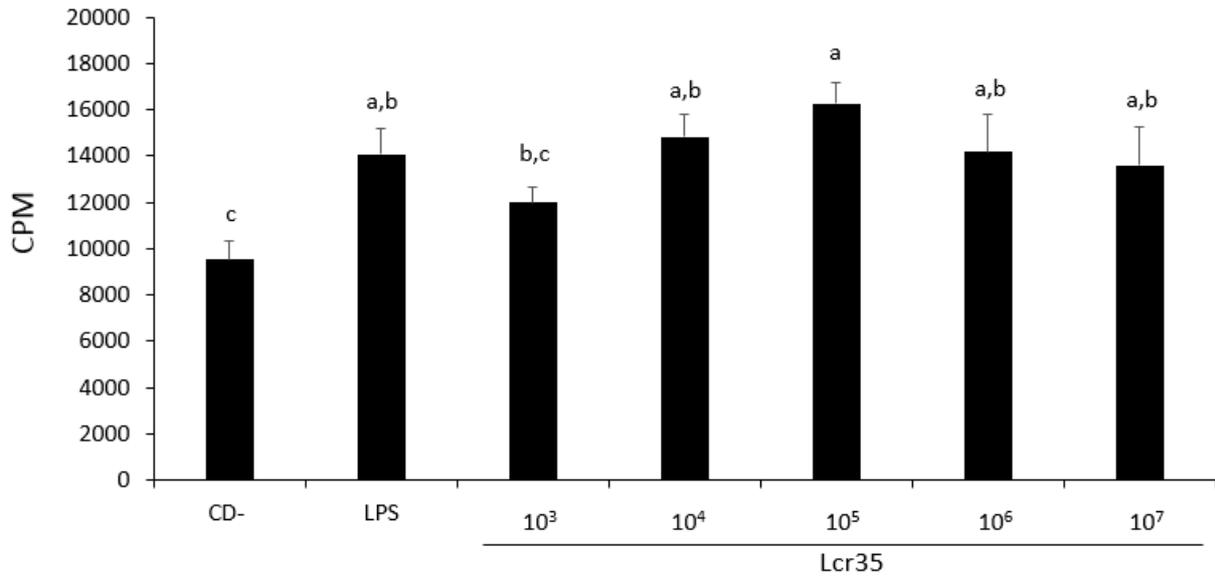


Figure 8: Modulation of lymphocyte proliferation after 5 days of exposure to allogeneic-DC matured with a range of Lcr35 concentrations. Data are means (+ SEM) of measurements of 5 independent experiments. CD- : PBMCs cultured with allogeneic immature DC for 5 days; LPS: PBMCs cultured with allogeneic DC matured with 100ng/mL *E. coli* LPS; Lcr35: PBMCs cultured with allogeneic DC matured in the presence of 10³ to 10⁷ CFU/mL of Lcr35. Two-way anova with *post-oc* Bonferroni test. a, b and c: means with different superscript letters are significantly different from each other.

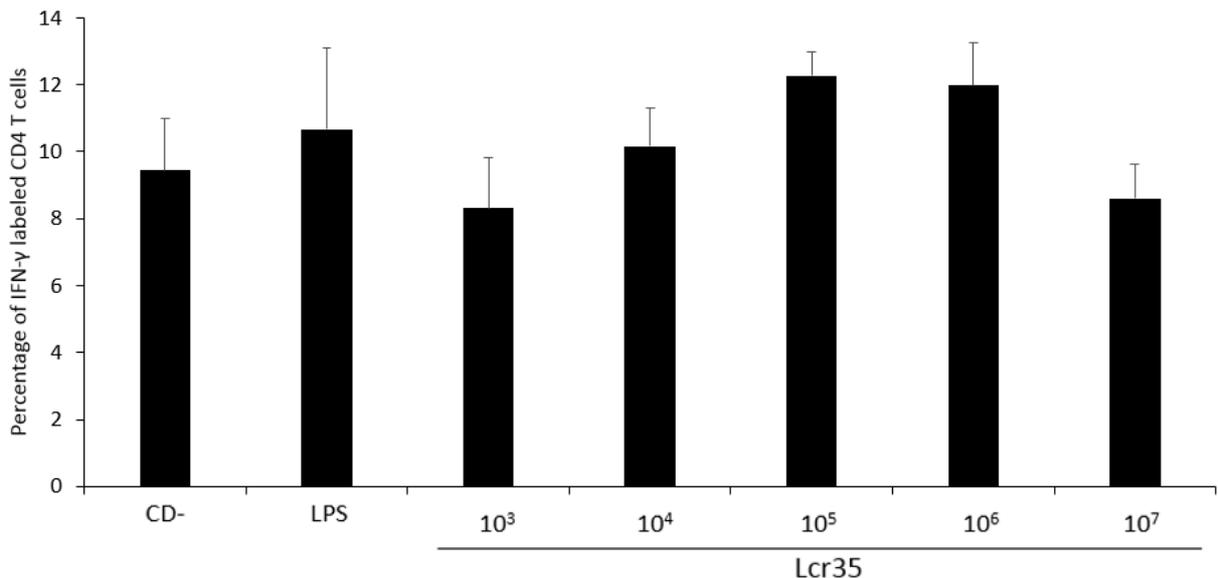


Figure 9: Intracellular IFN-γ staining of CD4 T cells after 5 days of exposure to allogeneic-DC matured with a range of Lcr35 concentrations. Data are means of percentage of IFN-γ labeled CD4 T cells (+ SEM) from 8 independent experiments. CD- : PBMCs cultured with allogeneic immature DC for 5 days; LPS: PBMCs cultured with allogeneic DC matured with 100ng/mL *E. coli* LPS; Lcr35: PBMCs cultured with allogeneic DC matured in the presence of 10³ to 10⁷ CFU/mL of Lcr35.

Discussion

Many studies on probiotics have shown their important role against several diseases such as IBD, antibiotic associated diarrhea (AAD), *Clostridium difficile* infection, allergy, autoimmune disease [18]–[22]. Probiotics have both bacteriological effects by degrading toxin receptor and immunological effects by stimulating DC and T cells or inducing a tolerogenic effect with secretion of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 [23]. Lcr35 has been proved to survive in the human gastrointestinal tract and *in vitro* studies demonstrated its ability to inhibit pathogen adherence to Caco-2 cells and growth [24]–[26]. Moreover, Evrard *et al* showed that Lcr35 could induce semi-maturation of DCs and pro-inflammatory cytokine production [17]. Interaction of probiotic strains with DCs and PBMCs has been previously reported, but its impact on DC maturation, cytokine secretion or induction of T cell proliferation was strain-dependent [27], [28]. We therefore aimed to characterize the specific effects of Lcr35 on immune cells like DC, PBMC and T cells.

We first carried out an electron microscope study of Lcr35-DC interactions, the first stage of the immune response, to determine DC ability to capture and internalize the probiotic. Using SEM and TEM we presently shows that human moDC dendrites can interact with Lcr35 allowing its internalization, despite the tendency of this bacterium to form chains. This phenomenon happened quickly, being observable after 1h of contact and with almost every DC having internalized Lcr35 after 3h. Foligne *et al.* have previously reported the ability of mouse Bone Marrow DC (BCDC) to internalize a strain of *L. rhamnosus* (Lr32) [29]. The receptors involved in the *Lactobacilli* uptake by DCs are so far unknown, but they likely differ according to the pro-tolerogenic or pro-inflammatory effect of the bacteria strain on DC maturation state [13], [30].

We then studied the impact of Lcr35 internalization on DC maturation. Immature DCs are known to generally promote a tolerogenic response whereas mature DCs generally induce a strong inflammatory response. Semi-mature DCs are halfway between immature and mature DCs and may simultaneously evoke both responses [31]. Our current results indicate that Lcr35 internalization can induce changes in DC phenotypes in a dose-dependent manner by enhancing CD86 and CD83 markers and decreasing DC-SIGN and CD14, which is characteristic of DC maturation. Those agree well with previous reports from our group [17], showing that Lcr35 induced a semi-mature maturation of DCs when compared to LPS positive control or to the effect of pathogens like *K. pneumoniae* or *C. albicans* [32]. Furthermore, our current work evidences a strong Lcr35 dose-dependent increase in the systemic inflammation cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6, as well as the pro-Th1 cytokines IFN- γ and IL-12p70 and the neutrophil chemokine IL-8. Likewise, the main anti-inflammatory cytokine IL-10 exhibited a similar induction supporting that the dose-dependent immunostimulation of DCs by Lcr35 most probably involved a moderate pro-Th1 response concurrent with IL-10 secretion. This corroborates earlier data from a Finnish team showing a semi-mature DC maturation and a low cytokine proliferation by another strain of *L. rhamnosus* comparatively to the pathogen *Streptococcus pyogenes* [33]. In fact, each probiotic strain is known to induce specific immune responses: for example *L. casei*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* can elicit a pro-Th1 phenotype with an important secretion of IL-12p70 or IFN- γ and almost no increase in IL-10 whereas *L. plantarum* or *Bifidobacterium (B.) adolescentis* can display a tolerogenic effect with a strong secretion of IL-10, unlike IL-12p70 [15], [16]. However, *B. bifidum* was shown to induce a pro-Th17 response [34], [35].

In the present study, two models were developed to study the modulatory effects of Lcr35 concentrations on immune cells. First, LTT permits to observe these effects on the proliferation of PHA stimulated-PBMC. PHA is known to nonspecifically stimulate T cells through its

binding to T-Cell Receptor (TCR) and TLR4 [36], [37]. PHA binding to TCR commonly induces NF- κ B, NF-AT and AP-1 signaling pathways [38]. Depending on its concentration, Lcr35 was observed here to modulate PHA effects probably either by enhancing or decreasing these pathways. Our second model, MLR, permitted to focus on the impact of Lcr35 on the next step of the immune response encompassing antigen presentation by DCs to T cells. For that purpose, Lcr35 was put in direct contact with moDCs for 48 h assuming that phenotype changes of the latter might modulate T cell proliferation created by an allogeneic conflict. Despite differences between LTT and MLR in the stimulation levels, both models yielded similar results on the modulation of PBMC proliferation by Lcr35 concentration with an increase and decrease at 10^5 and at 10^7 CFU/mL of bacteria, respectively. The profile of PBMC proliferation differs from that of maturation of DCs. In 2011, Li *et al* showed that various concentrations of the probiotics *L.acidophilus* and *B. bifidus* induced different responses on PHA-stimulated PBMC as observed in our study, with an inflammatory effect at low concentrations and attenuation of the mitogen-overactive immune response at high concentrations [39]. Lcr35 is at the concentration of approximately 10^9 CFU/mL in the probiotic commercial product Bacilor®. *In vivo* investigations remain to be carried out to determine the amounts of this strain actually present in the gut and in contact with the immune system following Bacilor® intake. We think those amounts might be low and correspond to the low concentrations used in our *in vitro* models.

Collection of immune cells and staining of membrane markers (CD3, CD4, CD8 and CD25), and intracellular cytokines and transcription factors (IFN- γ , FoxP3, IL-4 and IL-17), allowed to identify which T cell sub-populations were stimulated by Lcr35 in our MLR and LTT models. A pattern exactly similar to that of cell proliferation modulation could be observed, with increased and decreased production of IFN- γ (a Th1 cell marker) at 10^5 and 10^7 CFU/mL of the probiotic, respectively, as previously observed by Li *et al*. So, depending on its concentration

Lcr35 could be pro- or anti-inflammatory, showing again how it is essential to know the bacteria concentration in contact with DCs in the gut. Indeed, a low *in vivo* concentration of Lcr35 conferring a pro-Th1 profile could be used to struggle against allergy whereas a high one conferring a more tolerogenic state could be used against a dysimmune disease such as IBD.

Increased IDO activity has been associated with tolerogenic immune responses and inhibition of T cell proliferation [40]–[42]. In our experimental models, IDO activity was augmented at low doses of Lcr35 where T cell proliferation and IFN- γ level were at the highest. This was coherent with previous reports by others of IDO expression upon activation of IFN- γ [43]. Our data suggest that IDO would exert a feedback control effect on the inflammatory response induced the IFN- γ secretion in the presence of low doses of Lcr35.

To sum up, we demonstrated that Lcr35 is able to be in interaction *in vitro* with adaptive immune cells, namely DCs and PBMCs. More particularly, we showed the existence of a direct specific effects of Lcr35 on immune cells through stimulation of DC maturation and production of pro- or anti- inflammatory cytokines in a dose-dependent manner. Moreover, Lcr35 was found to modulate T cell proliferation after an exogenous stimulation or an allogeneic conflict with a pro-inflammatory or an anti-inflammatory effect at a low or high dose, respectively. The pro-inflammatory effect of Lcr35 was concomitant to a shift toward pro-Th1 cells while IDO activation indicated a feedback control by DCs to counteract the onset of an inflammatory response. Further investigations on a different *in vitro* model are required to better decipher this effect. Particularly, it would be worth using a two-dimensional co-culture system with Lcr35 in direct contact with epithelial cells at their apical pole. This will allow to constitute a microenvironment at their basal pole by addition of immature DCs. We hypothesize from the present data that Lcr35 intake could be tuned in order to provide local concentrations able to thwart allergic reactions by modifying the Th1/Th2 balance or certain infections inducing low or no inflammation such as bacterial vaginosis by enhancing an adaptive immune response.

Conflict of interests

This work supported by a grant of the regional council of Auvergne and the company Biose.

Acknowledgements

The authors thank the CICS of Clermont-Ferrand and are very grateful to Christelle Blavignac, Claire Szczepaniak, and Lorraine Novais Gameiro for their generous cooperation.

References

- [1] R. Sender, S. Fuchs, and R. Milo, “Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body,” *bioRxiv*, p. 36103, Jan. 2016.
- [2] T. Kawai and S. Akira, “The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors,” *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 5, pp. 373–384, May 2010.
- [3] J. Sabatté *et al.*, “Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 18, no. 1–2, pp. 5–17, Feb. 2007.
- [4] J. Zhu and W. E. Paul, “Heterogeneity and plasticity of T helper cells,” *Cell Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 4–12, Dec. 2009.
- [5] J. Banchereau and R. M. Steinman, “Dendritic cells and the control of immunity,” *Nature*, vol. 392, no. 6673, pp. 245–252, Mar. 1998.
- [6] S. E. Macatonia *et al.*, “Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells.,” *J. Immunol.*, vol. 154, no. 10, pp. 5071–5079, May 1995.

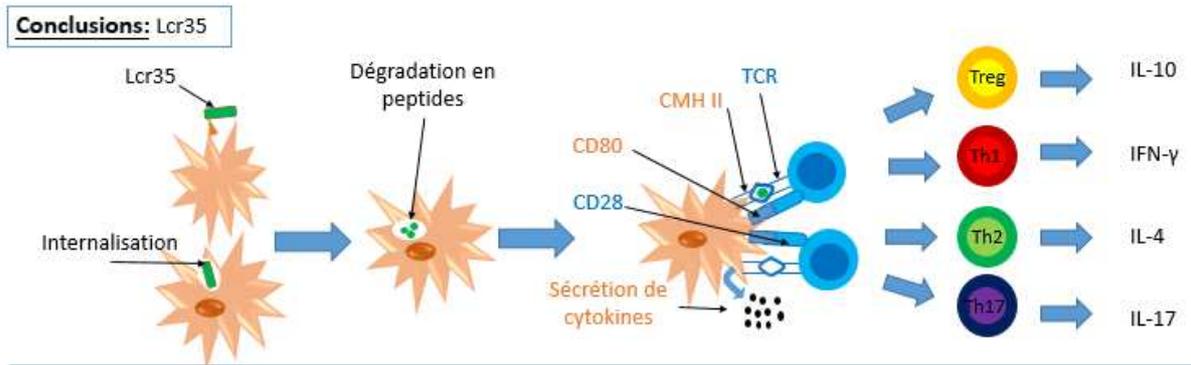
- [7] A. N. Kopitar, N. Ihan Hren, and A. Ihan, “Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation,” *Oral Microbiol. Immunol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–5, Feb. 2006.
- [8] I. Hanski *et al.*, “Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 21, pp. 8334–8339, May 2012.
- [9] F. M. Ruemmele *et al.*, “Characteristics of Inflammatory Bowel Disease With Onset During the First Year of Life:,” *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 43, no. 5, pp. 603–609, Nov. 2006.
- [10] N. Grigoriadis and V. van Pesch, “A basic overview of multiple sclerosis immunopathology,” *Eur. J. Neurol.*, vol. 22, pp. 3–13, Oct. 2015.
- [11] C. Hill *et al.*, “Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11, no. 8, pp. 506–514, Aug. 2014.
- [12] K. Karimi, N. Kandiah, J. Chau, J. Bienenstock, and P. Forsythe, “A *Lactobacillus rhamnosus* Strain Induces a Heme Oxygenase Dependent Increase in Foxp3⁺ Regulatory T Cells,” *PLOS ONE*, vol. 7, no. 10, p. e47556, Oct. 2012.
- [13] H. H. Smits *et al.*, “Selective probiotic bacteria induce IL-10–producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell–specific intercellular adhesion molecule 3–grabbing nonintegrin,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 115, no. 6, pp. 1260–1267, Jun. 2005.
- [14] T. Pessi, Y. Sütas, M. Hurme, and E. Isolauri, “Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG,” *Clin. Exp. Allergy*, vol. 30, no. 12, pp. 1804–1808, Dec. 2000.

- [15] N. Baba, S. Samson, R. Bourdet-Sicard, M. Rubio, and M. Sarfati, “Selected commensal-related bacteria and Toll-like receptor 3 agonist combinatorial codes synergistically induce interleukin-12 production by dendritic cells to trigger a T helper type 1 polarizing programme,” *Immunology*, vol. 128, no. 1pt2, pp. e523–e531, 2009.
- [16] M. Mohamadzadeh *et al.*, “Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 8, pp. 2880–2885, Feb. 2005.
- [17] B. Evrard *et al.*, “Dose-Dependent Immunomodulation of Human Dendritic Cells by the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 4, p. e18735, Apr. 2011.
- [18] P. Pochard *et al.*, “Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 110, no. 4, pp. 617–623, Oct. 2002.
- [19] L. V. McFarland, “Meta-Analysis of Probiotics for the Prevention of Antibiotic Associated Diarrhea and the Treatment of *Clostridium difficile* Disease,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 101, no. 4, pp. 812–822, Apr. 2006.
- [20] V. E. Rolfe, P. J. Fortun, C. J. Hawkey, and F. J. Bath-Hextall, “Probiotics for maintenance of remission in Crohn’s disease,” in *Cochrane Database of Systematic Reviews*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [21] M. Kalliomäki, S. Salminen, T. Poussa, and E. Isolauri, “Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 119, no. 4, pp. 1019–1021, Apr. 2007.
- [22] P. I. Zigra, V. E. Maipa, and Y. P. Alamanos, “Probiotics and remission of ulcerative colitis: a systematic review,” *Neth. J. Med.*, vol. 65, no. 11, pp. 411–418, Dec. 2007.

- [23] O. C. Thompson-Chagoyán, J. Maldonado, and A. Gil, “Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response,” *Clin. Nutr.*, vol. 24, no. 3, pp. 339–352, Jun. 2005.
- [24] C. de Champs, N. Maroncle, D. Balestrino, C. Rich, and C. Forestier, “Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 3, pp. 1270–1273, Mar. 2003.
- [25] C. Forestier, C. De Champs, C. Vatoux, and B. Joly, “Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties,” *Res. Microbiol.*, vol. 152, no. 2, pp. 167–173, Feb. 2001.
- [26] S. Coudeyras, H. Marchandin, C. Fajon, and C. Forestier, “Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 9, pp. 2679–2689, May 2008.
- [27] A. L. Hart *et al.*, “Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria,” *Gut*, vol. 53, no. 11, pp. 1602–1609, Nov. 2004.
- [28] M. P. ONGOL *et al.*, “Potential of Selected Strains of Lactic Acid Bacteria to Induce a Th1 Immune Profile,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 72, no. 11, pp. 2847–2857, Nov. 2008.
- [29] B. Foligne *et al.*, “A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality,” *PLoS ONE*, vol. 2, no. 3, p. e313, Mar. 2007.
- [30] H. Karlsson, C. Hessel, and A. Rudin, “Innate Immune Responses of Human Neonatal Cells to Bacteria from the Normal Gastrointestinal Flora,” *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 12, pp. 6688–6696, Dec. 2002.

- [31] A. M. Dudek, S. Martin, A. D. Garg, and P. Agostinis, “Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity,” *Front. Immunol.*, vol. 4, Dec. 2013.
- [32] B. Evrard *et al.*, “Roles of Capsule and Lipopolysaccharide O Antigen in Interactions of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and *Klebsiella pneumoniae*,” *Infect. Immun.*, vol. 78, no. 1, pp. 210–219, Jan. 2010.
- [33] V. Veckman, M. Miettinen, J. Pirhonen, J. Sirén, S. Matikainen, and I. Julkunen, “*Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 75, no. 5, pp. 764–771, May 2004.
- [34] P. López, I. González-Rodríguez, M. Gueimonde, A. Margolles, and A. Suárez, “Immune Response to *Bifidobacterium bifidum* Strains Support Treg/Th17 Plasticity,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 9, Sep. 2011.
- [35] P. López, M. Gueimonde, A. Margolles, and A. Suárez, “Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 138, no. 1–2, pp. 157–165, Mar. 2010.
- [36] E. D. Anastassiou, F. Paliogianni, J. P. Balow, H. Yamada, and D. T. Boumpas, “Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R alpha gene expression at multiple levels,” *J. Immunol.*, vol. 148, no. 9, pp. 2845–2852, May 1992.
- [37] J. Unitt and D. Hornigold, “Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 81, no. 11, pp. 1324–1328, Jun. 2011.
- [38] M. Demetriou, M. Granovsky, S. Quaggin, and J. W. Dennis, “Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation,” *Nature*, vol. 409, no. 6821, pp. 733–739, Feb. 2001.

- [39] C.-Y. Li, H.-C. Lin, C.-H. Lai, J. J.-Y. Lu, S.-F. Wu, and S.-H. Fang, “Immunomodulatory effects of lactobacillus and Bifidobacterium on both murine and human mitogen-activated T cells,” *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 156, no. 2, pp. 128–136, 2011.
- [40] G. Frumento, R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti, and G. B. Ferrara, “Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase,” *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 4, pp. 459–468, Aug. 2002.
- [41] P. Terness *et al.*, “Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-expressing Dendritic Cells Mediation of Suppression by Tryptophan Metabolites,” *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 4, pp. 447–457, Aug. 2002.
- [42] D. H. Munn *et al.*, “Potential Regulatory Function of Human Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase,” *Science*, vol. 297, no. 5588, pp. 1867–1870, Sep. 2002.
- [43] P. Hwu, M. X. Du, R. Lapointe, M. Do, M. W. Taylor, and H. A. Young, “Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation,” *J. Immunol.*, vol. 164, no. 7, pp. 3596–3599, Apr. 2000.



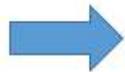
Ce que l'on a démontré

Le **Lcr35** est très bien **internalisé**

Effet **dose-dépendant** sur la **maturation** et n'est pas cytotoxique

Prolifération lymphocytaire dose-dépendante avec un pic à **10⁵ CFU/mL**
 Induit une **inhibition** de la prolifération lymphocytaire à **10⁷ CFU/mL** en TTL
De même pour l'IDO

Le Lcr35 est **pro-Th1** à **10⁵ CFU/mL**
Inhibition à **10⁷ CFU/mL**



Bactérie **induisant une réponse inflammatoire dose dépendante** avec effet profil Th1 à **10⁵ CFU/mL** et profil anti-inflammatoire à **10⁷ CFU/mL**

Figure 33. Récapitulatif des résultats obtenus après nos expérimentations *in vitro* sur le Lcr35.

Les principaux points à retenir de cette étude (Figure 33)

Sur la réponse des cellules dendritiques :

- Le Lcr35 prend une conformation en chaînettes. Malgré cela, les DC sont capables d'interagir avec le Lcr35 et de l'internaliser de façon efficace.
- La maturation qui s'ensuit est dose-dépendante. A faible dose, le Lcr35 n'a pas d'effet sur les DC alors qu'il induit une semi-maturation à forte dose.
- Le Lcr35 n'est pas toxique pour les DC, car il n'induit pas d'augmentation de la mortalité.
- A forte dose, le Lcr35 induit la sécrétion de nombreuses cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Sur la réponse des PBMC :

- Le Lcr35 induit une modulation de la prolifération dose-dépendante avec une augmentation à faible concentration et une inhibition à forte concentration.
- La sécrétion de cytokines induite par le Lcr35 est faible, excepté à forte concentration, à laquelle il y a une augmentation de la sécrétion de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-2.
- Le Lcr35 module les sous-populations lymphocytaires T avec le même profil que celui de la prolifération : une augmentation des Ly Th1 à faible concentration et une inhibition à forte concentration de ce profil.

Le Lcr35 a des effets doses-dépendants différents en fonction des cellules étudiées. Il a un effet pro-inflammatoire et pro-Th1 dose-dépendant. Ces points seront approfondis dans la discussion.

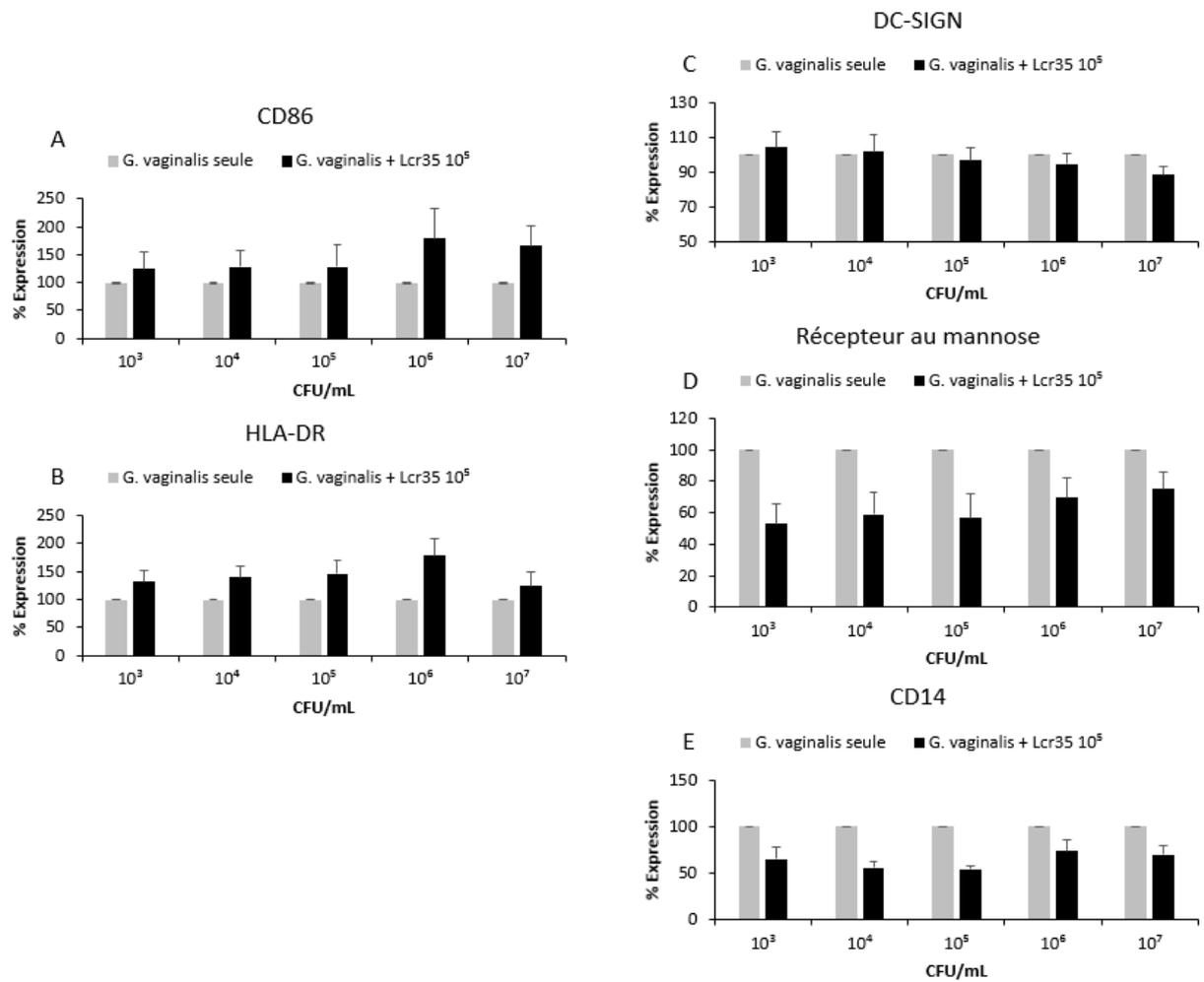


Figure 34. Effets du Lcr35 sur la maturation des DC infectées par *G. vaginalis*. Les DC ont été incubées avec *G. vaginalis* seule (10^3 à 10^7 cfu/ml) ou co-incubées avec *G. vaginalis* + Lcr35 (10^5 cfu/ml). L'expression de Deux marqueurs de maturations des DC, le CD86 (A) et le HLA-DR (B) ainsi que trois marqueurs d'immaturité des DC, le DC-SIGN (C), le récepteur au mannose (D) et le CD14 (E) par les DC ont été étudié en CMF. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport à *G. vaginalis* seule. Chaque concentration de *G. vaginalis* seule est comparée à la co-incubation du lcr35 à 10^5 CFU/mL avec la concentration de *G. vaginalis* correspondante. N=5.

Résultats complémentaires

Dans les deux articles précédents traitants de *G. vaginalis* et du Lcr35, nous avons étudié ces deux bactéries séparément. Nous avons pu montrer que ces deux bactéries avaient des effets différents sur la réponse immunitaire : *G. vaginalis* le stimulant très peu, étant presque indétectable, alors que le Lcr35 était globalement immuno-stimulant, avec un profil pro-Th1 dose-dépendant. Afin de mieux caractériser les effets immunomodulateur du Lcr35 et de confirmer ou non la pertinence, d'un point de vue immunologique, d'utiliser ce probiotique dans le traitement de la vaginose bactérienne, nous avons étudié les effets de ces 2 bactéries l'une envers l'autre. En effet, il semble important d'analyser l'effet que peut avoir le Lcr35 sur le système immunitaire en présence de *G. vaginalis*, avec l'hypothèse que le Lcr35 permettrait de stimuler la faible réponse immunitaire induite par *G. vaginalis*.

Pour étudier cela, les mêmes expériences (TTL, MLR, marquage intracellulaire) que celles effectuées dans les premières publications seront réalisées au sein du laboratoire en co-incubant les deux bactéries. Les premiers résultats présentés dans cette thèse concernent la maturation des DC après 48 h de contact avec le Lcr35 (MOI de 1) et *G. vaginalis* (MOI de 0,01 à 100), tous deux inactivés par les UV. Nous avons choisi la MOI de 1 car cette concentration de Lcr35 a montré des effets importants de stimulation de la prolifération et de la sécrétion d'IFN- γ .

Dans la figure 34, nous avons comparé l'effet des différentes concentrations de *G. vaginalis* seule sur la maturation des DC avec la concentration correspondante de *G. vaginalis* co-incubé avec le Lcr35 à la MOI de 1 (Figure 34). Nous avons exprimé les résultats en pourcentage d'expression en prenant la concentration de *G. vaginalis* comme base et nous avons observé l'augmentation et la diminution, en fonction des marqueurs, de ce pourcentage d'expression. Concernant les marqueurs de maturation des DC que sont le CD86 et le HLA-DR, nous avons observé à toutes les concentrations une augmentation de l'expression pouvant atteindre entre 60 et 80 % aux fortes concentrations, due à la présence du Lcr35 (Figure 34 A et B). A l'inverse, une diminution de l'expression des marqueurs d'immaturité que sont le CD14 et le récepteur au mannose est observée entre 30 et 45% en fonction de la concentration de *G. vaginalis* lorsque le Lcr35 est ajouté dans le milieu (Figure 34 D et E). L'effet observé sur le DC-SIGN est différent des deux autres récepteurs aux faibles concentrations car il y a une faible augmentation de ce marqueur. Aux fortes concentrations une diminution d'expression est retrouvée mais plus faible, à hauteur de 10 %. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'intensité de fluorescence exprimé en MFI du Lcr35 à la MOI de 1 pour ce marqueur est élevée.

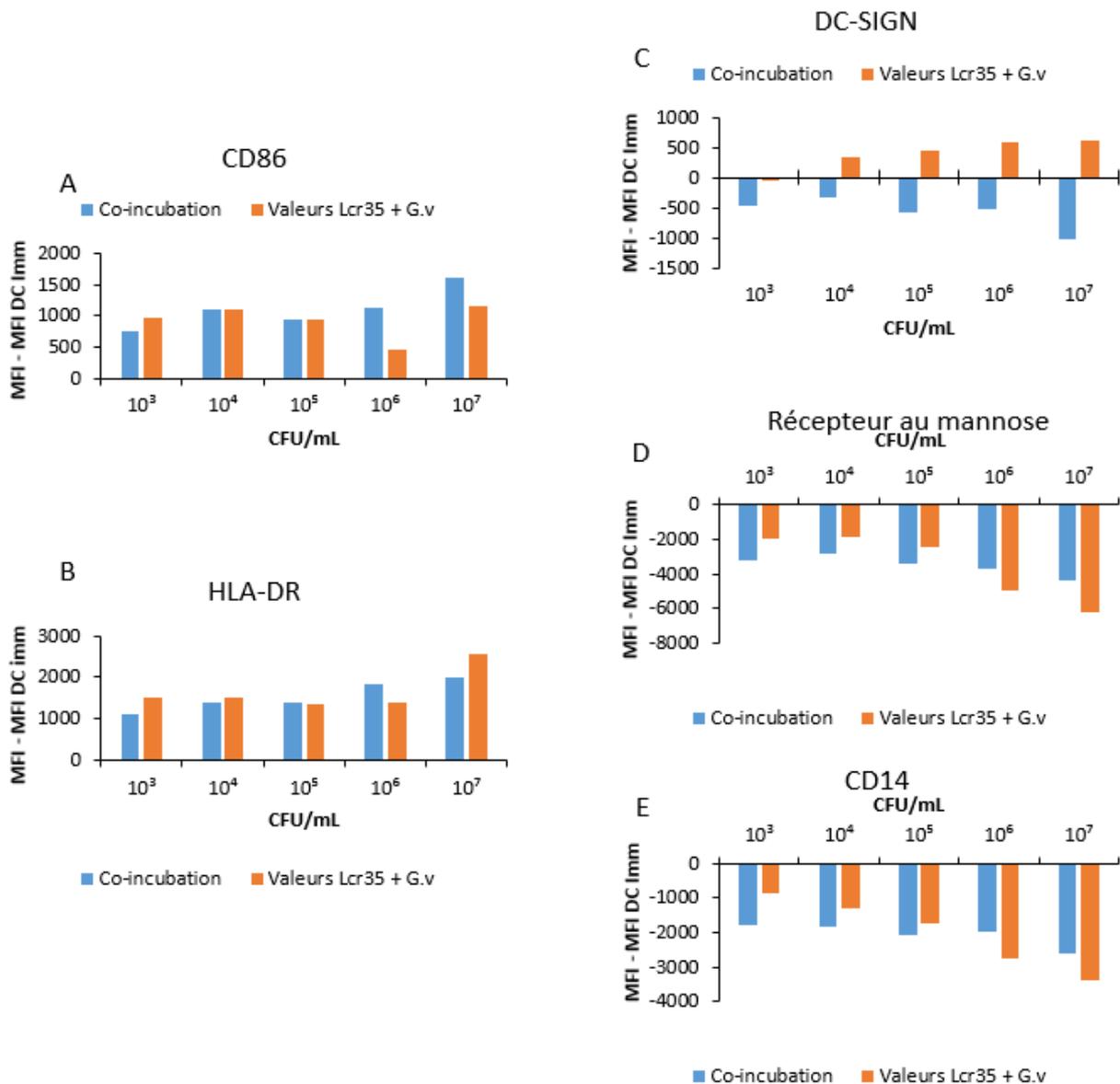


Figure 35. Analyse de l'effet additif ou synergique de la co-incubation de *G. vaginalis* et du Lcr35. Deux marqueurs de maturations, le CD86 (A) et le HLA-DR (B) ainsi que trois marqueurs d'immaturation, le DC-SIGN (C), le récepteur au mannose (D) et le CD14 (E) ont été couplés à des fluorochromes et étudiés en CMF. Les résultats sont exprimés en MFI à laquelle a été soustraite la valeur des DC immatures. Chaque concentration de *G. vaginalis* en co-incubation est comparée à la valeur théorique de l'addition des MFI du Lcr35 à 10⁵ CFU/mL et de la concentration correspondante de *G. vaginalis*. N=5.

Nous avons donc montré dans cette expérience que la présence du Lcr35 permettait d'augmenter la maturation des DC, presque inexistante avec *G. vaginalis* seule. Nous avons donc cherché à savoir si l'effet de la co-incubation du Lcr35 et de *G. vaginalis* était additif, c'est-à-dire que l'activité de l'un et de l'autre s'additionnait ou si ces deux bactéries pouvaient agir en synergie. Pour cela, nous avons donc comparé les intensités de fluorescence émises par chaque marqueur lors de la co-incubation avec l'addition des intensités de fluorescence des mêmes marqueurs, obtenus avec le Lcr35 à une MOI de 1 plus la concentration de *G. vaginalis* correspondante (Figure 35). Cependant avant de faire cette comparaison nous avons soustrait aux valeurs de MFI de chaque concentration, l'intensité de fluorescence émise par les DC immatures pour chaque marqueur. C'est pourquoi, l'intensité de fluorescence des marqueurs de maturation sont positifs alors que celle des récepteurs membranaires sont négatives. Nous avons observé pour le CD86 qu'aux faibles concentrations la co-incubation et les valeurs additionnées sont égales alors qu'il y a une légère augmentation de l'intensité de fluorescence aux fortes concentrations lors de la co-incubation (Figure 35 A). Concernant le HLA-DR, sont observés les mêmes effets à faibles concentrations que pour le CD86, cependant à 10^6 CFU/mL, on retrouve bien une augmentation de la valeur de la co-incubation mais pas à 10^7 CFU/mL où la valeur de co-incubation n'atteint pas celle de l'addition des valeurs de Lcr35 et de *G. vaginalis* 10^7 CFU/mL (Figure 35 B). Au sujet du récepteur au mannose et du CD14, les profils sont identiques à savoir, un effet supérieur de la co-incubation est observée aux faibles concentrations mais pas aux fortes, à l'inverse des marqueurs de maturation (Figure 35 D et E). A la vue de ces quatre résultats, les effets du Lcr35 et de *G. vaginalis* sur la maturation des DC seraient plutôt additifs que synergiques. Pour le DC-SIGN, le profil est différent, car il semble y avoir un effet antagoniste de la co-incubation par rapport aux bactéries seules (Figure 35 C). Comme nous l'avons vu pour la figure précédente, ceci peut s'expliquer par une intensité de fluorescence du Lcr35 à 10^5 CFU/mL seul supérieure aux DC immatures, qui n'est pas retrouvé lors de la co-incubation.

Discussion générale

Discussion générale

Le principal objectif de ce travail était de déterminer les effets différentiels que peut avoir un pathogène vaginal, *G. vaginalis*, et une souche de probiotique, le Lcr35, sur les DC humaines et les lymphocytes T CD4. Pour cela, nous avons étudié *in vitro* les différentes étapes caractérisant la réponse immunitaire médiée par les DC, de l'internalisation des bactéries par les DC aux sous-populations lymphocytaires engendrées.

La réponse immunitaire induite par *G. vaginalis*

Nous avons montré que *G. vaginalis* avait la capacité d'interagir avec les DC et d'être internalisée. L'internalisation de cette bactérie par les cellules de l'immunité, dont les DC, n'avait pas encore été démontrée dans la littérature. De ce fait, nous apportons un côté original dans notre étude. De plus l'étude de l'internalisation nous a permis d'observer la formation d'amas par cette bactérie. Bien qu'il soit connu que *G. vaginalis* ait la capacité à former des biofilms, il est intéressant d'observer ce phénomène *in vitro*. L'internalisation de *G. vaginalis* par les DC a pour conséquence d'induire des changements phénotypiques dose-dépendants mais de faible amplitude sur les moDC et d'induire parallèlement la sécrétion de cytokines à la fois anti- et pro-inflammatoire. En effet, les résultats obtenus montrent qu'à faibles concentrations *G. vaginalis* n'a aucun effet détectable sur les moDC tant au niveau membranaire qu'en terme de sécrétion. A forte concentration, à une MOI de 100, *G. vaginalis* est toujours peu internalisée comparativement à d'autres espèces bactériennes et induit une maturation modérée des DC ainsi qu'une très faible sécrétion de TNF- α , d'IL-10, d'IL-12p70 et d'IFN- γ . Pour analyser ces résultats, nous pouvons les comparer avec deux études de la littérature. Ce sont les seules études se rapprochant de la nôtre, bien qu'ils aient étudié l'effet de *G. vaginalis* sur la réponse cytokinique d'une lignée monocyttaire, les THP-1, et non des DC. En résumé, Dans la première étude, il a été montré que *G. vaginalis*, mais aussi son surnageant de culture, avait la capacité d'induire de façon significative la production de TNF- α par la lignée monocyttaire THP-1 (Zariffard et al., 2005). Dans la seconde étude, *G. vaginalis* a démontré des capacités à induire la sécrétion de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-18 également par les THP-1 (Vick et al., 2014). Ces deux études concluent donc à un effet pro-inflammatoire de *G. vaginalis*. Cependant, il existe de nombreuses différences entre ces modèles d'études *in vitro* et le nôtre. Cette discussion va nous permettre de détailler les résultats obtenus par ces auteurs ainsi que leur méthode d'étude pour les comparer à ce que nous avons obtenu. En effet, leur principale

conclusion est que *G. vaginalis* est reconnue comme pro-inflammatoire, nos résultats, différents, tendent à démontrer qu'au contraire grâce à l'utilisation d'une large gamme de bactéries, *G. vaginalis*, est non ou très faiblement inflammatoire.

Tout d'abord, le principal point commun est que dans ces deux études la souche utilisée est la même que la nôtre. Il s'agit de la souche de *G. vaginalis* ATCC 14018. Cette souche exprime les trois facteurs de virulence connus rendant *G. vaginalis* pathogène. En effet, cette souche exprime des gènes potentiellement important pour la formation de biofilm comme les glycosyltransferases, mais aussi des gènes codant pour des *pili* facilitant l'adhésion aux cellules épithéliales. De plus, elle exprime des gènes codant pour la vaginolysine, et pour des enzymes impliquées dans la dégradation de la mucine (Yeoman et al., 2010).

Nous avons ensuite analysé les différences entre ces études et la nôtre. Dans un premier temps, le modèle cellulaire est différent. Alors que nous avons utilisé des moDC provenant de PBMC, les deux autres équipes ont étudié une lignée monocyttaire, les THP-1. L'utilisation de moDC pour étudier la réponse immunitaire induite par un pathogène est un modèle commun utilisé dans un grand nombre d'études. En introduction, nous avons montré que les moDC produites *in vitro* étaient proches des DC dérivées des monocytes dans un contexte inflammatoire ou infectieux, appelées DC inflammatoires. Lors d'une infection vaginale, comme la vaginose bactérienne, il est donc probable de retrouver ce genre de DC dans la muqueuse vaginale, faisant des moDC un modèle d'étude cohérent par rapport aux objectifs de ce travail.

Dans un second temps, l'utilisation faite de *G. vaginalis* est différente. Dans notre modèle, *G. vaginalis* est inactivée par exposition à des UV. En effet, 48 heures de culture sont nécessaires pour étudier la maturation des DC. Si nous les laissons vivantes, nous obtiendrions un bouillon de culture au bout des 48 heures induisant une forte cytotoxicité. Elles sont ainsi inactivées dans le but d'obtenir une concentration fixe de bactéries au contact des moDC. Travaillant sur une large gamme de bactéries dans le but d'étudier une réponse dose-dépendante, cet aspect nous paraissait essentiel. La limite étant que nous nous affranchissons des molécules potentiellement sécrétées par *G. vaginalis*. Des travaux parallèles menés au sein du laboratoire nous ont montré que, même inactivés, des pathogènes comme *C. albicans* et *K. pneumoniae* pouvaient induire une maturation très forte ainsi qu'une sécrétion significative de cytokines pro-inflammatoires. Les résultats obtenus avec *G. vaginalis* sont donc très différents

des résultats obtenus classiquement dans notre laboratoire avec ce modèle. Zariffard et Vick ont travaillé sur une seule concentration de bactéries vivantes. Zariffard *et al.* ont étudié l'effet de *G. vaginalis* vivante à une MOI initiale de 200 pendant 48 heures. La sécrétion de TNF- α dosée est très élevée (proche de 0 pg/mL pour le milieu de culture seul à 2942 pg/mL pour *G. vaginalis* et 300 pg/mL pour un commensal vaginal *L. crispatus*), mais les milieux de culture étant riches en nutriments, il aurait été intéressant de connaître la véritable MOI dans les puits de culture au bout des 48 heures de culture. Il est donc licite de s'interroger sur la pertinence clinique de ce modèle qui utilise une si forte concentration bactérienne au contact de monocytes. L'effet du surnageant de culture conditionné de *G. vaginalis* a aussi été mis au contact des THP-1 pendant 48 heures. Il a été montré une augmentation non significative de la production de TNF- α . Cette sécrétion était environ 5 fois inférieure par rapport à celle induite par *G. vaginalis* vivante. Dans la seconde étude, Vick *et al.* ont mis *G. vaginalis* vivante au contact des THP-1 pendant 12 et 24 heures à une MOI comprise entre 5 et 10. Là encore, les bactéries ont donc eu le temps de se multiplier et d'augmenter la MOI réelle dans les puits de culture. Dès 12 heures de coculture, il est observé une sécrétion de TNF- α (de 400 pg/mL à T0 à 1500 pg/mL à T12) qui se maintient à 24 h. L'augmentation de la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18 apparaît à partir de 24 h (de 50 pg/mL à 900 pg/mL et de 0 pg/mL à 40 pg/mL respectivement). A cette concentration de bactérie inactivée nous n'avons pas observé d'augmentation de la sécrétion de TNF- α après 48 h de culture. Dans ces deux études, seules des cytokines pro-inflammatoires ont été dosées. Il aurait été intéressant de connaître les effets de *G. vaginalis* sur la sécrétion d'IL-10 par exemple. En effet, dans notre modèle, seule la production d'IL-10 est augmentée significativement à forte concentration. De plus, les auteurs n'ont pas regardé l'aspect dose-dépendant de la réponse à *G. vaginalis*, seules des concentrations fortes de bactéries vivantes ont été utilisées, or nous savons que la quantité de bactéries au contact direct des cellules de l'immunité a un impact important sur la nature de la réponse apportée. De plus, nous avons comparé nos résultats de CMF et de dosage de cytokines avec d'autres bactéries et levures plus inflammatoires, ce qui apporte un aspect relatif que ces études n'ont pas, sinon nous aurions aussi pu conclure à l'induction d'une inflammation par *G. vaginalis*.

Les résultats obtenus avec cette bactérie vivante et avec le surnageant de culture de *G. vaginalis* dans ces études signifie que la production de métabolites, d'enzymes ou de toxines pourrait jouer un rôle dans l'induction d'une réponse inflammatoire. Il serait donc intéressant, en parallèle de nos résultats d'étudier dans nos modèles l'effet du surnageant de culture de *G. vaginalis* afin de déterminer l'impact sur les DC des produits sécrétés par la bactérie.

En plus des articles portant sur les THP-1, une équipe américaine s'est intéressée à l'effet sur les moDC non pas de *G. vaginalis* seule, mais à celui du liquide cervico-vaginal prélevé chez des femmes ayant une vaginose bactérienne. Nous avons vu que la vaginose bactérienne est une dysbiose de la flore vaginale dans laquelle le nombre de lactobacilles diminue et la quantité de bactéries anaérobies augmente (St. John et al., 2007). Or nous avons vu dans l'introduction bibliographique que la flore vaginale lors d'une vaginose est anaérobie, polymicrobienne, d'une grande diversité, dont 35 espèces uniques, avec prédominance de *G. vaginalis*, mais aussi présence d'*A. vaginae*, *P. bivia*.... (Fredricks et al., 2005). Ces prélèvements riches en bactéries ont été mis au contact de moDC et comparés à des prélèvements de liquide cervico-vaginal de femmes saines. Le modèle est donc identique au nôtre d'un point de vue cellulaire, néanmoins, il diffère en cela qu'un grand nombre de bactérie se retrouve au contact des moDC à des concentrations que nous ignorons. Ils ont ainsi démontré que le liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose déclarée induit une maturation des moDC et une induction des cytokines IL-12 et IL-23 comparativement à celui des femmes saines. Les auteurs ont donc conclu à un effet pro-inflammatoire du liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose bactérienne. Cependant, après analyse de leurs données, nous pensons qu'il est possible dans ce cas de parler de maturation incomplète, car elle ne représente que le pourcentage de 50 % de la maturation induite par le LPS qui est le témoin positif. De plus, le pourcentage de maturation est simplement doublé par rapport à la maturation induite par le liquide cervico-vaginal de femmes saines. La maturation induite par le liquide cervico-vaginale de femmes saines représente donc 25% de la maturation induite par le LPS. Elle peut être considérée comme faible, si on la compare aux résultats que nous avons obtenus au sein du laboratoire, en mettant par exemple différentes concentrations de *C. albicans* inactivée au contact des moDC. Concernant la sécrétion de l'IL-12p70 que nous avons aussi dosée, leurs résultats indiquent une forte augmentation (x18) de la sécrétion entre les deux types de liquide cervico-vaginal, que nous n'observons pas dans notre modèle. Les auteurs ont donc conclu d'un effet pro-inflammatoire. Cependant, en regardant le résultat médian et non plus moyen de cette sécrétion, il est possible de s'apercevoir, qu'il est inférieur à 100 pg/mL et proche de celui des femmes n'ayant pas de vaginose. Cela signifie que le liquide cervico-vaginal de quelques femmes ayant une vaginose a induit cette sécrétion d'IL-12p70, pour les autres il n'y a pas eu de forte augmentation de la sécrétion d'IL-12p70. Ceci peut s'expliquer par la composition de la flore au moment du prélèvement et de sa richesse en *P. bivia* par exemple, qui est riche en LPS et plutôt inflammatoire. Un parallèle peut être fait avec l'étude de Libby et al., en 2008 qui

a montré que *A. vaginae* induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par des VK2 de façon dose-dépendante (Libby et al., 2008). Il est donc possible de supposer qu'une flore vaginale enrichie en *A. vaginae* peut induire la sécrétion de ces deux cytokines. Dans cette étude, une nouvelle fois, l'IL-10 n'a pas été dosée. De plus, il aurait été intéressant de comparer les effets observés avec des pathogènes connus, colonisant la flore vaginale lors d'une vaginose.

Dans cette étude la concentration bactérienne total au contact direct des moDC n'est pas connue, mais doit être très élevée. En effet, le liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose bactérienne contient une flore polymorphe d'un grand nombre de bactéries anaérobies. De plus, il a été démontré par PCR en temps réel, effectuée sur un culot bactérien obtenu à partir de 10 mL de liquide cervico-vaginal, que *G. vaginalis* était en moyenne présente à hauteur de $1,3 \cdot 10^{10}$ bactéries dans le liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose (Zariffard et al., 2002). Dans notre modèle, nous utilisons comme concentration la plus élevée, $1 \cdot 10^7$ CFU/mL de *G. vaginalis* seule. La quantité bactérienne au contact des moDC est donc bien différente entre notre étude et celle de St John *et al.*, Nos conclusions sont donc différentes et peuvent s'expliquer par cette différence de concentration bactérienne et du nombre de bactéries utilisées.

Notre conclusion sur *G. vaginalis* est de dire qu'elle est peu ou pas inflammatoire dans notre modèle car, en analysant les fortes concentrations de bactéries mises au contact direct des moDC, la réponse reste faible et dose-dépendante. Or, bien qu'il soit compliqué de déterminer la concentration de bactéries au contact direct des DC *in vivo*, nous pensons que les concentrations les plus faibles que nous avons utilisé serait plus à même de refléter la réalité du fait de la constitution anatomique de la muqueuse vaginale. L'hypothèse étant que grâce au mucus et à la barrière épithéliale, les concentrations de bactéries *in vivo*, au contact des DC situées dans la muqueuse sous-jacente, doivent être relativement faibles. C'est pourquoi, contrairement aux autres équipes, ne sachant pas avec certitude les véritables concentrations *in vivo*, nous avons fait le choix d'utiliser une gamme large de concentrations bactériennes.

Dans un second temps, nous avons aussi étudié l'effet de *G. vaginalis* sur la prolifération lymphocytaire et sur la sécrétion cytokinique qui l'accompagne. Dans un modèle de stimulation des PBMC par la PHA, nous n'avons observé aucune modification de la prolifération pour des concentrations de *G. vaginalis* allant de 10^3 à 10^6 CFU/mL et seulement une légère augmentation significative de la prolifération induite par une concentration de 10^7 CFU/mL.

Les publications s'étant intéressées à l'effet de *G. vaginalis* sur la réponse des THP-1 n'ont pas de résultats sur la réponse lymphocytaire. Cependant, St John *et al.*, ont analysé l'effet de la maturation des DC au contact de liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose bactérienne sur la prolifération de Ly T CD4. Cette MLR allogénique a permis de montrer que les DC ayant mûri avec le liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose bactérienne, induit, au contact de Ly T CD4, une prolifération de 42 % de ces dernières, alors que des DC ayant mûri avec du LPS, n'induisent une prolifération des Ly T CD4 que de 23 % (St. John *et al.*, 2007). Nos résultats ne s'accordent pas avec ceux obtenus dans cette étude, cependant, le modèle de prolifération est différent (MLR *vs* TTL) ainsi que le stimulus (liquide cervico-vaginal *vs* *G. vaginalis*). Or, comme nous l'avons mentionné précédemment les concentrations bactériennes présentes dans le liquide cervico-vaginal sont probablement supérieures à notre concentration de 1.10^7 CFU/mL de *G. vaginalis*, ce qui pourrait expliquer cette induction de prolifération supérieure à la nôtre.

Nous avons observé dans notre étude que la faible prolifération induite par *G. vaginalis* à forte concentration s'accompagne d'une faible augmentation significative d'IFN- γ et d'IL-17 par les PBMC, lui conférant un léger effet inflammatoire, probablement pro-Th1 et pro-Th17. La sécrétion de TNF- α n'augmente pas de façon significative. Seuls Zariffard *et al.*, en 2005 ont étudié l'effet de TNF- α (seulement cette cytokine), sécrété par des PBMC après 48 h de culture avec *G. vaginalis* vivante à une MOI de 200. Les résultats indiquent que la sécrétion de TNF- α est alors neuf fois supérieure à celle induite par 1 μ g/mL de LPS (Zariffard *et al.*, 2005). Une fois de plus dans cette étude, cette forte sécrétion de TNF- α par les PBMC peut s'expliquer par le fait que la bactérie a été utilisée vivante pendant 48 h à une très forte concentration, dans un milieu riche permettant probablement la multiplication de la population bactérienne dans ce laps de temps.

Au vu des résultats obtenus, nous proposons le concept d'inflammation à bas bruit qui correspondrait à la clinique de cette pathologie. Il faut bien sûr effectuer des études cliniques pour confirmer ce lien entre micro-inflammation induite par les bactéries pathogènes et la clinique de la vaginose bactérienne qui est très peu inflammatoire. En attendant, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer la micro-inflammation ou l'inflammation à bas bruit, induite lors d'une vaginose bactérienne.

Tout d'abord, il est nécessaire de rappeler que certaines bactéries anaérobies vaginales se développant fortement lors de la dysbiose sont déjà présentes dans la flore commensale

normale, plus particulièrement *G. vaginalis*. (Shipitsyna et al., 2013). Elle représente environ 7 % de la flore vaginale normale, ce qui fait de *G. vaginalis* la bactérie anaérobie la plus représentée. Il a été montré qu'elle était en moyenne retrouvée à une quantité de $3,75.10^7$ bactéries dans le liquide cervico-vaginal de femmes saines (Zariffard et al., 2002). A l'état physiologique, ces bactéries anaérobies sont probablement reconnues comme commensales par les cellules de l'immunité innée dont les DC. Ceci pourrait expliquer la faible induction induite par cette bactérie. De plus, bien qu'aucune donnée n'ait été démontrée, du fait de la structure anatomique de la muqueuse vaginale, le nombre de bactéries au contact direct des DC doit être limité, correspondant probablement aux doses faibles utilisées dans notre gamme de concentration bactérienne.

Concernant la souche de *G. vaginalis* ATCC 14018, elle exprime des gènes permettant de coder pour les protéines membranaires RIB et la peroxiredoxine (Yeoman et al., 2010). Les protéines membranaires RIB, permettent comme nous avons pu le montrer en introduction de protéger la bactérie contre le système immunitaire (Stalhammar et al., 1993). Dans le but d'identifier le véritable effet de ces protéines dans nos modèles, il serait intéressant d'effectuer les mêmes expériences, mais avec une souche de *G. vaginalis* mutée pour ces protéines. La réponse des DC serait-elle alors plus forte ? La peroxiredoxine quant à elle est une enzyme antioxydante, permettant à un pathogène comme *Trypanosoma cruzi* (responsable de la maladie de Chagas) de le protéger des espèces oxygénées réactives dérivées des macrophages, ce qui le rend plus pathogène (Alvarez et al., 2011; Cardoso et al., 2016; Piacenza et al., 2008). Cette enzyme étant sécrétée, nous ne pouvons pas observer ces effets dans nos modèles car la bactérie est inactivée par UV.

Une analyse de séquences d'ARN 16S de *G. vaginalis* a permis de la classer en tant que proche parent du genre *Bifidobacterium* (Van esbroeck et al., 1996). Or nous avons vu en introduction que la grande majorité des bifidobactéries avaient des effets anti-inflammatoires. En effet, des bifidobactéries comme *B. breve* C50, *B. infantis*, *B. longum*... favorisent la sécrétion d'IL-10 par les DC. Dans notre étude, *G. vaginalis* induit uniquement une augmentation significative de la sécrétion d'IL-10 par les DC. En perspectives, il nous faudrait étudier la polarisation lymphocytaire induite par les DC ayant mûri au contact de *G. vaginalis*, dans le but d'observer sa capacité à induire des Ly Treg ou non.

Enfin, une autre explication de la faible réponse immunitaire induite par *G. vaginalis* et la vaginose bactérienne pourrait résider dans sa capacité à former un biofilm. En effet, la microscopie électronique nous a permis d'apercevoir, la formation d'agrégats *in vitro* qui, selon notre hypothèse, correspond au début de ce phénomène. Cette conformation de *G. vaginalis*

pourrait être responsable du faible taux d'internalisation par les DC et de la faible maturation qui en découle dans nos expériences mais aussi *in vivo*. En effet, les bactéries présentes à l'intérieur du biofilm et les PAMP qui composent leur paroi ne seraient alors pas accessibles aux DC et à leur PRR, inhibant ainsi leurs capacités d'internalisation et leur activation (Costerton et al., 1999). Ceci a par exemple été démontré en 2002, en étudiant l'effet de PBMC sur un biofilm de *S. aureus*. Il a été observé que, bien que les leucocytes étaient capables de pénétrer à l'intérieur du biofilm, leur capacité à internaliser les bactéries était significativement réduite en comparaison à l'internalisation de *S. aureus* sous forme planctonique (Leid et al., 2002). De plus, en 2005 il a été montré que la formation de biofilm par des staphylocoques responsables de sepsis était associée à une diminution des réponses inflammatoires de l'hôte en limitant l'interaction entre les cellules du système immunitaire et les bactéries responsables de l'infection (Klingenberg et al., 2005). Dans le but d'étudier ce phénomène, les perspectives possibles seraient de comparer les effets de *G. vaginalis* sous forme planctonique *versus* les effets de *G. vaginalis* ayant été cultivé et incubé spécifiquement en biofilm.

Nous avons pu voir que l'effet de *G. vaginalis* au contact des DC et des lymphocytes T a été peu étudié et seuls quelques articles ont été publiés. Ces auteurs ont utilisé des méthodologies différentes de la nôtre pour analyser l'effet de *G. vaginalis* ou de liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose bactérienne sur la réponse immunitaire, en concluant généralement à un effet pro-inflammatoire de cette bactérie. Nous avons également montré un effet inflammatoire de *G. vaginalis*, cependant nous le nuancions car uniquement observable pour les fortes concentrations, restant de faible amplitude, et enfin en le comparant à d'autres souches pathogènes dans un modèle que nous connaissons bien. C'est pourquoi, nous concluons que cet effet est faible. Le peu d'effet que nous avons observé sur la réponse immunitaire *in vitro* correspond à la présentation clinique de la vaginose bactérienne qui est une pathologie dont la caractéristique est d'être peu-inflammatoire.

Bien que nous ayons émis certaines hypothèses concernant l'effet peu inflammatoire de *G. vaginalis* au long de cette discussion, il n'existe pas encore de réponses claires à ce propos et des expériences complémentaires seraient à effectuer pour tenter de répondre à cette question.

La réponse immunitaire induite par le Lcr35

Pour étudier l'effet du Lcr35 sur les DC, nous avons utilisé le même modèle de moDC que pour l'étude de *G. vaginalis*. Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent,

les moDC sont proches des DC inflammatoires. Comme nous l'avons vu, le Lcr35 peut avoir un effet inflammatoire à certaines concentrations, il est donc probable que des DC inflammatoires soient produites *in vivo* lors de la prise du probiotique. Le but de ces travaux est d'analyser de manière successive les premières étapes de la réponse immunitaire *in vitro* en mimant le plus possible les phénomènes se déroulant *in vivo*. Pour cela nous avons donc étudié l'internalisation du Lcr35 par les DC, la maturation qui en découle et des modèles de prolifération lymphocytaire mimant l'expansion clonale et la polarisation des lymphocytes T. Nous avons tout d'abord pu montrer que les DC avaient de grandes capacités d'internalisation du Lcr35. Bien que la microscopie électronique nous ait confirmé des données de microscopie optique montrant que le Lcr35 prenait une conformation en chaîne, notre étude nous a montré que cela n'impactait pas la capture de cette bactérie puisque environ 80 à 90 % des DC avaient pu internaliser le Lcr35 après 3 heures de contact (sous forme libre mais aussi sous forme de chaînes), ce qui est bien supérieur à ce que nous avons observé en étudiant *G. vaginalis*. Ce n'est pas la première fois que l'internalisation *in vitro* d'un lactobacille par des DC a été démontrée, nos résultats sont donc cohérents avec la littérature. En effet, il a par exemple été montré avec un autre *L. rhamnosus*, le Lr 32, que les DC dérivées de la moelle osseuse de souris, ont la capacité de l'internaliser dans des vacuoles et des phagosomes (Foligne et al., 2007). Les photos de microscopie ont été prises après 18 h de contact entre les moDC et le Lr32 à une MOI de 10. Nos résultats sont très proches de ceux de cet article mais notre concentration bactérienne correspondait à une MOI de 100, ce qui peut expliquer que nous avons observé le même taux d'internalisation (>80%) que dans leur étude après 3 h de contact seulement et non 18 h.

Dans un second temps, nous avons analysé la maturation des moDC induite par le Lcr35 à différentes concentrations. Nous avons observé une maturation dose-dépendante des moDC avec une maturation exprimée en MFI (Mean Fluorescent Intensity) à une MOI de 100 qui correspond de 60 % de la maturation induite par le témoin positif, 100 ng/mL de LPS. Ces observations confirment de précédents résultats issus de notre équipe (Evrard et al., 2011). Toutefois, cette maturation dose-dépendante décrite dans les modèles d'études *in vitro* reste faible lorsqu'elle est comparée aux résultats de maturation obtenus en présence de pathogènes. En effet, nous avons inclus pour d'autres études des pathogènes comme *K. pneumoniae* et *C. albicans* dans nos modèles de moDC. Il a alors été observé une maturation dose-dépendante mais beaucoup plus forte avec une maturation à une MOI supérieure ou égale à celle du LPS. Avec le Lcr35, nous avons obtenu une prolifération de 40 % inférieure, c'est pourquoi nous

parlons de semi-maturation induite par le Lcr35. Ce phénomène de maturation dose-dépendante des moDC induite par des bactéries commensales et des lactobacilles comme les *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus* et le *L. lactis* a été montré dans plusieurs études (Baba et al., 2008; Latvala et al., 2008).

De plus, nous avons analysé la viabilité des moDC en CMF après 48 h de culture en présence de la gamme de concentration du Lcr35. La MOI de 100 correspond à une très forte concentration de bactéries au contact de cellules. Une légère augmentation de la mortalité des moDC est observée à cette concentration. Néanmoins dans le cas où il est comparé à d'autres pathogènes comme citées précédemment, la mortalité induite est tout à fait négligeable. Nous confirmons donc que le Lcr35 n'est pas cytotoxique, ce qui avait déjà pu être démontré *in vivo* du fait de l'obtention de la certification GRAS.

Les lactobacilles induisent donc une maturation dose-dépendante des DC, seulement, ils n'ont pas tous les mêmes capacités à induire la sécrétion de cytokines. Dans le précédent article de notre équipe, le dosage des cytokines par ELISA nous a révélé un profil plutôt pro-Th1/Th17 mais avec tout de même une augmentation de l'IL-10. Dans notre étude récente, nous avons utilisé la technologie Luminex qui permet de doser un panel de cytokines plus large. Nous avons pu doser 17 cytokines simultanément, pour avoir un aperçu plus global que la simple étude de la balance IL-10/IL-12. Nous avons ainsi montré que le Lcr35 à une MOI de 100 induisait la sécrétion d'un grand nombre de cytokines, à la fois de l'inflammation systémique, pro-Th1, pro-Th2, pro-Th17 et pro-Treg, nous faisant conclure à un effet globalement immunostimulant du Lcr35 dans ce modèle. A une MOI de 10, seules l'IL-2, l'IL-8, l'IL-12 et l'IL-17 ont été sécrétées de façon significatives. Ces résultats indiqueraient donc un effet plutôt pro-Th1 et pro-Th17 correspondant à ce qu'avait pu identifier dans la précédente étude du laboratoire, en étudiant l'expression de certains gènes codant pour ces cytokines. Il a été montré par de nombreuses études que plusieurs lactobacilles ont tendance à avoir cet effet pro-Th1, ce qui les différencie des bifidobactéries utilisée aussi comme probiotique qui elles sont plutôt régulatrices (Amar et al., 2015; Cross and Gill, 2001; Kosaka et al., 2012; Mohamadzadeh et al., 2005).

Le dosage de cytokines dans le modèle moDC nous fournit des indices quant à l'orientation de la polarisation lymphocytaire T. Cependant, dans ce modèle de moDC nous ne nous sommes pas intéressés aux lymphocytes T et à leur sous-population. Il est donc nécessaire

de vérifier les résultats présomptifs obtenus avec les moDC dans des modèles d'études contenant des lymphocytes. Pour en apprendre davantage, notre étude a été plus loin que celle de 2011, en étudiant l'effet du Lcr35 sur les lymphocytes T. Pour cela nous avons utilisé deux modèles de stimulation exogène de ces cellules dans le but d'analyser les capacités du Lcr35 à moduler ces stimulations. Ces deux modèles diffèrent par la stimulation utilisée pour induire de la prolifération lymphocytaire. Le TTL (Test de transformation lymphoblastique) est un modèle dans lequel nous avons stimulé les lymphocytes T présents dans les PBMC avec une lectine végétale, la PHA (Phytohémagglutinine A). Dans le modèle de MLR (Réaction Leucocytaire Mixte), la stimulation des lymphocytes T s'effectue par un conflit allogénique entre les DC d'un donneur et les lymphocytes T présents dans les PBMC d'un autre donneur. La prolifération induite est alors influencée par l'état de maturation des DC induit par le contexte préalable au contact des bactéries.

Concernant la prolifération lymphocytaire, les deux modèles nous ont apporté le même profil de résultats, à savoir une augmentation significative de la prolifération aux faibles concentrations, avec un pic à une concentration de 10^5 CFU/mL, et une inhibition de la prolifération à une concentration de 10^7 CFU/mL significative seulement en TTL. D'autres études, sur d'autres souches de *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, et *L. helveticus*, ont également montré dans leurs modèles une inhibition dose-dépendante de la prolifération de la plus petite à la plus grande concentration (Yoshida et al., 2011 ; Hosoya et al., 2014). Il est toutefois difficile de comparer les concentrations utilisées dans ces études avec les nôtres car ils ont utilisés des $\mu\text{g/mL}$ de bactéries entières et inactivées ou des $\mu\text{g/mL}$ de fractions bactériennes. Nous ne pouvons donc pas savoir si leur concentration la plus faible utilisée correspond au 10^5 CFU/mL au quel cas, ils auraient très bien pu obtenir un profil en cloche comme le nôtre.

Par ailleurs, le profil de prolifération obtenu diffère de ce que nous avons observé concernant la maturation des DC. En effet, la maturation des DC étant dose-dépendante nous aurions pu nous attendre à ce que la prolifération lymphocytaire suive le même profil avec une prolifération croissante (si inflammatoire) ou décroissante (si anti-inflammatoire) et dose-dépendante, mais pas en dôme (Mohamadzadeh et al., 2005).

Une première hypothèse pour expliquer ce profil de prolifération, serait qu'un stimulus fortement pro-inflammatoire induit par une forte concentration de Lcr35, inhiberait la prolifération lymphocytaire par un phénomène de contre-régulation. C'est ce qui avait été

montré par Hubo *et al.*, en 2013. Une activation forte des Ly T conduit à une augmentation de l'expression de CTLA-4, qui entre en compétition avec le CD28 pour se lier au CD80 et au CD86, ce qui conduit à une inhibition de la réponse (Hubo *et al.*, 2013). Il serait donc envisageable d'ajouter un anti-CTLA-4 couplé à un fluorochrome dans nos expériences de CMF, dans le but d'identifier une modification de l'expression de ce marqueur. De plus, il serait possible d'utiliser un anticorps inhibiteur du CTLA-4 pour observer son impact sur la diminution de la prolifération lymphocytaire. En MLR, ceci pourrait expliquer la diminution de prolifération induite par des DC maturées en présence des plus fortes concentrations de bactéries.

Si nous restons dans cette hypothèse de contre-régulation suite à un stimulus fort, nous pouvons regarder du côté de la méthode d'étude utilisée. En effet, l'incorporation de la thymidine tritiée utilisée dans le but d'étudier la prolifération lymphocytaire se fait dans les dernières heures de l'étude et reflète la prolifération d'un instant T. Nous pouvons supposer que les lymphocytes auraient été fortement stimulés dans les premiers jours et qu'ils prolifèreraient beaucoup moins du fait de la contre-régulation en fin d'étude lors de l'ajout de la thymidine tritiée, qui s'incorpore dans les cellules en division. Il serait donc intéressant d'effectuer une étude cinétique pour étudier la prolifération induite quotidiennement pendant une semaine.

Enfin, la deuxième hypothèse concerne l'effet de la PHA dans le modèle TTL, au contact des PBMC et du Lcr35. La PHA est une lectine végétale et de ce fait, elle a comme propriété de fixer les composés glycanes (Etzler *et al.*, 2009). Or ces composés sont présents à la fois à la surface des PBMC et des lactobacilles. Ces liaisons sont de faible affinité mais très spécifiques (Berg *et al.*, 2002). Il est donc possible de supposer qu'en présence d'une forte concentration de Lcr35, la PHA pourrait se fixer majoritairement sur le probiotique et non sur les PBMC qui s'en trouvent moins activées. Il est aussi possible que la PHA fixée sur les glycanes du Lcr35 inhibe le contact entre les PAMP du Lcr35 et les PRR des PBMC, ne lui permettant pas de moduler la prolifération. Il a été montré que des modifications de structure de la membrane de lactobacilles comme le *L. plantarum* peuvent modifier l'activation des TLR 2 dans une lignée de cellules épithéliales HEK (Remus *et al.*, 2012). Pour remédier à ces doutes concernant la PHA et son interaction avec le Lcr35, il pourrait être envisagé de faire des essais en stimulant les cellules à la PHA d'abord, pour activer les lymphocytes T, puis dans un second temps d'incorporer dans le milieu les lactobacilles.

En parallèle de la prolifération nous avons dosé les cytokines sécrétées par les PBMC dans le surnageant de culture. Les résultats indiquent une augmentation dose-dépendante et significative à 10^7 CFU/mL de la sécrétion de l'IL-1 β , l'IL-2 et le TNF- α . Cette sécrétion de cytokines correspond au profil dose-dépendant de maturation des DC ainsi qu'à leur sécrétion dose-dépendante de cytokines. Cependant, moins de cytokines ont été sécrétées de façon significative. Le profil de sécrétion de cytokines induit par les différentes concentrations des bactéries est différent de celui observé pour la prolifération lymphocytaire. En effet, à l'inverse de la prolifération, ce dosage est le résultat d'une accumulation de sécrétions de ces cytokines pendant la durée de l'étude. Il serait alors, aussi important de prélever du milieu de culture de façon quotidienne, dans le but de doser et d'analyser la cinétique de sécrétion de ces cytokines. La cinétique de sécrétion pourrait être un indicateur et nous fournir des informations sur la prolifération obtenue les jours suivants la sécrétion de telles ou telles cytokines.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la modulation des sous-populations lymphocytaires induite par le Lcr35. Dans les modèles de TTL et de MLR, nous avons marqué en CMF (cytométrie en flux) l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL-17 intracellulaires et le facteur de transcription FoxP3, correspondant aux Ly Th1, Th2, Th17 et Treg, respectivement. De façon intéressante, dans les deux modèles, nous avons observé un profil de sécrétion de l'IFN- γ ressemblant au profil de prolifération obtenu, c'est-à-dire, une augmentation de la production d'IFN- γ aux faibles concentrations, avec un pic à une concentration de 10^5 CFU/mL, et une diminution progressive aux fortes concentrations. Ces résultats indiquent un effet pro-Th1 du Lcr35 à certaines concentrations. Une étude portant sur deux probiotiques composés de deux bactéries (*L. acidophilus* et *B. bifidus* et *L. acidophilus* et *B. infantis*) a montré que ces deux probiotiques induisent une augmentation intracellulaire d'IFN- γ après stimulation de PBMC à la PHA (Li et al., 2011). Les auteurs observent une légère augmentation à 10^4 CFU/mL, un pic de sécrétion à 10^5 CFU/mL et un retour aux valeurs de la PHA à 10^6 CFU/mL de la production d'IFN- γ , ce qui correspond aux concentrations que nous avons utilisées. Dans une étude *in vivo*, le *L. rhamnosus* GG, souche dont le Lcr35 est proche, a également montré des effets pro-Th1. Dans cette étude, des enfants ont consommé des capsules contenant 5.10^9 CFU de *L. rhamnosus* GG pendant 4 semaines. Après le traitement, les PBMC ont été prélevés et stimulés à la PHA. Les résultats ont indiqué une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ par les PBMC des sujets après le traitement probiotique (Pohjavuori et al., 2004). D'autres souches de lactobacilles comme les *L. gasseri* ATCC 19992, *L. reuteri* ATCC 23272, *L. johnsonii* ATCC 33200 et *L. plantarum* ont aussi des effets pro-Th1 dans des modèles de MLR où elles sont utilisées

vivantes au contact de moDC à une MOI minimum de 10 (Mileti et al., 2009; Mohamadzadeh et al., 2005). Dans nos deux modèles, le Lcr35 seul induit donc un effet pro-Th1 à faible concentration. A forte concentration, il est retrouvé une légère diminution de la sécrétion d'IFN- γ , selon le même profil que ce qui est observé pour la prolifération. Les mêmes hypothèses peuvent donc être émises, à savoir que l'on observe les cellules à un instant T, qu'il y a peut-être eu une contre-régulation due à un effet inflammatoire fort les jours précédents et qu'une étude cinétique doit être envisagée.

Dans nos expériences, l'inhibition de prolifération à forte concentration ne s'expliquerait pas par l'apparition de Ly Treg car il n'y a pas d'augmentation de l'expression de FoxP3 à ces concentrations. Yoshida *et al.* en 2011 ont aussi observé une diminution de la prolifération des lymphocytes T dans un modèle murin, mais n'ont pas observé d'augmentation des Ly Treg ni d'augmentation de l'apoptose (Yoshida et al., 2011). Cependant, il semblerait que cet effet soit dépendant de MyD88 et que la génération d'espèces oxygénées réactives soit importante. L'effet des lactobacilles est souche-dépendant et tous les lactobacilles n'ont pas la même capacité à induire des Ly Treg. Le *L. acidophilus* W55 après 7 jours de contact avec des PBMC induit 2 à 3 fois plus de Ly Treg CD25⁺FoxP3⁺ que le *L. plantarum* W62 (De Roock et al., 2010). De plus, une étude cinétique de cette induction de Ly T reg indique que le temps de culture est important dans l'apparition de ces cellules. En effet, le pourcentage de cellules CD25⁺FoxP3⁺ est presque 4 fois plus important après 10 jours de culture qu'au quatrième jour. Dans nos modèles, nous sommes à 3 et 5 jours de culture, ce qui signifie que nous sommes peut-être trop tôt pour voir l'apparition de Ly Treg.

Il existe ainsi d'autres modèles d'études, des modèles murins dans lesquels a été testé le Lcr35. Dans ces modèles murins d'asthme allergique ou de dermatites atopiques il a été montré par plusieurs études que le Lcr35 était efficace pour diminuer les signes cliniques de ces pathologies induites chez la souris (Jang et al., 2012; Kim et al., 2012, 2013, 2014; Yeom et al., 2015). De plus, l'effet bénéfique observé dans ces modèles n'était pas dû à une augmentation de la production de Ly Th1, mais à l'induction de DC tolérogènes permettant une augmentation de la production de Ly T reg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺. Dans ces études, les souris ont été traitées avec le Lcr35 pendant au minimum 7 jours et jusqu'à 10 semaines de façon quotidienne. Il pourrait donc y avoir un lien avec la cinétique de formation des Ly Treg que nous venons de mentionner.

Les marqueurs des autres sous-populations n'ont pas été modifiés dans nos expériences. Cependant, il est difficile de marquer de l'IL-4 et de l'IL-17 au niveau intracellulaire, nous devons donc réfléchir à différents marqueurs qui nous permettraient peut-être d'identifier ces sous-populations

Les modèles d'études *in vitro* comme les nôtres ou *in vivo* chez l'animal peuvent donc donner des résultats différents. Ce phénomène est aussi observé chez la souche *L. rhamnosus* GG, où elle peut avoir des effets inflammatoires *in vitro* mais aussi être tolérogène dans d'autres modèles (Blümer et al., 2007; Mileti et al., 2009; Peña and Versalovic, 2003; Pessi et al., 2000; Pohjavuori et al., 2004). Les différences de résultats obtenues entre notre modèle *in vitro* et le modèle murin *in vivo*, peuvent s'expliquer par le fait que les contacts entre le Lcr35 et le système immunitaire se fassent de façon directs dans notre modèle et indirects dans le modèle murin. Dans notre modèle, nous nous intéressons au contact direct entre les moDC et le Lcr35. Dans ce modèle nous trouvons donc que le Lcr35 a globalement un effet pro-inflammatoire et pro-Th1 dépendant de sa concentration, mais il existe d'autres modèles d'études *in vitro*, que nous avons mis en place au laboratoire, dans lesquels la stimulation des moDC est indirecte. Cette stimulation indirecte consiste à insérer le Lcr35 au contact de lignées de cellules épithéliales, à leur pôle apical. Les DC se trouvent dans un autre compartiment au pôle basal des cellules épithéliales et sont stimulées par les sécrétions des cellules épithéliales stimulées par le Lcr35. Ce modèle est appelé le modèle Transwell®. C'est donc le microenvironnement créé par la sécrétion de ces molécules qui induit la maturation des DC et la sécrétion de cytokines. Il a été montré que dans ces modèles de contact indirect entre les probiotiques et les DC, la réponse était souvent moins inflammatoire (Mileti et al., 2009; Zoumpopoulou et al., 2009). Ces expériences Transwell® ont débuté au laboratoire et les résultats préliminaires semblent confirmer ce qui a été montré dans ces deux études. En effet, les moDC semblent moins mûrir à forte concentration que lors d'un contact direct.

De plus, *in vivo*, le Lcr35 ne se retrouve pas seul au contact de la muqueuse intestinale. En effet, il est au contact de la flore commensale, ce qui peut diminuer la quantité de Lcr35 au contact de l'épithélium encombré par les bactéries commensales et induire un effet plutôt tolérogène. Comme cela avait été montré dans l'étude de Zeuthen *et al.*, l'effet des bactéries seules *in vitro* ou dans des mélanges de bactéries au contact des DC peut parfois être très différent (Zeuthen et al., 2006). Ceci a aussi été démontré dans une étude concernant *S. aureus*, *L. rhamnosus* GG et *L. reuteri*. Elle indique que suite à une forte induction d'IFN- γ par *S. aureus*, les deux souches probiotiques, bien que connues pour être plutôt pro-Th1, ont la

capacité d'inhiber cette production et les auteurs concluent d'un effet inhibiteur de ces deux probiotiques (Johansson et al., 2016). Il serait donc intéressant d'étudier le Lcr35 en coculture avec un pathogène induisant une forte réponse Th1 dans nos modèles de TTL et de MLR, dans le but d'analyser si leurs effets sont agonistes ou antagonistes, auquel cas les conclusions que l'on a fourni pourraient être différentes.

Ces modèles *in vitro* nous apportent des réponses sur le comportement du Lcr35 au contact des cellules de l'immunité. Lors de la consommation de gélules de Gynophilus® utilisées par voie vaginale ou de Bacilor® utilisées par voie intestinale, les interactions avec ces cellules sont plus limitées. Ces gélules contiennent 10^9 bactéries, cependant, *in vivo* il est difficile de connaître la concentration de bactéries au contact direct des DC. En effet, les DC se trouvent principalement dans la sous-muqueuse où il y a une absence de contact direct entre elles et la flore commensale. Les MOI entre le Lcr35 et les DC sont donc probablement faibles. Lorsque l'on observe la dose-dépendance des résultats que nous avons obtenus *in vitro*, ces données semblent pourtant importantes pour connaître le réel impact du Lcr35 sur la réponse immunitaire *in vivo*. Cependant, à ce jour, aucune étude *in vivo* n'a pu déterminer la quantité de bactéries réellement au contact de ces cellules. Ces résultats sont souvent extrapolés au niveau intestinal à partir de la concentration bactérienne contenue dans les selles, mais ne permet pas d'indiquer une concentration bactérienne au contact des DC (de Champs et al., 2003).

D'après nos résultats, le Lcr35 a un effet pro-Th1 à faible dose dans un modèle direct de stimulation des PBMC. Ces expériences *in vitro* sont menées au sein du laboratoire dans une optique de développement d'études à moyen terme plus cliniques. En effet, en fonction du profil de la réponse immunitaire induit par le Lcr35, son utilisation serait plus cohérente dans certaines maladies dysimmunitaires que dans d'autres. Par exemple, les Ly Th1 étant antagonistes de la sous-population de Ly Th2, si son profil inducteur d'une réponse pro-Th1 se confirme, ce probiotique pourrait être utilisé dans la prévention ou le traitement des allergies, l'asthme et l'eczéma atopique, mais aussi et c'est ce qui nous a initialement intéressé dans cette étude, contre les agents infectieux. Généralement, lors d'infections les réponses Th1 et Th17 agissent conjointement pour lutter contre les agents pathogènes qui en sont responsables, comme par exemple dans les infections pulmonaires ou dans les infections génitales basses comme dans la vaginose bactérienne (Evrard et al., 2010). Ceci nous a conduits à nous intéresser à l'effet du Lcr35 en présence du pathogène majeur de la vaginose bactérienne *G. vaginalis*.

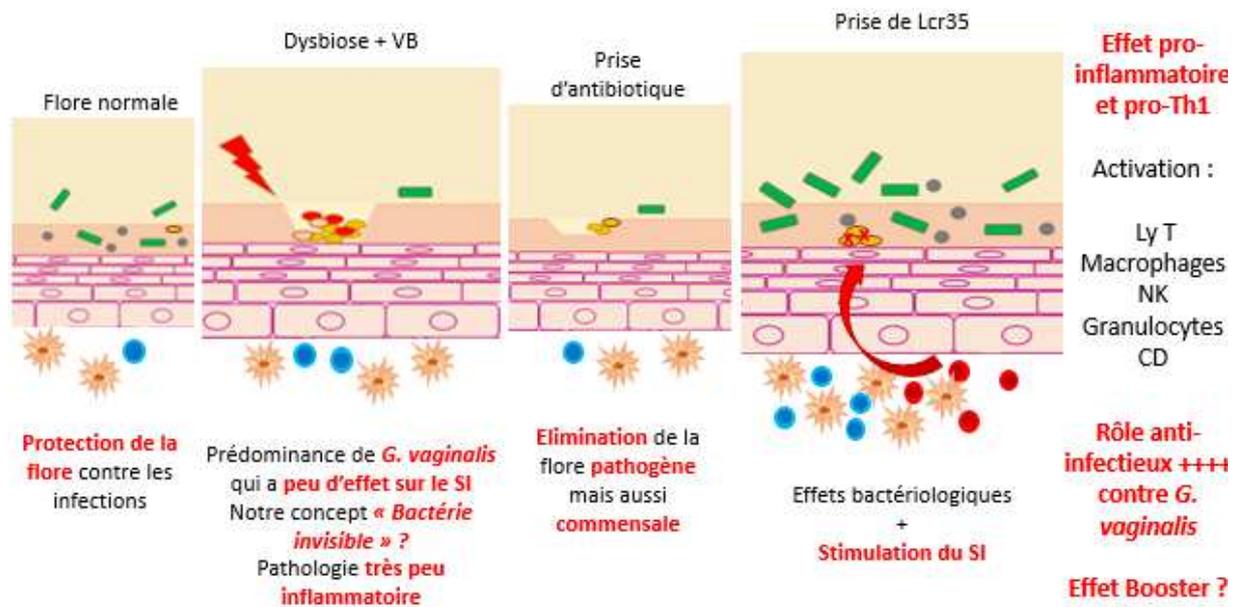


Figure 36. Proposition du concept d'effet Booster du système immunitaire du Lcr35 en présence de *G. vaginalis*.

La réponse immunitaire induite par les mélanges de Lcr35 et *G. vaginalis*

Lors d'études *in vivo*, chez des femmes atteintes de vaginose, la prise du Lcr35 sous la forme Gynophilus®, de façon locale après un traitement antibiotique a permis de prévenir significativement les récurrences par rapport à la seule prise d'antibiotique (Kovachev and Dobrevski-Vacheva, 2013; Petricevic and Witt, 2008). Pour essayer de comprendre les mécanismes impliqués derrière les bénéfices observés lors de ces études cliniques, une étude bactériologique *in vitro* a permis de montrer que le Lcr35 avait des effets inhibiteurs sur la croissance de pathogènes vaginaux comme *G. vaginalis* (Coudeyras et al., 2009). Ce probiotique est un producteur d'acide lactique mais aussi d'autres substances antimicrobiennes, ce qui pourrait permettre d'expliquer ces effets. *In vivo*, après un traitement antibiotique, la flore vaginale est presque détruite, il reste cependant des reliquats de bactéries anaérobies protégées dans les biofilms formés et résistantes aux antibiotiques (Bostwick et al., 2016). La prise de lcr35 permettrait alors de créer un microenvironnement acide, grâce à la production d'acide lactique, favorable à la croissance des espèces commensales comme les *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri* et *L. iners* qui pourraient alors recoloniser la muqueuse vaginale. Dans le même temps, cette recolonisation permettrait d'inhiber la croissance des bactéries anaérobies qui ne se développent pas dans un milieu acide, ce qui favorise la restauration de la flore commensale. En plus de ces caractéristiques bactériologiques bien connues, notre étude a eu pour but d'analyser les réponses du système immunitaire à ces deux bactéries en parallèle, afin de déterminer si elles induisaient des profils immunologiques différents, agonistes ou antagonistes, et peut-être de mettre en évidence de nouveaux mécanismes d'action, de nature immunologique, du probiotique dans cette indication.

Nous avons ainsi constaté dans nos modèles que les deux bactéries étudiées induisaient des réponses différentes. En résumé, *G. vaginalis* apparaît comme une bactérie très peu inflammatoire voire presque indétectable à faible concentration pour le système immunitaire, ce qui correspondrait à la clinique atypique de la vaginose bactérienne. A l'inverse, le Lcr35 induit *in vitro* un effet pro-inflammatoire voire même pro-Th1 à certaines concentrations. Nous avons donc émis l'hypothèse que le Lcr35 en induisant la sécrétion de nombreuses cytokines par les DC pourrait avoir un effet *in vivo* immunostimulant, permettant d'activer localement de nombreuses cellules de l'immunité et ainsi induire une réponse inflammatoire du système

immunitaire vaginale qui pourrait permettre de restaurer une immunité protectrice contre *G. vaginalis*.

C'est pourquoi, dans le but de tester notre hypothèse, nous avons voulu étudier l'effet de ces bactéries en co-incubation sur des moDC. Les résultats indiquent que ces deux bactéries induisent un effet globalement additif sur la maturation des DC. En effet, *in vitro*, le Lcr35, en présence de *G. vaginalis* est capable d'induire une maturation plus importante des moDC que lorsqu'elle est seule. *G. vaginalis* n'induisant pas ou peu de maturation des DC, l'augmentation de maturation en présence du Lcr35 pourrait être intéressante pour stimuler la réponse immunitaire. Transposées *in vivo*, ces résultats pourraient correspondre à une stimulation du système immunitaire lors du traitement secondaire de la vaginose bactérienne, nous avons baptisé ce concept, effet booster (Figure 36). En effet, comme montré sur la figure 35, la vaginose bactérienne est peu inflammatoire, la prise d'antibiotique élimine à la fois les flores pathogène et commensale, ce qui permet à *G. vaginalis*, qui est presque indétectable pour le système immunitaire, de se développer de nouveau au sein de la niche écologique vaginale. La prise du Lcr35 permet, bactériologiquement, de créer un environnement propice au développement des espèces indigènes de lactobacilles, mais aussi comme nous l'avons vu, de stimuler les différentes cellules de l'immunité innée et adaptative grâce à la sécrétion de cytokines, ce qui lui permet d'avoir un rôle anti-infectieux et de lutter contre *G. vaginalis*, d'où le concept d'effet booster du système immunitaire.

Par ailleurs, pour ce qui est de la question de la sécurité d'utilisation du Lcr35 pour les utilisatrices potentielles en termes d'effets indésirables liées à cette augmentation de l'inflammation induite par le probiotique, plusieurs éléments sont à prendre en considération. En effet, nous avons vu, que, bien que le Lcr35 induise une réponse inflammatoire, celle-ci est beaucoup moins intense que la réponse induite par des pathogènes responsables de vaginite comme *C. albicans*. De plus, des résultats non publiés, obtenus par l'industriel producteur du Lcr35, ont montré que le Lcr35 pris de façon local, ne resterait que transitoirement au niveau vaginal, de l'ordre de trois jours. Enfin, l'enquête effectuée auprès des femmes utilisant ce probiotique n'aurait pas montré d'effets néfastes lors de la prise de ce probiotique, fournissant ainsi un argument supplémentaire en faveur d'une inflammation induite modérée et transitoire.

Perspectives

Il a été montré que le liquide cervico-vaginal de femmes ayant une vaginose bactérienne était légèrement plus inflammatoire que *G. vaginalis* seule dans des modèles *in vitro*. Il pourrait être intéressant de connaître le comportement du Lcr35 lorsqu'il est co-incubé avec des bactéries anaérobies issues de la flore commensale vaginale autres que *G. vaginalis* comme *A. vaginae*, *P. bivia* induisant une réponse inflammatoire un peu plus forte. Les effets seraient-ils alors cumulatifs comme nous venons de l'observer avec *G. vaginalis*, ou le Lcr35 diminuerait la réponse inflammatoire, comme cela a pu être observé *in vitro* pour les *L. rhamnosus* GG et *L. reuteri* au contact de *S. aureus* (Johansson et al., 2016). Par ailleurs, il serait probablement pertinent d'étudier les effets du probiotique mis en contact simultanément avec plusieurs de ces souches pathogènes, afin de se rapprocher encore plus de la flore polymorphe observée *in vivo*.

L'utilisation de moDC pour analyser la réponse immunitaire induite par des probiotiques ou des pathogènes est un modèle commun utilisé dans un grand nombre d'études. Cependant, dans le but de développer nos modèles et de se rapprocher de ce qui est observé *in vivo*, il serait intéressant de prélever et d'utiliser différentes sous-populations de DC. Parmi ces sous-populations, les cDC2 semblent intéressantes car d'après ce que nous avons vu en introduction, elles seraient les plus représentées au niveau vaginal. Le but serait alors de comparer les résultats avec les cDC2 de ceux obtenus avec notre modèle de moDC. Plusieurs questions se posent sur la manière de procéder. Est-il possible d'obtenir des populations de DC présentes dans la muqueuse vaginale, par exemple par biopsie lors d'une intervention chirurgicale ? Ou doit-on, dans un souci à la fois pratique et éthique utiliser des sous-populations de DC sanguines ? S'il est possible d'obtenir des DC vaginales, fait-on de l'analyse des sous-populations de DC vaginales après prise par des volontaires soit de façon locale soit orale, ou mettons-nous directement en contact le Lcr35 avec ces sous-populations de DC pour un travail *in vitro* ? De même, si les DC utilisées sont sanguines, quelles stimulations utilisées ? Contact direct Lcr35-DC comme dans nos modèles de moDC ou prise orale de Lcr35 par des volontaires et analyse de l'effet systémique du Lcr35 pris ainsi sur les sous-populations de DC. Dans le cas du contact direct, nous cherchons à mettre en évidence un mécanisme comme dans nos expériences sur les moDCD. Dans le second cas, qui serait complémentaire, nous cherchons à observer les conséquences de la prise du Lcr35 sur les DC et sur les modifications de la répartition des sous-populations. Dans le but de comparer les résultats obtenus avec les moDC,

L'utilisation de cDC1 ou cDC2 modifierait probablement la réponse observée car, par exemple, il a été montré que des cDC CD11c⁺ sanguines induisent moins de prolifération lymphocytaire dans un modèle de MLR mais plus de Ly Th1 que leurs homologues moDC (Osugi et al., 2002).

Dans nos modèles, nous utilisons des bactéries inactivées, ce qui dans nos systèmes maintient les interactions membranaires, mais il serait intéressant d'étudier l'effet du surnageant de culture de *G. vaginalis* et du Lcr35 pour étudier l'impact des substances sécrétées par ces bactéries : les toxines comme la vaginolysine pour *G. vaginalis* et les substances antimicrobiennes pour le Lcr35. Lors de l'étude avec du surnageant de culture neutralisé, le contact direct bactérie-DC est supprimée, la réponse serait potentiellement différente. C'est ce qui a été montré dans une étude *in vitro*, dans laquelle sont comparés les effets du *L. rhamnosus* CNCM I-4036 vivant au contact et de son surnageant seul sur les DC. Les deux traitements activent les voies de signalisation de façon différentes. Dans les deux cas, il y a eu une augmentation de la transcription des gènes codant pour le TLR 9. Cependant, la bactérie vivante a activé l'expression des gènes codant des TLR 2 et 4 alors que le surnageant de culture a activé l'expression des gènes des TLR 1 et 5. De plus, cette différence d'activation des TLR, s'accompagne d'une capacité supérieure du surnageant à diminuer l'effet inflammatoire induit par la présence d'*E. coli*. Cette étude conclue donc d'un effet différentiel entre la bactérie et le surnageant seul qui serait dans ce cas plus efficace pour inhiber un effet inflammatoire (Bermudez-Brito et al., 2014). Une étude similaire utilisant *B. breve* CNCM I-4035 et son surnageant a démontré les mêmes résultats que précédemment, c'est-à-dire une inhibition de l'inflammation induite par *S. typhi* par le surnageant (Bermudez-Brito et al., 2013). Il est donc possible de faire l'hypothèse que le surnageant de culture du Lcr35 pourrait être plus tolérogène que ce que nous avons observé avec la bactérie inactivée.

Nous avons donc obtenu des données fonctionnelles concernant le Lcr35 et *G. vaginalis*, c'est pourquoi dans le but d'approfondir ces résultats, nous souhaitons étudier la mécanistique impliquée. Pour commencer, nous avons vu que les deux bactéries interagissaient et étaient internalisées par les moDC. Nous souhaitons étudier les récepteurs impliqués dans la capture et dans l'induction d'un signal. Concernant *G. vaginalis*, il semblerait que sa présence au contact des PBMC induise une légère augmentation de l'expression des TLR 2 (Zariffard et al., 2005). Le Lcr35 est un lactobacille, il est donc fortement probable que les mécanismes sous-jacents impliquent une interaction avec les TLR 2. Des premiers essais préalables à ma thèse ont été effectués au laboratoire avec des modèles d'inhibition par des anticorps anti-TLR 2 et anti-TLR

4. Cette approche s'est révélée inefficace et n'inhibait pas suffisamment le fonctionnement de ces récepteurs. Durant ma thèse nous avons fait des nouveaux essais, en utilisant des inhibiteurs chimiques des TLR 2 (CU CPT 22) et des TLR 4 (C34). Les résultats obtenus restent préliminaires car l'inhibiteur anti-TLR 2 a induit une forte mortalité des moDC. Il y a aussi eu d'anciennes expériences dans le laboratoire sur le DC-SIGN, afin de déterminer si ce récepteur était impliqué dans la reconnaissance et la capture du Lcr35 par les DC, en utilisant le DC-SIGN Fc et des anticorps anti-DC-SIGN. Les résultats obtenus ont conclu à l'absence d'interaction significative entre le DC-SIGN et le Lcr35 mais restent à confirmer dans des modèles complémentaires, comme des lignées cellulaires transfectées et KO pour le DC-SIGN ou alors par de la microscopie confocale permettant de localiser le Lcr35 marqué ainsi que le DC-SIGN marqué.

Les résultats obtenus concernant la prolifération lymphocytaire sont dose-dépendants, et le profil diffère de ce qui est observé avec les DC. Bien que nous ayons émis plusieurs hypothèses précédemment dans cette discussion, il serait intéressant d'analyser l'expression de certaines voies de signalisation comme le NF- κ B, ERK et la voie calcique sur les DC et les lymphocytes T pour analyser si ces voies de signalisation sont modulées en fonction des concentrations de Lcr35 et si cette modulation diffère entre ces deux cellules. Pour débiter, des western-blot pour analyser l'activité de la voie NF- κ B dans les moDC au contact de notre gamme de Lcr35 vont être mis au point très prochainement, car la technique est déjà utilisée au sein du laboratoire dans des modèles sur les cellules épithéliales.

Enfin, ces travaux *in vitro*, d'identification de la réponse immunitaire induite par le Lcr35 peuvent aussi permettre à moyen terme de développer l'utilisation du Lcr35 dans différentes pathologies. Le Lcr35 ayant une activité pro-Th1 dans nos modèles, il pourrait inhiber les pathologies Th2 dépendantes. Un modèle plus complexe de polarisation à partir de lymphocytes T naïfs autologue d'une durée totale de 21 jours est actuellement en cours de mise au point au laboratoire dans le but de confirmer les observations faites avec les modèles TTL et MLR. Si le profil pro-Th1 se confirme, des expérimentations pourraient être faites dans le but d'utiliser le Lcr35 dans la prévention ou le traitement de pathologies allergiques comme les allergies alimentaires, la dermatite atopique, la rhinite allergique ou l'asthme par exemple. Une réflexion est en cours actuellement sur ce thème au sein du laboratoire, à travers le souhait de développer un projet d'étude clinique chez l'enfant allergique à la noisette.

Conclusion et perspectives

Le travail de cette thèse a consisté en la caractérisation des effets immunomodulateurs sur les cellules dendritiques et les lymphocytes T de deux souches bactériennes, un pathogène, *G. vaginalis* et un probiotique, *L. rhamnosus* Lcr35.

Nous avons démontré dans nos modèles *in vitro* que les moDC au contact de *G. vaginalis* sont faiblement stimulées, ce qui est caractérisé par une maturation très incomplète, quelque soit la concentration, et sécrètent peu de cytokines, même à forte concentration. Ces résultats peuvent probablement s'expliquer par la difficulté pour les DC d'internaliser *G. vaginalis* du fait de sa conformation extracellulaire en amas, prémice à la formation d'un biofilm. De plus, nous avons également pu mettre en évidence que *G. vaginalis* induit une légère augmentation dose-dépendante, significative à forte concentration, de la prolifération lymphocytaire. Nous en concluons d'après nos modèles, que *G. vaginalis* est une bactérie peu-inflammatoire. Par ailleurs, cette conclusion concorde très bien avec la clinique atypique de la vaginose bactérienne, dysbiose peu inflammatoire.

Dans les mêmes modèles, nous avons démontré que le probiotique Lcr35, est internalisé de façon rapide par les moDC et qu'il s'en suit une induction dose-dépendante de la maturation de ces cellules. A forte concentration, le Lcr35 induit la sécrétion à la fois des cytokines de l'inflammation systémique, des cytokines pro-Th1, proTh17, pro-Th2 et pro-Treg. Le Lcr35 a donc un effet globalement immunostimulant sur les moDC. Au niveau lymphocytaire, le Lcr35 induit une augmentation significative de la prolifération à faible concentration dans deux modèles différents que sont le TTL et la MLR, suivi d'une diminution de cette prolifération à forte concentration, significative uniquement dans le modèle TTL. Le marquage en CMF de cytokines intra-cellulaires indique un profil identique pour la production d'IFN- γ , faisant du Lcr35 un probiotique pro-Th1 à faible concentration. A forte concentration, est observée une inhibition de la production d'IFN- γ par rapport au point 10^5 CFU/mL. Enfin, nous avons montré une stimulation de l'activité IDO à faible concentration et une inhibition de cette activité à forte concentration.

Enfin, nous avons observé grâce à de premières expériences que la co-incubation de ces deux bactéries induit un effet additif permettant une maturation des moDC supérieure à ce qui est observé lorsque *G. vaginalis* est seule. Cette étude *in vitro*, qui a besoin d'être complétée

dans nos différents modèles indique cependant, que les mécanismes immunologiques du Lcr35 pourraient grâce à un effet booster du système immunitaire avoir un impact bénéfique, en addition des mécanismes bactériologiques connus, lorsqu'il est utilisé dans le traitement secondaire de la vaginose bactérienne.

Actuellement, les travaux se poursuivent dans le but de finaliser et de publier l'article sur le Lcr35. De plus, nous travaillons sur les éléments mécanistiques mentionnés en fin de discussion, à savoir, les récepteurs mis en causes avec les voies de signalisation impliquées dans les effets observés du Lcr35. De plus, un modèle plus sophistiqué de polarisation lymphocytaire T en modèle autologue, dont la mise au point est déjà bien avancée, continue à être développé dans le but de l'améliorer et d'obtenir des résultats dans un modèle plus physiologique que ceux que nous utilisons pour l'instant. Enfin, les modèles Transwell® de stimulation indirecte vont être poursuivis au sein du laboratoire en parallèle de mes travaux, et un modèle de stimulation indirecte *via* des cellules M devrait être mis au point afin au final de mimer *in vitro* les trois voies de contact existantes *in vivo* au sein de la muqueuse digestive.

Références bibliographiques

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.H., and Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology* (Elsevier Health Sciences).
- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* *8*, 639–646.
- Adam, E., Delbrassinne, L., Bouillot, C., Reynders, V., Mailleux, A.-C., Muraille, E., and Jacquet, A. (2010). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 activates DC and prevents house dust mite allergy through a TLR4-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1995–2005.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499–511.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* *124*, 783–801.
- Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., and Helander, I.M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 2001–2005.
- Alard, J., Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A.-L., Mariadassou, M., Maguin, E., Waligora-Dupriet, A.-J., Pot, B., et al. (2016). Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ. Microbiol.* *18*, 1484–1497.
- Alcaide, M.L., Strbo, N., Romero, L., Jones, D.L., Rodriguez, V.J., Arheart, K., Martinez, O., Bolivar, H., Podack, E.R., and Fischl, M.A. (2016). Bacterial Vaginosis Is Associated with Loss of Gamma Delta T Cells in the Female Reproductive Tract in Women in the Miami Women Interagency HIV Study (WIHS): A Cross Sectional Study. *PLOS ONE* *11*, e0153045.
- Aldunate, M., Tyssen, D., Johnson, A., Zakir, T., Sonza, S., Moench, T., Cone, R., and Tachedjian, G. (2013). Vaginal concentrations of lactic acid potently inactivate HIV. *J. Antimicrob. Chemother.* *68*, 2015–2025.
- Aldunate, M., Srbinovski, D., Hearps, A.C., Latham, C.F., Ramsland, P.A., Gugasyan, R., Cone, R.A., and Tachedjian, G. (2015). Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Clin. Transl. Physiol.* *6*, 164.
- Alegre, M.L., Shiels, H., Thompson, C.B., and Gajewski, T.F. (1998). Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 3347–3356.
- Alexandre, Y., Le Blay, G., Boisramé-Gastrin, S., Le Gall, F., Héry-Arnaud, G., Gouriou, S., Vallet, S., and Le Berre, R. (2014). Probiotics: A new way to fight bacterial pulmonary infections? *Médecine Mal. Infect.* *44*, 9–17.
- Al-Harhi, L., Roebuck, K.A., Olinger, G.G., Landay, A., Sha, B.E., Hashemi, F.B., and Spear, G.T. (1999). Bacterial vaginosis-associated microflora isolated from the female genital tract activates HIV-1 expression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *21*, 194–202.
- Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (2000). Canonical structures for the hypervariable regions of T cell $\alpha\beta$ receptors. *J. Mol. Biol.* *295*, 979–995.

- Allen, S.J., Martinez, E.G., Gregorio, G.V., and Dans, L.F. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003048.
- Al-Sadi, R., Nighot, P., Guo, S., Al-Omari, D., and Ma, T.Y. (2016). Tu2019 Lactobacillus Acidophilus Enhancement of Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier Is Mediated by p38 Kinase and Toll-Like Receptor-2 (TLR-2). *Gastroenterology* 150, S1007.
- Alvarez, M.N., Peluffo, G., Piacenza, L., and Radi, R. (2011). Intraphagosomal Peroxynitrite as a Macrophage-derived Cytotoxin against Internalized Trypanosoma cruzi CONSEQUENCES FOR OXIDATIVE KILLING AND ROLE OF MICROBIAL PEROXIREDOXINS IN INFECTIVITY. *J. Biol. Chem.* 286, 6627–6640.
- Alves, P., Castro, J., Sousa, C., Cereija, T.B., and Cerca, N. (2014). Gardnerella vaginalis Outcompetes 29 Other Bacterial Species Isolated From Patients With Bacterial Vaginosis, Using in an In Vitro Biofilm Formation Model. *J. Infect. Dis.* 210, 593–596.
- Amar, Y., Rizzello, V., Cavaliere, R., Campana, S., De Pasquale, C., Barberi, C., Oliveri, D., Pezzino, G., Costa, G., Meddah, A.T., et al. (2015). Divergent signaling pathways regulate IL-12 production induced by different species of Lactobacilli in human dendritic cells. *Immunol. Lett.* 166, 6–12.
- Amsel, R., Totten, P.A., Spiegel, C.A., Chen, K.C.S., Eschenbach, D., and Holmes, K.K. (1983). Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am. J. Med.* 74, 14–22.
- Andersch-Björkman, Y., Thomsson, K.A., Larsson, J.M.H., Ekerhovd, E., and Hansson, G.C. (2007). Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 708–716.
- Anderson, G., and Jenkinson, E.J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 31–40.
- Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395–1401.
- Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Park, Z., McCann, M.J., Kelly, W.J., and Roy, N.C. (2010). Lactobacillus plantarum MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol.* 10, 316.
- Andreu, A., Stapleton, A.E., Fennell, C.L., Hillier, S.L., and Stamm, W.E. (1995). Hemagglutination, Adherence, and Surface Properties of Vaginal Lactobacillus Species. *J. Infect. Dis.* 171, 1237–1243.
- Angel, C.E., George, E., Brooks, A.E.S., Ostrovsky, L.L., Brown, T.L.H., and Dunbar, P.R. (2006). Cutting Edge: CD1a+ Antigen-Presenting Cells in Human Dermis Respond Rapidly to CCR7 Ligands. *J. Immunol.* 176, 5730–5734.
- Anton, G., Rid, J., Mylonas, I., Friese, K., and Weissenbacher, E.-R. (2008). Evidence of a TH1-Shift of Local Vaginal Inflammatory Response During Bacterial Vaginosis. *Infection* 36, 147–152.
- Antonio, M.A.D., Hawes, S.E., and Hillier, S.L. (1999). The Identification of Vaginal Lactobacillus Species and the Demographic and Microbiologic Characteristics of Women Colonized by These Species. *J. Infect. Dis.* 180, 1950–1956.

- Aoki-Yoshida, A., Yamada, K., Hachimura, S., Sashihara, T., Ikegami, S., Shimizu, M., and Totsuka, M. (2016). Enhancement of Oral Tolerance Induction in DO11.10 Mice by *Lactobacillus gasseri* OLL2809 via Increase of Effector Regulatory T Cells. *PLoS One* *11*, e0158643.
- Aroutcheva, A., Ling, Z., and Faro, S. (2008). *Prevotella bivia* as a source of lipopolysaccharide in the vagina. *Anaerobe* *14*, 256–260.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J.M., and Medina, M. (2015). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens. *BioMed Res. Int.* *2015*, e584183.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *J. Exp. Med.* *190*, 995–1004.
- Atashili, J., Poole, C., Ndumbe, P.M., Adimora, A.A., and Smith, J.S. (2008). Bacterial vaginosis and HIV acquisition: A meta-analysis of published studies. *AIDS Lond. Engl.* *22*, 1493–1501.
- Austin, M.N., Beigi, R.H., Meyn, L.A., and Hillier, S.L. (2005). Microbiologic Response to Treatment of Bacterial Vaginosis with Topical Clindamycin or Metronidazole. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 4492–4497.
- Au-Yeung, B.B., Deindl, S., Hsu, L.-Y., Palacios, E.H., Levin, S.E., Kuriyan, J., and Weiss, A. (2009). The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol. Rev.* *228*, 41–57.
- Azad, M.B., Coneys, J.G., Kozyrskyj, A.L., Field, C.J., Ramsey, C.D., Becker, A.B., Friesen, C., Abou-Setta, A.M., and Zarychanski, R. (2013). Probiotic supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. *BMJ* *347*, f6471.
- Baba, N., Samson, S., Bourdet-Sicard, R., Rubio, M., and Sarfati, M. (2008). Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 468–476.
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1273–1281.
- Bajtay, Z., Csomor, E., Sándor, N., and Erdei, A. (2006). Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol. Lett.* *104*, 46–52.
- Balkus, J.E., Richardson, B.A., Rabe, L.K., Taha, T.E., Mgodi, N., Kasaro, M.P., Ramjee, G., Hoffman, I.F., and Abdool Karim, S.S. (2014). Bacterial vaginosis and the risk of *Trichomonas vaginalis* acquisition among HIV-1 negative women. *Sex. Transm. Dis.* *41*, 123–128.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 767–811.
- Bartlett, J.G., Onderdonk, A.B., Drude, E., Goldstein, C., Anderka, M., Alpert, S., and McCormack, W.M. (1977). Quantitative Bacteriology of the Vaginal Flora. *J. Infect. Dis.* *136*, 271–277.
- Basso, B., Giménez, F., Llorens, and Pez, C. (2005). IL-1b, IL-6 and IL-8 Levels in Gyneco-Obstetric Infections. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* *13*, 207–211.

- Basu, R., O'Quinn, D.B., Silberger, D.J., Schoeb, T.R., Fouser, L., Ouyang, W., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Th22 Cells Are an Important Source of IL-22 for Host Protection against Enteropathogenic Bacteria. *Immunity* 37, 1061–1075.
- Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R., and Roncarolo, M.-G. (2006). Tr1 cells: From discovery to their clinical application. *Semin. Immunol.* 18, 120–127.
- Baumann, C., Bonilla, W.V., Fröhlich, A., Helmstetter, C., Peine, M., Hegazy, A.N., Pinschewer, D.D., and Löhning, M. (2015). T-bet– and STAT4–dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 4056–4061.
- Beck-García, K., Beck-García, E., Bohler, S., Zorzín, C., Sezgin, E., Levental, I., Alarcón, B., and Schamel, W.W.A. (2015). Nanoclusters of the resting T cell antigen receptor (TCR) localize to non-raft domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 802–809.
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Pavunc, A.L., Habjanič, K., and Šušković, J. (2011). Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100, 43–53.
- Benham, H., Norris, P., Goodall, J., Wechalekar, M.D., FitzGerald, O., Szentpetery, A., Smith, M., Thomas, R., and Gaston, H. (2013). Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Res. Ther.* 15, R136.
- Benlahrech, A., Duraisingham, S., King, D., Verhagen, L., Rozis, G., Amjadi, P., Ford, T., Kelleher, P., and Patterson, S. (2015). Human blood CD1c dendritic cells stimulate IL-12-independent IFN- γ responses and have a strikingly low inflammatory profile. *J. Leukoc. Biol.* 97, 873–885.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Lectins Are Specific Carbohydrate-Binding Proteins.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). probiotics mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174.
- Bermudez-Brito, M., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., Bernal, M.J., Romero, F., and Gil, A. (2013). Cell-free culture supernatant of bifidobacterium breve CNCM I-4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with *Salmonella typhi* through TLR activation. *Plos one.* 8, e59370.
- Bermudez-Brito, M., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C., Romero, F., and Gil, A. (2014). *Lactobacillus rhamnosus* and its cell-free culture supernatant differentially modulate inflammatory biomarkers in *Escherichia coli*-challenged human dendritic cells. *Br J Nutr.* 10, 1727-1737.
- Berridge, M.J. (1987). Inositol Trisphosphate and Diacylglycerol: Two Interacting Second Messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 159–193.
- Bertran, T., Brachet, P., Varelle-Delarbre, M., Falenta, J., Dosgilbert, A., Vasson, M.-P., Forestier, C., Tridon, A., and Evrard, B. (2016). Slight Pro-Inflammatory Immunomodulation Properties of Dendritic Cells by *Gardnerella vaginalis*: The “Invisible Man” of Bacterial Vaginosis? *J. Immunol. Res.* 2016.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.
- Biswas, A., Petnicki-Ocwieja, T., and Kobayashi, K.S. (2012). Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J. Mol. Med.* 90, 15–24.

- Blattner, C.M., Crosby, M.S., Goedken, M., and Murase, J.E. (2016). Update: Do probiotics prevent or treat pediatric atopic dermatitis? *Pediatr. Allergy Immunol.* 27, 425–428.
- Blümer, N., Sel, S., Virna, S., Patrascan, C.C., Zimmermann, S., Herz, U., Renz, H., and Garn, H. (2007). Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin. Exp. Allergy* 37, 348–357.
- Bonhagen, K., Liesenfeld, O., Stadecker, M.J., Hutloff, A., Erb, K., Coyle, A.J., Lipp, M., Kroczeck, R.A., and Kamradt, T. (2003). ICOS+ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses. *Eur. J. Immunol.* 33, 392–401.
- Borges, S., Silva, J., and Teixeira, P. (2013). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obstet.* 1–11.
- Boris, S., and Barbés, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 2, 543–546.
- Borthakur, A., Gill, R.K., Hodges, K., Ramaswamy, K., Hecht, G., and Dudeja, P.K. (2006). Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits butyrate uptake in Caco-2 cells by altering the apical membrane MCT1 level. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G30-35.
- Bosselut, R., Feigenbaum, L., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2001). Strength of Signaling by CD4 and CD8 Coreceptor Tails Determines the Number but Not the Lineage Direction of Positively Selected Thymocytes. *Immunity* 14, 483–494.
- Bostwick, D.G., Woody, J., Hunt, C., and Budd, W. (2016). Antimicrobial Resistance Genes and Modeling of Treatment Failure in Bacterial Vaginosis: Clinical Study of 289 Symptomatic Women. *J. Med. Microbiol.*
- Bowie, A., and O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67, 508–514.
- Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 180–190.
- Bradshaw, C.S., Morton, A.N., Garland, S.M., Horvath, L.B., Kuzevska, I., and Fairley, C.K. (2005). Evaluation of a point-of-care test, BVBlue, and clinical and laboratory criteria for diagnosis of bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1304–1308.
- Bradshaw, C.S., Morton, A.N., Hocking, J., Garland, S.M., Morris, M.B., Moss, L.M., Horvath, L.B., Kuzevska, I., and Fairley, C.K. (2006). High Recurrence Rates of Bacterial Vaginosis over the Course of 12 Months after Oral Metronidazole Therapy and Factors Associated with Recurrence. *J. Infect. Dis.* 193, 1478–1486.
- Brenner, D.M., Moeller, M.J., Chey, W.D., and Schoenfeld, P.S. (2009). The Utility of Probiotics in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1033–1049.
- Breton, G., Lee, J., Zhou, Y.J., Schreiber, J.J., Keler, T., Pühr, S., Anandasabapathy, N., Schlesinger, S., Caskey, M., Liu, K., et al. (2015). Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 212, 401–413.
- Briselden, A.M., and Hillier, S.L. (1994). Evaluation of affirm VP Microbial Identification Test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 32, 148–152.

- Briseño, C.G., Haldar, M., Kretzer, N.M., Wu, X., Theisen, D.J., KC, W., Durai, V., Grajales-Reyes, G.E., Iwata, A., Bagadia, P., et al. (2016). Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Rep.* *15*, 2462–2474.
- Brotman, R.M., Ravel, J., Bavoil, P.M., Gravitt, P.E., and Ghanem, K.G. (2014). Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: Challenges for vaccine development against sexually transmitted infections. *Vaccine* *32*, 1543–1552.
- Brun, V., Bastian, H., Neveu, V., and Foussat, A. (2009). Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. *Int. Immunopharmacol.* *9*, 609–613.
- Bu, L.-N., Chang, M.-H., Ni, Y.-H., Chen, H.-L., and Cheng, C.-C. (2007). *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in children with chronic constipation. *Pediatr. Int.* *49*, 485–490.
- Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T., and Klaenhammer, T.R. (2005). Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 8344–8351.
- Burberry, A., Zeng, M.Y., Ding, L., Wicks, I., Inohara, N., Morrison, S.J., and Núñez, G. (2014). Infection Mobilizes Hematopoietic Stem Cells through Cooperative NOD-like Receptor and Toll-like Receptor Signaling. *Cell Host Microbe* *15*, 779–791.
- Cai, S., Kandasamy, M., Rahmat, J.N., Tham, S.M., Bay, B.H., Lee, Y.K., and Mahendran, R. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG Activation of Dendritic Cells and Neutrophils Depends on the Dose and Time of Exposure. *J. Immunol. Res.* *2016*, 7402760.
- Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., and Wucherpfennig, K.W. (2002). The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-CD3 Complex. *Cell* *111*, 967–979.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Severi, C., and Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol.* *28*, 203.
- Cardoso, M.S., Reis-Cunha, J.L., and Bartholomeu, D.C. (2016). Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front. Immunol.* *6*.
- Cartwright, C.P., Lembke, B.D., Ramachandran, K., Body, B.A., Nye, M.B., Rivers, C.A., and Schwebke, J.R. (2012). Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 2321–2329.
- Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., and Núñez, G. (2014). NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease. *Immunity* *41*, 898–908.
- Cauci, S., Guaschino, S., Aloysio, D. de, Driussi, S., Santo, D.D., Penacchioni, P., and Quadrifoglio, F. (2003). Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1 β and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol. Hum. Reprod.* *9*, 53–58.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., and Banchereau, J. (1997). CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor α : II. Functional analysis. *Blood* *90*, 1458–1470.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* *5*, 919–923.

- de Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., and Forestier, C. (2003). Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 1270–1273.
- Chang, V.T., Fernandes, R.A., Ganzinger, K.A., Lee, S.F., Siebold, C., McColl, J., Jönsson, P., Palayret, M., Harlos, K., Coles, C.H., et al. (2016). Initiation of T cell signaling by CD45 segregation at “close contacts.” *Nat. Immunol.* *17*, 574–582.
- Charbonnier, A.-S., Kohrgruber, N., Kriehuber, E., Stingl, G., Rot, A., and Maurer, D. (1999). Macrophage Inflammatory Protein 3 α Is Involved in the Constitutive Trafficking of Epidermal Langerhans Cells. *J. Exp. Med.* *190*, 1755–1768.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., and Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* *131*, 30–39.
- Chaturvedi, A., and Pierce, S.K. (2009). How location governs Toll like receptor signaling. *Traffic Cph. Den.* *10*, 621–628.
- Chehoud, C., Stieh, D.J., Bailey, A.G., Laughlin, A.L., Allen, S.A., McCotter, K.L., Sherrill-Mix, S.A., Hope, T.J., and Bushman, F.D. (2017). Associations of the vaginal microbiota with HIV infection, bacterial vaginosis and demographic factors. *AIDS Lond. Engl.*
- Chen, J., Cai, W., and Feng, Y. (2007). Development of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in breast-fed neonates. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* *26*, 559–566.
- Cherpes, T.L., Meyn, L.A., Krohn, M.A., Lurie, J.G., and Hillier, S.L. (2003). Association between Acquisition of Herpes Simplex Virus Type 2 in Women and Bacterial Vaginosis. *Clin. Infect. Dis.* *37*, 319–325.
- Cho, J.-H., Kim, H.-O., Ju, Y.-J., Kye, Y.-C., Lee, G.-W., Lee, S.-W., Yun, C.-H., Bottini, N., Webster, K., Goodnow, C.C., et al. (2016). CD45-mediated control of TCR tuning in naïve and memory CD8(+) T cells. *Nat. Commun.* *7*, 13373.
- Christensen, H.R., Frøkiaer, H., and Pestka, J.J. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *168*, 171–178.
- Cianci, A., and Cicinelli, E. (2016). Observational Prospective Clinical Study on *Lactobacillus plantarum* in Women with Bacterial Vaginosis/Vaginitis. *J. Womens Health Issues Care* *05*.
- Ciorba, M.A., Riehl, T.E., Rao, M.S., Moon, C., Ee, X., Nava, G.M., Walker, M.R., Marinshaw, J.M., Stappenbeck, T.S., and Stenson, W.F. (2012). *Lactobacillus* probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. *Gut* *61*, 829–838.
- Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* *135*, 37–48.
- Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G., and Quigley, E.M. (2012). Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome – focus on lactic acid bacteria. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *35*, 403–413.
- Cohen, C.R., Duerr, A., Pruithithada, N., Ruggao, S., Hillier, S., Garcia, P., and Nelson, K. (1995). Bacterial vaginosis and HIV seroprevalence among female commercial sex workers in Chiang Mai, Thailand. *AIDS Lond. Engl.* *9*, 1093–1097.

- Cohen, C.R., Lingappa, J.R., Baeten, J.M., Ngayo, M.O., Spiegel, C.A., Hong, T., Donnell, D., Celum, C., Kapiga, S., Delany, S., et al. (2012). Bacterial Vaginosis Associated with Increased Risk of Female-to-Male HIV-1 Transmission: A Prospective Cohort Analysis among African Couples. *PLOS Med* 9, e1001251.
- Collado, M.C., Gueimonde, M., Herná'ndez, M., Sanz, Y., and Salminen, S. (2005). Adhesion of Selected Bifidobacterium Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. *J. Food Prot.* 68, 2672–2678.
- Collin, M., and Milne, P. (2016). Langerhans cell origin and regulation: *Curr. Opin. Hematol.* 23, 28–35.
- Collins, S.M., Surette, M., and Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 735–742.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.
- Collison, L.W., Pillai, M.R., Chaturvedi, V., and Vignali, D.A.A. (2009). Regulatory T Cell Suppression Is Potentiated by Target T Cells in a Cell Contact, IL-35- and IL-10-Dependent Manner. *J. Immunol.* 182, 6121–6128.
- Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomin, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., et al. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* 11, 1093–1101.
- Collison, L.W., Delgoffe, G.M., Guy, C.S., Vignali, K.M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A.R., Garcia, K.C., Hunter, C.A., Drake, C.G., et al. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat. Immunol.* 13, 290–299.
- Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N., and Cresci, A. (2014). In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®) , *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYN BIO(®) against pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 117, 518–527.
- Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Caspani, M., Mondello, F., and Cresci, A. (2015). In vitro evaluation on HeLa cells of protective mechanisms of probiotic lactobacilli against *Candida* clinical isolates. *J. Appl. Microbiol.* 119, 1383–1390.
- Conde, P., Rodriguez, M., van der Touw, W., Jimenez, A., Burns, M., Miller, J., Brahmachary, M., Chen, H., Boros, P., Rausell-Palamos, F., et al. (2015). DC-SIGN+ Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance. *Immunity* 42, 1143–1158.
- Conti, H.R., and Gaffen, S.L. (2010). Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect.* 12, 518–527.
- Cook, D.N., Prosser, D.M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N.A., Abbondanzo, S.J., Niu, X.-D., Chen, S.-C., Manfra, D.J., Wiekowski, M.T., et al. (2000). CCR6 Mediates Dendritic Cell Localization, Lymphocyte Homeostasis, and Immune Responses in Mucosal Tissue. *Immunity* 12, 495–503.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-β- and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764.

- Cope, A., Le Friec, G., Cardone, J., and Kemper, C. (2011). The Th1 life cycle: molecular control of IFN- γ to IL-10 switching. *Trends Immunol.* *32*, 278–286.
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarasci, V., Capone, M., Cardilicchia, E., Frosali, F., Querci, V., Angeli, R., Matucci, A., Fambrini, M., et al. (2010). Identification of a novel subset of human circulating memory CD4+ T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 222–230.e4.
- Costeloe, K., Hardy, P., Juszczak, E., Wilks, M., and Millar, M.R. (2016). Bifidobacterium breve BBG-001 in very preterm infants: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet* *387*, 649–660.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* *284*, 1318–1322.
- Coudeyras, S., Marchandin, H., Fajon, C., and Forestier, C. (2008). Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 2679–2689.
- Coudeyras, S., Jugie, G., Vermerie, M., and Forestier, C. (2009). Adhesion of Human Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to Cervical and Vaginal Cells and Interaction with Vaginosis-Associated Pathogens. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* *2008*.
- Cox, C., Watt, A.P., McKenna, J.P., and Coyle, P.V. (2016). *Mycoplasma hominis* and *Gardnerella vaginalis* display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *35*, 481–487.
- Cross, M.L., and Gill, H.S. (2001). Can Immunoregulatory Lactic Acid Bacteria Be Used as Dietary Supplements to Limit Allergies? *Int. Arch. Allergy Immunol.* *125*, 112–119.
- Cross, M.L., Ganner, A., Teilab, D., and Fray, L.M. (2004). Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *42*, 173–180.
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* *41*, 529–542.
- Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 701–712.
- Cuello-Garcia, C.A., Brożek, J.L., Fiocchi, A., Pawankar, R., Yepes-Nuñez, J.J., Terracciano, L., Gandhi, S., Agarwal, A., Zhang, Y., and Schünemann, H.J. (2015). Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Allergy Clin. Immunol.* *136*, 952–961.
- Cu-Uvin, S., Hogan, J.W., Caliendo, A.M., Harwell, J., Mayer, K.H., and Carpenter, C.C.J. (2001). Association between Bacterial Vaginosis and Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in the Female Genital Tract. *Clin. Infect. Dis.* *33*, 894–896.
- Dai, C., Zhao, D.-H., and Jiang, M. (2012). VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier in vivo and in vitro via the p38 and ERK signaling pathways. *Int. J. Mol. Med.* *29*, 202–208.
- Dapoigny, M., Piche, T., Ducrotte, P., Linaud, B., Cardot, J.-M., and Bernalier-Donadille, A. (2012). Efficacy and safety profile of LCR35 complete freeze-dried culture in irritable bowel syndrome: A randomized, double-blind study. *World J. Gastroenterol. WJG* *18*, 2067–2075.

- Darbaky, Y., Evrard, B., Patrier, S., Falenta, J., Garcin, S., Tridon, A., Dapoigny, M., Silberberg, C., Niveliez, A., and Diop, L. (2016). Oral probiotic treatment of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35[®] prevents visceral hypersensitivity to a colonic inflammation and an acute psychological stress. *J. Appl. Microbiol.*
- Dauer, M., Obermaier, B., Hertel, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S., and Eigler, A. (2003). Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. *J. Immunol.* *170*, 4069–4076.
- Davis, S.J., and van der Merwe, P.A. (1996). The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol. Today* *17*, 177–187.
- Davis, S.J., and van der Merwe, P.A. (2006). The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat. Immunol.* *7*, 803–809.
- De Backer, E., Verhelst, R., Verstraelen, H., Claeys, G., Verschraegen, G., Temmerman, M., and Vanechoutte, M. (2006). Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*. *BMC Infect. Dis.* *6*, 51.
- de Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., and Forestier, C. (2003). Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *J Clin Microbiol.* *41*, 1270-1273.
- De Roock, S., van Elk, M., van Dijk, M.E.A., Timmerman, H.M., Rijkers, G.T.B., Prakken, J., Hoekstra M.O., and de Kleer, I.M. (2010). Lactic acid bacteria differ in their ability to induce functional regulatory T cells in humans. *Clinical & Experimental Allergy* *40*, 103–110.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., and Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* *76*, 159–184.
- Deriu, E., Liu, J.Z., Pezeshki, M., Edwards, R.A., Ochoa, R.J., Contreras, H., Libby, S.J., Fang, F.C., and Raffatellu, M. (2013). Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella Typhimurium* Intestinal Colonization by Competing for Iron. *Cell Host Microbe* *14*, 26–37.
- Didari, T., Solki, S., Mozaffari, S., Nikfar, S., and Abdollahi, M. (2014). A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin. Drug Saf.* *13*, 227–239.
- Dieu-Nosjean, M.C., Vicari, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J. Leukoc. Biol.* *66*, 252–262.
- Dinic, J., Riehl, A., Adler, J., and Parmryd, I. (2015). The T cell receptor resides in ordered plasma membrane nanodomains that aggregate upon patching of the receptor. *Sci. Rep.* *5*, 10082.
- Dinleyici, E.C., Kara, A., Dalgic, N., Kurugol, Z., Arica, V., Metin, O., Temur, E., Turel, O., Guven, S., Yasa, O., et al. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 reduces the duration of diarrhoea, length of emergency care and hospital stay in children with acute diarrhoea. *Benef. Microbes* *6*, 415–421.
- Döderlein, A. (1892). *Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber* (BoD – Books on Demand (2012)).
- Doerflinger, S.Y., Throop, A.L., and Herbst-Kralovetz, M.M. (2014). Bacteria in the Vaginal Microbiome Alter the Innate Immune Response and Barrier Properties of the Human Vaginal Epithelia in a Species-Specific Manner. *J. Infect. Dis.* *209*, 1989–1999.
- Donders, G.G., Bosmans, E., Dekeersmaecker, A., Vereecken, A., Van Bulck, B., and Spitz, B. (2000). Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *182*, 872–878.

- Dong, J., Teng, G., Wei, T., Gao, W., and Wang, H. (2016). Methodological Quality Assessment of Meta-Analyses and Systematic Reviews of Probiotics in Inflammatory Bowel Disease and Pouchitis. *PLoS One* *11*, e0168785.
- Drakes, M., Blanchard, T., and Czinn, S. (2004). Bacterial Probiotic Modulation of Dendritic Cells. *Infect. Immun.* *72*, 3299–3309.
- Dubsky, P., Saito, H., Leogier, M., Dantin, C., Connolly, J.E., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2007). IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8+ T cells to differentiate into CTL. *Eur. J. Immunol.* *37*, 1678–1690.
- Dugast, M., Toussaint, H., Dousset, C., and Benaroch, P. (2005). AP2 Clathrin Adaptor Complex, but Not AP1, Controls the Access of the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II to Endosomes. *J. Biol. Chem.* *280*, 19656–19664.
- Duhen, T., and Campbell, D.J. (2014). IL-1 β Promotes the Differentiation of Polyfunctional Human CCR6+CXCR3+ Th1/17 Cells That Are Specific for Pathogenic and Commensal Microbes. *J. Immunol.* *193*, 120–129.
- Duluc, D., Gannevat, J., Joo, H., Ni, L., Upchurch, K., Boreham, M., Carley, M., Stecher, J., Zurawski, G., and Oh, S. (2013a). Dendritic cells and vaccine design for sexually-transmitted diseases. *Microb. Pathog.* *58*, 35–44.
- Duluc, D., Gannevat, J., Anguiano, E., Zurawski, S., Carley, M., Boreham, M., Stecher, J., Dullaers, M., Banchereau, J., and Oh, S. (2013b). Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T cell responses. *Mucosal Immunol.* *6*, 626–638.
- Duluc, D., Banchereau, R., Gannevat, J., Thompson-Snipes, L., Blanck, J.-P., Zurawski, S., Zurawski, G., Hong, S., Rossello-Urgell, J., Pascual, V., et al. (2014). Transcriptional fingerprints of antigen-presenting cell subsets in the human vaginal mucosa and skin reflect tissue-specific immune microenvironments. *Genome Med.* *6*.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., et al. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* *73*, 386s–392s.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *J. Immunol.* *165*, 6037–6046.
- Eberl, G., Di Santo, J.P., and Vivier, E. (2015). The brave new world of innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* *16*, 1–5.
- Elazab, N., Mendy, A., Gasana, J., Vieira, E.R., Quizon, A., and Forno, E. (2013). Probiotic Administration in Early Life, Atopy, and Asthma: A Meta-analysis of Clinical Trials. *Pediatrics* *132*, e666–e676.
- Eriksson, K., Carlsson, B., Forsum, U., and Larsson, P.-G. (2005). A double-blind treatment study of bacterial vaginosis with normal vaginal lactobacilli after an open treatment with vaginal clindamycin ovules. *Acta Derm. Venereol.* *85*, 42–46.
- Eslami, S., Hadjati, J., Motevaseli, E., Mirzaei, R., Farashi Bonab, S., Ansaripour, B., and Khoramizadeh, M.R. (2016). *Lactobacillus crispatus* strain SJ-3C-US induces human dendritic cells (DCs) maturation and confers an anti-inflammatory phenotype to DCs. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *124*, 697–710.

- Estrada-Capetillo, L., Hernández-Castro, B., Monsiváis-Urenda, A., Alvarez-Quiroga, C., Layseca-Espinosa, E., Abud-Mendoza, C., Baranda, L., Urzainqui, A., Sánchez-Madrid, F., and González-Amaro, R. (2013). Induction of Th17 lymphocytes and Treg cells by monocyte-derived dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*, 584303.
- Etzler, M.E., Surolija, A., and Cummings, R.D. (2009). L-type Lectins. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
- Eun, S.-H., Lim, S.-M., Jang, S.-E., Han, M.J., and Kim, D.-H. (2016). *Lactobacillus sakei* K17, an inducer of IL-10 expression in antigen-presenting cells, attenuates TNBS-induced colitis in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1–8.
- Evrard, B., Balestrino, D., Dosgilbert, A., Bouya-Gachancard J.L.J., Charbonnel, N., Forestier, C., and Tridon, A. (2010). Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect immun.* *78*, 210-219.
- Evrard, B., Coudeyras, S., Dosgilbert, A., Charbonnel, N., Alamé, J., Tridon, A., and Forestier, C. (2011). Dose-Dependent Immunomodulation of Human Dendritic Cells by the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS ONE* *6*, e18735.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.*
- Falagas, M.E., Betsi, G.I., and Athanasiou, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* *13*, 657–664.
- Fang, H.-W., Fang, S.-B., Chiang Chiau, J.-S., Yeung, C.-Y., Chan, W.-T., Jiang, C.-B., Cheng, M.-L., and Lee, H.-C. (2010). Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* on *Salmonella* lipopolysaccharide-induced inflammation and epithelial barrier dysfunction in a co-culture model using Caco-2/peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Microbiol.* *59*, 573–579.
- Fang, S.-B., Lee, H.-C., Hu, J.-J., Hou, S.-Y., Liu, H.-L., and Fang, H.-W. (2009). Dose-dependent effect of *Lactobacillus rhamnosus* on quantitative reduction of faecal rotavirus shedding in children. *J. Trop. Pediatr.* *55*, 297–301.
- Fanibunda, S.E., Modi, D.N., Gokral, J.S., and Bandivdekar, A.H. (2011). HIV gp120 Binds to Mannose Receptor on Vaginal Epithelial Cells and Induces Production of Matrix Metalloproteinases. *PLoS ONE* *6*, e28014.
- Farache, J., Koren, I., Milo, I., Gurevich, I., Kim, K.-W., Zigmund, E., Furtado, G.C., Lira, S.A., and Shakhar, G. (2013). Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation. *Immunity* *38*, 581–595.
- Farr, A., Kiss, H., Hagmann, M., Machal, S., Holzer, I., Kueronya, V., Husslein, P.W., and Petricevic, L. (2015). Role of *Lactobacillus* Species in the Intermediate Vaginal Flora in Early Pregnancy: A Retrospective Cohort Study. *PLoS ONE* *10*, e0144181.
- Farrar, J.D., Asnagli, H., and Murphy, K.M. (2002). T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J. Clin. Invest.* *109*, 431–435.
- Fayard, E., Moncayo, G., Hemmings, B.A., and Holländer, G.A. (2010). Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Thymocytes: The Need for Stringent Control. *Sci Signal* *3*, re5-re5.

- Fazeli, A., Bruce, C., and Anumba, D.O. (2005). Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum. Reprod.* *20*, 1372–1378.
- Feili-Hariri, M., Falkner, D.H., and Morel, P.A. (2005). Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* *78*, 656–664.
- Fernandez, E.M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I.G., and Grangette, C. (2011). Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* *gut.2010.232918*.
- Fernández-Carrocerá, L.A., Solís-Herrera, A., Cabanillas-Ayón, M., Gallardo-Sarmiento, R.B., García-Pérez, C.S., Montaña-Rodríguez, R., and Echániz-Aviles, M.O.L. (2013). Double-blind, randomised clinical assay to evaluate the efficacy of probiotics in preterm newborns weighing less than 1500 g in the prevention of necrotising enterocolitis. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* *98*, F5–F9.
- Ferris, M.J., Maszta, A., Aldridge, K.E., Fortenberry, J.D., Fidel, P.L., and Martin, D.H. (2004). Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect. Dis.* *4*, 5.
- Fethers, K.A., Fairley, C.K., Hocking, J.S., Gurrin, L.C., and Bradshaw, C.S. (2008). Sexual Risk Factors and Bacterial Vaginosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Infect. Dis.* *47*, 1426–1435.
- Fichorova, R.N., Buck, O.R., Yamamoto, H.S., Fashemi, T., Dawood, H.Y., Fashemi, B., Hayes, G.R., Beach, D.H., Takagi, Y., Delaney, M.L., et al. (2013). The Villain Team-Up or how *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis alter innate immunity in concert. *Sex. Transm. Infect.* *89*, 460–466.
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *11*, 4745–4767.
- Finamore, A., Roselli, M., Imbinto, A., Seeboth, J., Oswald, I.P., and Mengheri, E. (2014). *Lactobacillus amylovorus* Inhibits the TLR4 Inflammatory Signaling Triggered by Enterotoxigenic *Escherichia coli* via Modulation of the Negative Regulators and Involvement of TLR2 in Intestinal Caco-2 Cells and Pig Explants. *PLOS ONE* *9*, e94891.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B., and Svanborg, C. (2006). Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur. J. Immunol.* *36*, 267–277.
- Flacher, V., Bouschbacher, M., Verronèse, E., Massacrier, C., Sisirak, V., Berthier-Vergnes, O., Saint-Vis, B. de, Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Lebecque, S., et al. (2006). Human Langerhans Cells Express a Specific TLR Profile and Differentially Respond to Viruses and Gram-Positive Bacteria. *J. Immunol.* *177*, 7959–7967.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science* *311*, 83–87.
- Foligne, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., Ben Younes, A., Chareyre, F., Sirard, J.-C., Pot, B., and Grangette, C. (2007). A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality. *PLoS ONE* *2*, e313.
- Fong, F.L.Y., Kirjavainen, P., Wong, V.H.Y., and El-Nezami, H. (2015). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on dendritic cells, macrophages and monocytes from healthy donors. *J. Funct. Foods* *13*, 71–79.

- Fong, F.L.Y., Kirjavainen, P.V., and El-Nezami, H. (2016). Immunomodulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)-derived soluble factors on antigen-presenting cells of healthy blood donors. *Sci. Rep.* 6.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., and Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 152, 167–173.
- Forestier, C., Guelon, D., Cluytens, V., Gillart, T., Sirot, J., and De Champs, C. (2008). Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 12, R69.
- Forsythe, P., Inman, M.D., and Bienenstock, J. (2007). Oral Treatment with Live *Lactobacillus reuteri* Inhibits the Allergic Airway Response in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 561–569.
- Foster, J.A., and McVey Neufeld, K.-A. (2013). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 36, 305–312.
- Francis, S.C., Looker, C., Vandepitte, J., Bukenya, J., Mayanja, Y., Nakubulwa, S., Hughes, P., Hayes, R.J., Weiss, H.A., and Grosskurth, H. (2015). Bacterial vaginosis among women at high risk for HIV in Uganda: high rate of recurrent diagnosis despite treatment. *Sex Transm Infect* sextrans-2015-052160.
- Fredricks, D.N., Fiedler, T.L., and Marrazzo, J.M. (2005). Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 353, 1899–1911.
- Fujita, H. (2013). The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J. Dermatol. Sci.* 72, 3–8.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., and Forstner, J.F. (1999). Purification and characterization of a novel protein produced by *Bifidobacterium longum* SBT2928 that inhibits the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 (CFA/II) to ganglioside GM1. *J. Appl. Microbiol.* 86, 615–621.
- Furusawa, Y., Obata, Y., and Hase, K. (2015). Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut. *Semin. Immunopathol.* 37, 17–25.
- Gallo, M.F., Macaluso, M., Warner, L., Fleenor, M.E., Hook III, E.W., Brill, I., and Weaver, M.A. (2012). Bacterial Vaginosis, Gonorrhea, and Chlamydial Infection Among Women Attending a Sexually Transmitted Disease Clinic: A Longitudinal Analysis of Possible Causal Links. *Ann. Epidemiol.* 22, 213–220.
- Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E.J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D., Weiner, H.L., and Quintana, F.J. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 11, 846–853.
- Gao, G.F., Rao, Z., and Bell, J.I. (2002). Molecular coordination of $\alpha\beta$ T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol.* 23, 408–413.
- Gao, X.W., Mubasher, M., Fang, C.Y., Reifer, C., and Miller, L.E. (2010). Dose–Response Efficacy of a Proprietary Probiotic Formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for Antibiotic-Associated Diarrhea and *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea Prophylaxis in Adult Patients. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1636–1641.
- Gardner, H.L., and Dukes, C.D. (1955). *Haemophilus vaginalis* Vaginitis. A Newly Defined Specific Infection previously classified “Nonspecific” Vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 69, 962–976.

- Garg, K.B., Ganguli, I., Das, R., and Talwar, G.P. (2009). Spectrum of Lactobacillus species present in healthy vagina of Indian women. *Indian J. Med. Res.* *129*, 652–657.
- Geginat, J., Paroni, M., Kastirr, I., Larghi, P., Pagani, M., and Abrignani, S. (2016). Reverse plasticity: TGF- β and IL-6 induce Th1-to-Th17-cell transdifferentiation in the gut. *Eur. J. Immunol.* *46*, 2306–2310.
- Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 465–479.
- Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2016). C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 433–448.
- Genc, M.R., Delaney, M.L., Onderdonk, A.B., Witkin, S.S., and the Microbiology and Prematurity (MAP) Study Group (2006). Vaginal Nitric Oxide in Pregnant Women with Bacterial Vaginosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* *56*, 86–90.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., and Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* *15*.
- Genot, E., and Cantrell, D.A. (2000). Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 289–294.
- Gerosa, F., Paganin, C., Peritt, D., Paiola, F., Scupoli, M.T., Aste-Amezaga, M., Frank, I., and Trinchieri, G. (1996). Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J. Exp. Med.* *183*, 2559–2569.
- Gershon, R.K., Wallis, V., Davies, A.J., and Leuchars, E. (1968). Inactivation of thymus cells after multiple injections of antigen. *Nature* *218*, 380–381.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., Rijt, L.S. van, Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., et al. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b⁻ but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *205*, 1621–1634.
- Ghadimi, D., Fölster-Holst, R., de Vrese, M., Winkler, P., Heller, K.J., and Schrezenmeir, J. (2008). Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology* *213*, 677–692.
- Ghadimi, D., Vrese, M. de, Heller, K.J., and Schrezenmeir, J. (2010). Effect of natural commensal-origin DNA on toll-like receptor 9 (TLR9) signaling cascade, chemokine IL-8 expression, and barrier integrity of polarized intestinal epithelial cells. *Inflamm. Bowel Dis.* *16*, 410–427.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., et al. (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* *467*, 967–971.
- Gilbert, N.M., Lewis, W.G., and Lewis, A.L. (2013). Clinical Features of Bacterial Vaginosis in a Murine Model of Vaginal Infection with Gardnerella vaginalis. *PLoS ONE* *8*.
- Gill, H.S., Rutherford, K.J., and Cross, M.L. (2001). Dietary Probiotic Supplementation Enhances Natural Killer Cell Activity in the Elderly: An Investigation of Age-Related Immunological Changes. *J. Clin. Immunol.* *21*, 264–271.

Gille, C., Böer, B., Marschal, M., Urschitz, M.S., Heinecke, V., Hund, V., Speidel, S., Tarnow, I., Mylonas, I., Franz, A., et al. (2016). Effect of probiotics on vaginal health in pregnancy. EFFPRO, a randomized controlled trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.*

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 594–606.

Gilliland, L.K., Schieven, G.L., Norris, N.A., Kanner, S.B., Aruffo, A., and Ledbetter, J.A. (1992). Lymphocyte lineage-restricted tyrosine-phosphorylated proteins that bind PLC gamma 1 SH2 domains. *J. Biol. Chem.* *267*, 13610–13616.

Gillor, O., Nigro, L.M., and Riley, M.A. (2005). Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.* *11*, 1067–1075.

Giraldo, P., Neuer, A., Ribeiro-Filho, A., Linhares, I., and Witkin, S.S. (1999). Detection of the human 70-kD and 60-kD heat shock proteins in the vagina: relation to microbial flora, vaginal pH, and method of contraception. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* *7*, 23–25.

Gittler, J.K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K.J., Wang, C.Q.F., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J.G., et al. (2012). Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 1344–1354.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* *150*, 4244–4252.

Gol-Ara, M., Jadidi-Niaragh, F., Sadria, R., Azizi, G., and Mirshafiey, A. (2012). The Role of Different Subsets of Regulatory T Cells in Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis* *2012*, e805875.

Goldberg, R., Prescott, N., Lord, G.M., MacDonald, T.T., and Powell, N. (2015). The unusual suspects—innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 271–283.

Gonçalves, P., and Martel, F. (2013). Butyrate and colorectal cancer: the role of butyrate transport. *Curr. Drug Metab.* *14*, 994–1008.

Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 1783–1786.

Gore, C., Custovic, A., Tannock, G.W., Munro, K., Kerry, G., Johnson, K., Peterson, C., Morris, J., Chaloner, C., Murray, C.S., et al. (2012). Treatment and secondary prevention effects of the probiotics *Lactobacillus paracasei* or *Bifidobacterium lactis* on early infant eczema: randomized controlled trial with follow-up until age 3 years. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *42*, 112–122.

Goto, Y., Panea, C., Nakato, G., Cebula, A., Lee, C., Diez, M.G., Laufer, T.M., Ignatowicz, L., and Ivanov, I.I. (2014). Segmented Filamentous Bacteria Antigens Presented by Intestinal Dendritic Cells Drive Mucosal Th17 Cell Differentiation. *Immunity* *40*, 594–607.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Oral Tolerance. *Immunity* *29*, 464–475.

- Grabig, A., Paclik, D., Guzy, C., Dankof, A., Baumgart, D.C., Erckenbrecht, J., Raupach, B., Sonnenborn, U., Eckert, J., Schumann, R.R., et al. (2006). *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 Ameliorates Experimental Colitis via Toll-Like Receptor 2- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathways. *Infect. Immun.* *74*, 4075–4082.
- Graf, B., Bushnell, T., and Miller, J. (2007). LFA-1-Mediated T Cell Costimulation through Increased Localization of TCR/Class II Complexes to the Central Supramolecular Activation Cluster and Exclusion of CD45 from the Immunological Synapse. *J. Immunol.* *179*, 1616–1624.
- Greaves, D.R., Wang, W., Dairaghi, D.J., Dieu, M.C., Saint-Vis, B. de, Franz-Bacon, K., Rossi, D., Caux, C., McClanahan, T., Gordon, S., et al. (1997). CCR6, a CC Chemokine Receptor that Interacts with Macrophage Inflammatory Protein 3 α and Is Highly Expressed in Human Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* *186*, 837–844.
- Greaves, W.L., Chungafung, J., Morris, B., Haile, A., and Townsend, J.L. (1988). Clindamycin versus metronidazole in the treatment of bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* *72*, 799–802.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 Family Revisited. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 515–548.
- Greenwood, J.R., and Pickett, M.J. (1980). Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a New Genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *30*, 170–178.
- Grewal, I.S., and Flavell, R.A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 111–135.
- Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* *26*, 605–616.
- Gringhuis, S.I., Kaptein, T.M., Wevers, B.A., Mesman, A.W., and Geijtenbeek, T.B.H. (2014). Fucose-specific DC-SIGN signalling directs T helper cell type-2 responses via IKK ϵ - and CYLD-dependent Bcl3 activation. *Nat. Commun.* *5*.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* *104*, 2840–2848.
- Grozdanov, L., Zähringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y.A., Schombel, U., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., et al. (2002). A Single Nucleotide Exchange in the *wzy* Gene Is Responsible for the Semirough O6 Lipopolysaccharide Phenotype and Serum Sensitivity of *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* *184*, 5912–5925.
- Guarino, A., Guandalini, S., and Lo Vecchio, A. (2015). Probiotics for Prevention and Treatment of Diarrhea. *J. Clin. Gastroenterol.* *49 Suppl 1*, S37-45.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 621–667.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578.

Hallén, A., Jarstrand, C., and Pålson, C. (1992). Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. *Sex. Transm. Dis.* *19*, 146–148.

Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., et al. (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 3360–3365.

Hamann, J., Koning, N., Pouwels, W., Ulfman, L.H., van Eijk, M., Stacey, M., Lin, H.-H., Gordon, S., and Kwakkenbos, M.J. (2007). EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur. J. Immunol.* *37*, 2797–2802.

Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., et al. (2013). Safety and Tumor Responses with Lembroizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *369*, 134–144.

Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* *43*, 29–40.

Harada, Y., Tokushima, M., Matsumoto, Y., Ogawa, S., Otsuka, M., Hayashi, K., Weiss, B.D., June, C.H., and Abe, R. (2001). Critical Requirement for the Membrane-Proximal Cytosolic Tyrosine Residue for CD28-Mediated Costimulation In Vivo. *J. Immunol.* *166*, 3797–3803.

Harden, J.L., Krueger, J.G., and Bowcock, A.M. (2015). The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* *64*, 66–73.

Häringer, B., Lozza, L., Steckel, B., and Geginat, J. (2009). Identification and characterization of IL-10/IFN- γ -producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *J. Exp. Med.* *206*, 1009–1017.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* *6*, 1123–1132.

Hart, A.L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, M.A., Knight, S.C., and Stagg, A.J. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* *53*, 1602–1609.

Harwich, M.D., Alves, J.M., Buck, G.A., Strauss, J.F., Patterson, J.L., Oki, A.T., Girerd, P.H., and Jefferson, K.K. (2010). Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. *BMC Genomics* *11*, 375.

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. f., Diep, D. b., and Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* *113*, 723–736.

Hawes, S.E., Hillier, S.L., Benedetti, J., Stevens, C.E., Koutsky, L.A., Wølner-Hanssen, P., and Holmes, K.K. (1996). Hydrogen Peroxide—Producing Lactobacilli and Acquisition of Vaginal Infections. *J. Infect. Dis.* *174*, 1058–1063.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099–1103.

Hayes, S.R., and Vargas, A.J. (2016). Probiotics for the Prevention of Pediatric Antibiotic-Associated Diarrhea. *Explore N. Y. N* 12, 463–466.

Heczko, P.B., Tomusiak, A., Adamski, P., Jakimiuk, A.J., Stefański, G., Mikołajczyk-Cichońska, A., Suda-Szczurek, M., and Strus, M. (2015). Supplementation of standard antibiotic therapy with oral probiotics for bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Womens Health* 15, 115.

Hellberg, D., Nilsson, S., and Mårdh, P.-A. (2000). Bacterial vaginosis and smoking. *Int. J. STD AIDS* 11, 603–606.

Helwig, U., Lammers, K.M., Rizzello, F., Brigidi, P., Rohleder, V., Caramelli, E., Gionchetti, P., Schrezenmeir, J., Foelsch, U.R., Schreiber, S., et al. (2006). Lactobacilli, bifidobacteria and *E. coli* nisse induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J. Gastroenterol. WJG* 12, 5978.

Hemarajata, P., and Versalovic, J. (2012). Effects of probiotics on gut microbiota : mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 1756283X12459294.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.

Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2013). Human blood cDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol.* 93, 599–609.

Hepworth, M.R., Monticelli, L.A., Fung, T.C., Ziegler, C.G.K., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A.R., Ma, H.-L., Crawford, A., Angelosanto, J.M., et al. (2013). Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 498, 113–117.

Hickey, D.K., Patel, M.V., Fahey, J.V., and Wira, C.R. (2011). Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J. Reprod. Immunol.* 88, 185–194.

Hickson, M., D'Souza, A.L., Muthu, N., Rogers, T.R., Want, S., Rajkumar, C., and Bulpitt, C.J. (2007). Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 335, 80.

Hilbert, D.W., Smith, W.L., Chadwick, S.G., Toner, G., Mordechai, E., Adelson, M.E., Sobel, J.D., and Gygas, S.E. (2016). Development and validation of a highly accurate quantitative real-time PCR assay for the diagnosis of bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol. JCM*.03104-15.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). *Batf3* Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* 322, 1097–1100.

Hirano, J., Yoshida, T., Sugiyama, T., Koide, N., Mori, I., and Yokochi, T. (2003). The Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection of Human Intestinal Cells In Vitro. *Microbiol. Immunol.* 47, 405–409.

Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2006). Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 696–702.

- Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquín, C., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2008). Supernatant from *Bifidobacterium* Differentially Modulates Transduction Signaling Pathways for Biological Functions of Human Dendritic Cells. *PLoS ONE* 3.
- Hofmann, M.W., Höning, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., Figura, K. von, and Bakke, O. (1999). The Leucine-based Sorting Motifs in the Cytoplasmic Domain of the Invariant Chain Are Recognized by the Clathrin Adaptors AP1 and AP2 and their Medium Chains. *J. Biol. Chem.* 274, 36153–36158.
- Honey, K., and Rudensky, A.Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 472–482.
- Hong, Y.-F., Kim, H., Kim, H.R., Gim, M.G., and Chung, D.K. (2014). Different immune regulatory potential of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1629–1635.
- Hosoya, T., Sakai, F., Yamashita, M., Shiozaki, T., Endo, T., Ukibe, K., Uenishi, H., Kadooka, Y., Moriya, T., Nakagawa, H., et al. (2014). *Lactobacillus helveticus* SBT2171 Inhibits Lymphocyte Proliferation by Regulation of the JNK Signaling Pathway. *PLOS ONE* 9, e108360.
- Hsing, L.C., and Rudensky, A.Y. (2005). The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 207, 229–241.
- Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., and Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of Interleukin-17A for Systemic Anti-*Candida albicans* Host Defense in Mice. *J. Infect. Dis.* 190, 624–631.
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tüttenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Antigen Present. Cell Biol.* 4, 82.
- Hulston, C.J., Churnside, A.A., and Venables, M.C. (2015). Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects. *Br. J. Nutr.* 113, 596–602.
- Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 973–983.
- Hussain, S.S., and Bloom, S.R. (2013). The regulation of food intake by the gut-brain axis: implications for obesity. *Int. J. Obes.* 37, 625–633.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczek, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263–266.
- Hymes, S.R., Randis, T.M., Sun, T.Y., and Ratner, A.J. (2013). DNase Inhibits *Gardnerella vaginalis* Biofilms In Vitro and In Vivo. *J. Infect. Dis.* 207, 1491–1497.
- Iijima, N., Linehan, M.M., Saeland, S., and Iwasaki, A. (2007). Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19061–19066.
- Iijima, N., Mattei, L.M., and Iwasaki, A. (2011). Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 284–289.
- Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., and Kamradt, T. (2000). Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells. *J. Immunol.* 165, 6107–6115.

- Inohara, N., Koseki, T., Peso, L. del, Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., et al. (1999). Nod1, an Apaf-1-like Activator of Caspase-9 and Nuclear Factor- κ B. *J. Biol. Chem.* *274*, 14560–14567.
- Isakov, N., and Altman, A. (2002). PROTEIN KINASE C θ IN T CELL ACTIVATION. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 761–794.
- Isaković, K., Smith, S.B., and Waksman, B.H. (1965). ROLE OF THE THYMUS IN TOLERANCE. *J. Exp. Med.* *122*, 1103–1123.
- Ito, M., Nakashima, A., Hidaka, T., Okabe, M., Bac, N.D., Ina, S., Yoneda, S., Shiozaki, A., Sumi, S., Tsuneyama, K., et al. (2010). A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour. *J. Reprod. Immunol.* *84*, 75–85.
- Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X.-F., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med.* *202*, 1213–1223.
- Ito, T., Wang, Y.-H., and Liu, Y.-J. (2005). Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immun.* *26*, 221–229.
- Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O.A., Gilliet, M., Qin, F.X.-F., and Liu, Y.-J. (2006). OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 13138–13143.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.-H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* *204*, 105–115.
- Ivanov, I.I., and Manel, N. (2010). Les bactéries filamenteuses segmentées induisent les cellules Th17 dans l'intestin. *Med. Sci. MS* *26*, 352–355.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
- Jabeen, R., and Kaplan, M.H. (2012). The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 303–307.
- Jacobs, S.E., Tobin, J.M., Opie, G.F., Donath, S., Tabrizi, S.N., Pirotta, M., Morley, C.J., and Garland, S.M. (2013). Probiotic Effects on Late-onset Sepsis in Very Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial. *Pediatrics* *132*, 1055–1062.
- Janeway, C.A. (1989). Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54*, 1–13.
- Jang, S.-O., Kim, H.-J., Kim, Y.-J., Kang, M.-J., Kwon, J.-W., Seo, J.-H., Kim, H.Y., Kim, B.-J., Yu, J., and Hong, S.-J. (2012). Asthma Prevention by *Lactobacillus Rhamnosus* in a Mouse Model is Associated With CD4+CD25+Foxp3+ T Cells. *Allergy Asthma Immunol. Res.* *4*, 150–156.
- Jeffery, I.B., O'Toole, P.W., Öhman, L., Claesson, M.J., Deane, J., Quigley, E.M.M., and Simrén, M. (2012). An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* *61*, 997–1006.

- Jensen, H., Roos, S., Jonsson, H., Rud, I., Grimmer, S., van Pijkeren, J.-P., Britton, R.A., and Axelsson, L. (2014). Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiology* *160*, 671–681.
- Jeon, B., Kim, H.R., Kim, H., and Chung, D.K. (2016). In vitro and in vivo downregulation of C3 by lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* K8 suppressed cytokine-mediated complement system activation. *FEMS Microbiol. Lett.* fnw140.
- Jo, S.-G., Noh, E.-J., Lee, J.-Y., Kim, G., Choi, J.-H., Lee, M.-E., Song, J.-H., Chang, J.-Y., and Park, J.-H. (2016). *Lactobacillus curvatus* WiKim38 isolated from kimchi induces IL-10 production in dendritic cells and alleviates DSS-induced colitis in mice. *J. Microbiol. Seoul Korea* *54*, 503–509.
- Johansson, M.A., Björkander, S., Mata Forsberg, M., Qazi, K.R., Salvany Celades, M., Bittmann, J., Eberl, M., and Sverremark-Ekström, E. (2016). Probiotic *Lactobacilli* Modulate *Staphylococcus aureus*-Induced Activation of Conventional and Unconventional T cells and NK Cells. *Front. Immunol.* *7*.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* *207*, 1247–1260.
- Jordan, S.L., Glover, J., Malcolm, L., Thomson-Carter, F.M., Booth, I.R., and Park, S.F. (1999). Augmentation of Killing of *Escherichia coli* O157 by Combinations of Lactate, Ethanol, and Low-pH Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 1308–1311.
- Jores, R., Alzari, P.M., and Meo, T. (1990). Resolution of hypervariable regions in T-cell receptor beta chains by a modified Wu-Kabat index of amino acid diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 9138–9142.
- Josey, W.E., and Schwebke, J.R. (2008). The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment. *Int. J. STD AIDS* *19*, 152–154.
- June, C.H., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S., and Thompson, C.B. (1990). Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* *11*, 211–216.
- Jung, J.-Y., Shin, J.-S., Lee, S.-G., Rhee, Y.K., Cho, C.-W., Hong, H.-D., and Lee, K.-T. (2015). *Lactobacillus sakei* K040706 evokes immunostimulatory effects on macrophages through TLR 2-mediated activation. *Int. Immunopharmacol.* *28*, 88–96.
- Kabashima, K., Shiraishi, N., Sugita, K., Mori, T., Onoue, A., Kobayashi, M., Sakabe, J., Yoshiki, R., Tamamura, H., Fujii, N., et al. (2007). CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells. *Am. J. Pathol.* *171*, 1249–1257.
- Kabouridis, P.S., Magee, A.I., and Ley, S.C. (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J.* *16*, 4983–4998.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., and Isolauri, E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* *357*, 1076–1079.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., and Isolauri, E. (2003). Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* *361*, 1869–1871.

- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., and Isolauri, E. (2007). Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 1019–1021.
- Kang, Y., Cai, Y., Zhang, X., Kong, X., and Su, J. (2016). Altered gut microbiota in RA: implications for treatment. *Z. Für Rheumatol.* 1–7.
- Kang, Y.J., Kusler, B., Otsuka, M., Hughes, M., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W.-C., Akira, S., Han, J., and Jones, P.P. (2007). Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 4598–4607.
- Kanitakis, J., Morelon, E., Petruzzo, P., Badet, L., and Dubernard, J.-M. (2011). Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Exp. Dermatol.* *20*, 145–146.
- Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Mäkiyuokko, H., Rinttilä, T., Paulin, L., Corander, J., Malinen, E., Apajalahti, J., and Palva, A. (2007). The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects. *Gastroenterology* *133*, 24–33.
- Kastirr, I., Maglie, S., Paroni, M., Alfen, J.S., Nizzoli, G., Sugliano, E., Crosti, M.-C., Moro, M., Steckel, B., Steinfeldt, S., et al. (2014). IL-21 Is a Central Memory T Cell–Associated Cytokine That Inhibits the Generation of Pathogenic Th1/17 Effector Cells. *J. Immunol.* *193*, 3322–3331.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101–105.
- Kaushic, C., and Wira, C.R. (2007). IgA and Reproductive Tract Immunity. In *Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A*, P.C.S. Kaetzel, ed. (Springer US), pp. 291–320.
- Keersmaecker, S.C.J.D., Verhoeven, T.L.A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., and Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* *259*, 89–96.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 677–704.
- Kel, J.M., Girard-Madoux, M.J.H., Reizis, B., and Clausen, B.E. (2010). TGF-beta is required to maintain the pool of immature Langerhans cells in the epidermis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 3248–3255.
- Kim, M., and Kim, C.H. (2016). Colonization and effector functions of innate lymphoid cells in mucosal tissues. *Microbes Infect.* *18*, 604–614.
- Kim, H.-J., Kim, Y.-J., Kang, M.-J., Seo, J.-H., Kim, H.-Y., Jeong, S.K., Lee, S.-H., Kim, J.-M., and Hong, S.-J. (2012). A novel mouse model of atopic dermatitis with epicutaneous allergen sensitization and the effect of *Lactobacillus rhamnosus*. *Exp. Dermatol.* *21*, 672–675.
- Kim, H.-J., Kim, Y.-J., Lee, S.-H., Kang, M.-J., Yu, H.-S., Jung, Y.-H., Lee, E., Seo, J.-H., Kwon, J.-W., Kim, B.-J., et al. (2013). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on asthma with an adoptive transfer of dendritic cells in mice. *J. Appl. Microbiol.* *115*, 872–879.
- Kim, H.-J., Kim, Y.-J., Lee, S.-H., Yu, J., Jeong, S.K., and Hong, S.-J. (2014). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4+CD25+Foxp3+ Tregs. *Clin. Immunol.* *153*, 178–186.

- King, C. (2009). New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 757–766.
- King, C., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2008). T Follicular Helper (TFH) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 741–766.
- Kitajima, M., Lee, H.-C., Nakayama, T., and Ziegler, S.F. (2011). TSLP enhances the function of helper type 2 cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1862–1871.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., et al. (2008). Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells. *Immunity* *29*, 497–510.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 377–391.
- Klingenberg, C., Aarag, E., Rønnestad, A., Sollid, J.E., Abrahamsen, T.G., Kjeldsen, G., and Flaegstad, T. (2005). Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *24*, 817–822.
- Klose, C.S.N., and Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* *17*, 765–774.
- Knee, R.A., Hickey, D.K., Beagley, K.W., and Jones, R.C. (2005). Transport of IgG across the blood-luminal barrier of the male reproductive tract of the rat and the effect of estradiol administration on reabsorption of fluid and IgG by the epididymal ducts. *Biol. Reprod.* *73*, 688–694.
- Kohli, K., Janssen, A., and Förster, R. (2016). Plasmacytoid dendritic cells induce tolerance predominantly by cargoing antigen to lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* n/a-n/a.
- Kollath, W. (1953). [Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins]. *Dtsch. Zahnärztliche Z.* *8*, Suppl 7-16.
- Kolls, J.K., and Lindén, A. (2004). Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity* *21*, 467–476.
- Konieczna, P., Groeger, D., Ziegler, M., Frei, R., Ferstl, R., Shanahan, F., Quigley, E.M.M., Kiely, B., Akdis, C.A., and O'Mahony, L. (2011). Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut* *gutjnl-2011-300936*.
- Konieczna, P., Schiavi, E., Ziegler, M., Groeger, D., Healy, S., Grant, R., and O'Mahony, L. (2015). Human Dendritic Cell DC-SIGN and TLR-2 Mediate Complementary Immune Regulatory Activities in Response to Lactobacillus rhamnosus JB-1. *PLOS ONE* *10*, e0120261.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C.M., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., et al. (2008). S layer protein A of Lactobacillus acidophilus NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19474–19479.
- Kopp, M.V., and Salfeld, P. (2009). Probiotics and prevention of allergic disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *12*, 298–303.

- Kopp, M.V., Hennemuth, I., Heinzmann, A., and Urbanek, R. (2008). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Probiotics for Primary Prevention: No Clinical Effects of Lactobacillus GG Supplementation. *Pediatrics* *121*, e850–e856.
- Koritke, J.G., Gillet, J.Y., and Muller, P. (1969). La microvascularisation de la muqueuse vaginale et ses variations au cours du cycle ovarien chez la Femme. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* *99*, 37–53.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007a). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* *448*, 484–487.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., and Bettelli, E. (2007b). Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Semin. Immunol.* *19*, 362–371.
- Kosaka, A., Yan, H., Ohashi, S., Gotoh, Y., Sato, A., Tsutsui, H., Kaisho, T., Toda, T., and Tsuji, N.M. (2012). Lactococcus lactis subsp. cremoris FC triggers IFN- γ production from NK and T cells via IL-12 and IL-18. *Int. Immunopharmacol.* *14*, 729–733.
- Kovachev, S., and Dobrevski-Vacheva, R. (2013). Effect of Lactobacillus casei var rhamnosus (Gynophilus) in restoring the vaginal flora by female patients with bacterial vaginosis--randomized, open clinical trial. *Akusherstvo Ginekol.* *52 Suppl 1*, 48–53.
- Kovachev, S., and VatchevaDobrevska, R. (2016). Efficacy of Local Lactobacillus Casei Var Rhamnosus Doderlein Monotherapy for Bacterial Vaginosis. *ULUTAS Med. J.* *1*.
- Kovalenko, V.L., Voropaeva, E.E., Kozachkov, E.L., and Kozachkova, E.A. (2008). Endometrial pathomorphology in bacterial vaginosis associated with chronic endometritis. *Arkh. Patol.* *70*, 6–8.
- Kuhns, M.S., Davis, M.M., and Garcia, K.C. (2006). Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* *24*, 133–139.
- Kumar, A., Alrefai, W.A., Borthakur, A., and Dudeja, P.K. (2015). Lactobacillus acidophilus counteracts enteropathogenic E. coli-induced inhibition of butyrate uptake in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *309*, G602-607.
- Kumar, P., Monin, L., Castillo, P., Elsegeiny, W., Horne, W., Eddens, T., Vikram, A., Good, M., Schoenborn, A.A., Bibby, K., et al. (2016). Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation. *Immunity* *44*, 659–671.
- Kurtz, J., Raval, F., Vallot, C., Der, J., and Sykes, M. (2009). CTLA-4 on alloreactive CD4 T cells interacts with recipient CD80/86 to promote tolerance. *Blood* *113*, 3475–3484.
- Kwaadsteniet, M.D., Fraser, T., Reenen, C.A.V., and Dicks, L.M.T. (2006). Bacteriocin T8, a Novel Class IIa sec-Dependent Bacteriocin Produced by Enterococcus faecium T8, Isolated from Vaginal Secretions of Children Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 4761–4766.
- Kwon, H.-K., Lee, C.-G., So, J.-S., Chae, C.-S., Hwang, J.-S., Sahoo, A., Nam, J.H., Rhee, J.H., Hwang, K.-C., and Im, S.-H. (2010). Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 2159–2164.
- Lammers, K.M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., Matteuzzi, D., and Campieri, M. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *38*, 165–172.

- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* *449*, 564–569.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* *44*, 325–337.
- Larsson, C., Lindroth, M., Nordin, P., Stålhammar-Carlemalm, M., Lindahl, G., and Krantz, I. (2006). Association between low concentrations of antibodies to protein alpha and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* *91*, F403-408.
- Latvala, S., Pietilä, T.E., Veckman, V., Kekkonen, R.A., Tynkkynen, S., Korpela, R., and Julkunen, I. (2008). Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World J. Gastroenterol.* *WJG* *14*, 5570.
- Lau, C.S., and Chamberlain, R.S. (2016). Probiotics are effective at preventing *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Gen. Med.* *9*, 27–37.
- Lau, K., Benitez, P., Ardisson, A., Wilson, T.D., Collins, E.L., Lorca, G., Li, N., Sankar, D., Wasserfall, C., Neu, J., et al. (2011). Inhibition of Type 1 Diabetes Correlated to a *Lactobacillus johnsonii* N6.2-Mediated Th17 Bias. *J. Immunol.* *186*, 3538–3546.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* *26*, 371–381.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C.J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 171–184.
- Lécuyer, E., Rakotobe, S., Lengliné-Garnier, H., Lebreton, C., Picard, M., Juste, C., Fritzen, R., Eberl, G., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., et al. (2014). Segmented Filamentous Bacterium Uses Secondary and Tertiary Lymphoid Tissues to Induce Gut IgA and Specific T Helper 17 Cell Responses. *Immunity* *40*, 608–620.
- Lee, D.U., Avni, O., Chen, L., and Rao, A. (2004). A Distal Enhancer in the Interferon- γ (IFN- γ) Locus Revealed by Genome Sequence Comparison. *J. Biol. Chem.* *279*, 4802–4810.
- Lee, J., Mo, J.-H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.-T., Lee, H.-K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., et al. (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1327–1336.
- Lee, J., Seto, D., and Bielory, L. (2008). Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *121*, 116–121.e11.
- Lee, S.K., Kim, J.Y., Hur, S.E., Kim, C.J., Na, B.J., Lee, M., Gilman-Sachs, A., and Kwak-Kim, J. (2011). An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3⁺ regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum. Reprod.* *der301*.
- Lefevre, M., Racedo, S.M., Ripert, G., Housez, B., Cazaubiel, M., Maudet, C., Jüsten, P., Marteau, P., and Urdaci, M.C. (2015). Probiotic strain *Bacillus subtilis* CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Immun. Ageing* *12*, 24.

- Lei, Y., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L.T., Bösl, M.R., Holländer, G.A., Hayashi, Y., Malefyt, R. de W., et al. (2011). Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* *208*, 383–394.
- Leid, J.G., Shirliff, M.E., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2002). Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Infect. Immun.* *70*, 6339–6345.
- Leitich, H., and Kiss, H. (2007). Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *21*, 375–390.
- Lenoir, M., Carmen, S. del, Cortes-Perez, N.G., Lozano-Ojalvo, D., Muñoz-Provencio, D., Chain, F., Langella, P., LeBlanc, A. de M. de, LeBlanc, J.G., and Bermúdez-Humarán, L.G. (2016). *Lactobacillus casei* BL23 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* *51*, 862–873.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). Cd28/B7 System of T Cell Costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 233–258.
- León, B., López-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. *Immunity* *26*, 519–531.
- Leopold, S. (1953). Heretofore Undescribed Organism isolated from the Genitourinary System. *U. S. Armed Forces Med. J.* *4*, 263–266.
- Lepargneur, J.-P., and Rousseau, V. (2008). Rôle protecteur de la flore de Doderleïn. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* *31*, p.485-494.
- Leppäluoto, P.A. (2011). Bacterial vaginosis: what is physiological in vaginal bacteriology? An update and opinion. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* *90*, 1302–1306.
- Leth-Larsen, R., Floridon, C., Nielsen, O., and Holmskov, U. (2004). Surfactant protein D in the female genital tract. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 149–154.
- Lexberg, M.H., Taubner, A., Albrecht, I., Lepenies, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., and Chang, H.-D. (2010). IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* *40*, 3017–3027.
- Li, C.-Y., Lin, H.-C., Lai, C.-H., Lu, J.J.-Y., Wu, S.-F., and Fang, S.-H. (2011). Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on Both Murine and Human Mitogen-Activated T Cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *156*, 128–136.
- Liang, S., Webb, T., and Li, Z. (2013). Probiotics Antigens Stimulate Hepatic NKT cells. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* *43*, 139–146.
- Libby, E.K., Pascal, K.E., Mordechai, E., Adelson, M.E., and Trama, J.P. (2008). *Atopobium vaginae* triggers an innate immune response in an in vitro model of bacterial vaginosis. *Microbes Infect.* *10*, 439–446.
- Lichtenstein, L., Avni-Biron, I., and Ben-Bassat, O. (2016). Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *30*, 81–88.

Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., et al. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 15137–15142.

Lillegard, J.B., Sim, R.B., Thorkildson, P., Gates, M.A., and Kozel, T.R. (2006). Recognition of *Candida albicans* by Mannan-Binding Lectin In Vitro and In Vivo. *J. Infect. Dis.* *193*, 1589–1597.

Lim, M.L.R., and Lasala, L. (2015). Effectiveness and safety of metronidazole plus probiotics versus metronidazole alone in the treatment of bacterial vaginosis: randomized controlled trial. *SPMC J. Health Care Serv.* *1*.

Lim, S.K., Kwon, M.-S., Lee, J., Oh, Y.J., Jang, J.-Y., Lee, J.-H., Park, H.W., Nam, Y.-D., Seo, M.-J., Roh, S.W., et al. (2017). *Weissella cibaria* WIKIM28 ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions by inducing tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in BALB/c mice. *Sci. Rep.* *7*, 40040.

Lin, J.-S., Chiu, Y.-H., Lin, N.-T., Chu, C.-H., Huang, K.-C., Liao, K.-W., and Peng, K.-C. (2009). Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: A double-blind, randomized, controlled study. *Vaccine* *27*, 1073–1079.

Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping Precursor Movement through the Postnatal Thymus Reveals Specific Microenvironments Supporting Defined Stages of Early Lymphoid Development. *J. Exp. Med.* *194*, 127–134.

Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* *173*, 721–730.

Liou, L.-Y., Blasius, A.L., Welch, M.J., Colonna, M., Oldstone, M.B.A., and Zuniga, E.I. (2008). In vivo Conversion of Bone Marrow Plasmacytoid Dendritic Cells into CD11b⁺ Conventional Dendritic Cells during Virus Infection. *Eur. J. Immunol.* *38*, 3388–3394.

Liu, Y.-J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275–306.

Liu, F., Liao, Q., and Liu, Z. (2006). Mannose-binding lectin and vulvovaginal candidiasis. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* *92*, 43–47.

Liu, H.-P., Cao, A.T., Feng, T., Li, Q., Zhang, W., Yao, S., Dann, S.M., Elson, C.O., and Cong, Y. (2015). TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression. *Eur. J. Immunol.* *45*, 1010–1018.

Liu, K., Victora, G.D., Schwickert, T.A., Guermonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* *324*, 392–397.

Liu, S.K., Fang, N., Koretzky, G.A., and Jane McGlade, C. (1999). The hematopoietic-specific adaptor protein Gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr. Biol.* *9*, 67–75.

Liu, Y., Fatheree, N.Y., Mangalat, N., and Rhoads, J.M. (2012). *Lactobacillus reuteri* strains reduce incidence and severity of experimental necrotizing enterocolitis via modulation of TLR4 and NF- κ B signaling in the intestine. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G608–G617.

- Liu, Z., Ma, Y., Shen, T., Chen, H., Zhou, Y., Zhang, P., Zhang, M., Chu, Z., and Qin, H. (2011). Identification of DC-SIGN as the receptor during the interaction of *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1258 and dendritic cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 603–611.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., et al. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* 8, 500–508.
- Lombardi, V.C., and Khaiboullina, S.F. (2014). Plasmacytoid dendritic cells of the gut: Relevance to immunity and pathology. *Clin. Immunol.* 153, 165–177.
- López, P., Gueimonde, M., Margolles, A., and Suárez, A. (2010). Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 157–165.
- López, P., González-Rodríguez, I., Gueimonde, M., Margolles, A., and Suárez, A. (2011). Immune Response to *Bifidobacterium bifidum* Strains Support Treg/Th17 Plasticity. *PLOS ONE* 6, e24776.
- Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 331–342.
- Lu, L., Palaniyandi, S., Zeng, R., Bai, Y., Liu, X., Wang, Y., Pauza, C.D., Roopenian, D.C., and Zhu, X. (2011). A Neonatal Fc Receptor-Targeted Mucosal Vaccine Strategy Effectively Induces HIV-1 Antigen-Specific Immunity to Genital Infection. *J. Virol.* 85, 10542–10553.
- Lund, J.M., Linehan, M.M., Iijima, N., and Iwasaki, A. (2006). Cutting Edge: Plasmacytoid dendritic cells provide innate immune protection against mucosal viral infection in situ. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 7510–7514.
- Lund, J.M., Hsing, L., Pham, T.T., and Rudensky, A.Y. (2008). Coordination of Early Protective Immunity to Viral Infection by Regulatory T Cells. *Science* 320, 1220–1224.
- Ma, X., Hua, J., and Li, Z. (2008). Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J. Hepatol.* 49, 821–830.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O’Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 154, 5071–5079.
- Machado, A., Castro, J., Cereija, T., Almeida, C., and Cerca, N. (2015). Diagnosis of bacterial vaginosis by a new multiplex peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization method. *PeerJ* 3, e780.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M.A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827–833.
- Macklaim, J.M., Clemente, J.C., Knight, R., Gloor, G.B., and Reid, G. (2015). Changes in vaginal microbiota following antimicrobial and probiotic therapy. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26.
- MacNeill, C., Umstead, T.M., Phelps, D.S., Lin, Z., Floros, J., Shearer, D.A., and Weisz, J. (2004). Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavage fluid. *Immunology* 111, 91–99.
- Madhivanan, P., Raphael, E., Rumphs, A., Krupp, K., Ravi, K., Srinivas, V., Arun, A., Reingold, A.L., Klausner, J.D., and Riley, L.W. (2014). Characterization of culturable vaginal *Lactobacillus* species

among women with and without bacterial vaginosis from the United States and India: a cross-sectional study. *J. Med. Microbiol.* *63*, 931–935.

Madjd, A., Taylor, M.A., Mousavi, N., Delavari, A., Malekzadeh, R., Macdonald, I.A., and Farshchi, H.R. (2016). Comparison of the effect of daily consumption of probiotic compared with low-fat conventional yogurt on weight loss in healthy obese women following an energy-restricted diet: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* *103*, 323–329.

Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Rossi, M.C., Querci, V., Mazzoni, A., Cimaz, R., De Palma, R., Liotta, F., Maggi, E., et al. (2012). Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* *42*, 3180–3188.

Magnusson, J., and Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp.coryniformis Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 1–5.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 15611–15616.

Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., and De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res. Microbiol.* *157*, 241–247.

Malaguti, N., lia, Bahls, L.D., Uchimura, N.S., Gimenes, F., cia, and Consolaro, M.E.L. (2015). Sensitive Detection of Thirteen Bacterial Vaginosis-Associated Agents Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *BioMed Res. Int.* *2015*, e645853.

Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* *9*, 641–649.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O’Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* *441*, 231–234.

Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* *20*, 254–257.

Manzoni, P., Mostert, M., Leonessa, M.L., Priolo, C., Farina, D., Monetti, C., Latino, M.A., and Gomirato, G. (2006). Oral Supplementation with *Lactobacillus casei* Subspecies rhamnosus Prevents Enteric Colonization by *Candida* Species in Preterm Neonates: A Randomized Study. *Clin. Infect. Dis.* *42*, 1735–1742.

Marconi, C., Santos-Greatti, M.M.V., Parada, C.M.G.L., Pontes, A., Pontes, A.G., Giraldo, P.C., Donders, G.G.G., and da Silva, M.G. (2014). Cervicovaginal levels of proinflammatory cytokines are increased during chlamydial infection in bacterial vaginosis but not in lactobacilli-dominated flora. *J. Low. Genit. Tract Dis.* *18*, 261–265.

Mares, D., Simoes, J.A., Novak, R.M., and Spear, G.T. (2008). TLR2-mediated cell stimulation in bacterial vaginosis. *J. Reprod. Immunol.* *77*, 91–99.

- Mariman, R., Tielen, F., Koning, F., and Nagelkerken, L. (2015). The Probiotic Mixture VSL#3 Has Differential Effects on Intestinal Immune Parameters in Healthy Female BALB/c and C57BL/6 Mice. *J. Nutr.* *145*, 1354–1361.
- Martin, H.L., Richardson, B.A., Nyange, P.M., Lavreys, L., Hillier, S.L., Chohan, B., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J.O., Bwayo, J., and Kreiss, J. (1999). Vaginal Lactobacilli, Microbial Flora, and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition. *J. Infect. Dis.* *180*, 1863–1868.
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadoux, J.-J., Sokol, H., Verdu, E.F., Bercik, P., Bermúdez-Humarán, L.G., and Langella, P. (2014). The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm. Bowel Dis.* *20*, 417–430.
- Martinez, R.C.R., Franceschini, S.A., Patta, M.C., Quintana, S.M., Nunes, A.C., Moreira, J.L.S., Anukam, K.C., Reid, G., and De Martinis, E.C.P. (2008). Analysis of vaginal lactobacilli from healthy and infected Brazilian women. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 4539–4542.
- Martínez-Peña, M.D., Castro-Escarpulli, G., and Aguilera-Arreola, M.G. (2013). *Lactobacillus* species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study. *BMC Infect. Dis.* *13*, 189.
- Martins, F.S., Vieira, A.T., Elian, S.D.A., Arantes, R.M.E., Tiago, F.C.P., Sousa, L.P., Araújo, H.R.C., Pimenta, P.F., Bonjardim, C.A., Nicoli, J.R., et al. (2013). Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes Infect.* *15*, 270–279.
- Masson, L., Salkinder, A.L., Olivier, A.J., McKinnon, L.R., Gamielien, H., Mlisana, K., Scriba, T.J., Lewis, D.A., Little, F., Jaspan, H.B., et al. (2015). Relationship between female genital tract infections, mucosal interleukin-17 production and local T helper type 17 cells. *Immunology* *146*, 557–567.
- Matsubara, V.H., Silva, E.G., Paula, C.R., Ishikawa, K.H., and Nakamae, A.E.M. (2012). Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis.* *18*, 260–264.
- Matsubara, V.H., Wang, Y., Bandara, H.M.H.N., Mayer, M.P.A., and Samaranayake, L.P. (2016). Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 6415–6426.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991–1045.
- Mayer, E.A., Tillisch, K., and Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *J. Clin. Invest.* *125*, 926–938.
- Maynard, C.L., Harrington, L.E., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Zindl, C.L., Rudensky, A.Y., and Weaver, C.T. (2007). Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3[−] precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat. Immunol.* *8*, 931–941.
- McCormack, W.M. (1994). Pelvic inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* *330*, 115–119.
- McCormick, P.J., Martina, J.A., and Bonifacino, J.S. (2005). Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 7910–7915.

McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X., Low, D., et al. (2014). Human Dermal CD14⁺ Cells Are a Transient Population of Monocyte-Derived Macrophages. *Immunity* *41*, 465–477.

McKenzie, Y.A., Thompson, J., Gulia, P., Lomer, M.C.E., and (IBS Dietetic Guideline Review Group on behalf of Gastroenterology Specialist Group of the British Dietetic Association) (2016). British Dietetic Association systematic review of systematic reviews and evidence-based practice guidelines for the use of probiotics in the management of irritable bowel syndrome in adults (2016 update). *J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc.* *29*, 576–592.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394–397.

Melowic, H.R., Stahelin, R.V., Blatner, N.R., Tian, W., Hayashi, K., Altman, A., and Cho, W. (2007). Mechanism of Diacylglycerol-induced Membrane Targeting and Activation of Protein Kinase C θ . *J. Biol. Chem.* *282*, 21467–21476.

Menard, J.-P., Fenollar, F., Henry, M., Bretelle, F., and Raoult, D. (2008). Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *47*, 33–43.

Meng, D., Zhu, W., Ganguli, K., Shi, H.N., and Walker, W.A. (2016). Anti-inflammatory effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* secretions on fetal human enterocytes are mediated by TLR-4 receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *311*, G744–G753.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* *31*.

Meshkibaf, S., Fritz, J., Gottschalk, M., and Kim, S.O. (2015). Preferential production of G-CSF by a protein-like *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 secretory factor through activating TLR2-dependent signaling events without activation of JNKs. *BMC Microbiol.* *15*, 238.

Messi, M., Giacchetto, I., Nagata, K., Lanzavecchia, A., Natoli, G., and Sallusto, F. (2003). Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human TH1 and TH2 lymphocytes. *Nat. Immunol.* *4*, 78–86.

Metchnikoff, I.I. (1907). *The Prolongation of Life: Optimistic Studies* (Springer Publishing Company).

Mian, F., Kandiah, N., Chew, M., Ashkar, A., Bienenstock, J., Forsythe, P., and Karimi, K. (2016). A probiotic provides protection against acute salmonellosis in mice: Possible role of innate lymphoid NKP46⁺ cells. *J. Funct. Foods* *23*, 329–338.

Michel, K.G., Huijbregts, R.P.H., Gleason, J.L., Richter, H.E., and Hel, Z. (2015). Effect of hormonal contraception on the function of plasmacytoid dendritic cells and distribution of immune cell populations in the female reproductive tract. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *68*, 511–518.

Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I.D., and Rescigno, M. (2009). Comparison of the Immunomodulatory Properties of Three Probiotic Strains of *Lactobacilli* Using Complex Culture Systems: Prediction for In Vivo Efficacy. *PLOS ONE* *4*, e7056.

Milne, P., Bigley, V., Gunawan, M., Haniffa, M., and Collin, M. (2014). CD1c⁺ blood dendritic cells have Langerhans cell potential. *Blood*.

- Minarrieta, L., Ghorbani, P., Sparwasser, T., and Berod, L. (2017). Metabolites: deciphering the molecular language between DCs and their environment. *Semin. Immunopathol.* *39*, 177–198.
- Mirmonsef, P., Zariffard, M.R., Gilbert, D., Makinde, H., Landay, A.L., and Spear, G.T. (2012). Short-chain fatty acids induce pro-inflammatory cytokine production alone and in combination with toll-like receptor ligands. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *67*, 391–400.
- Mitchell, C., and Marrazzo, J. (2014). Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *71*, 555–563.
- Mittelsteadt, K.L., Sullivan, J.M., and Campbell, D.J. (2016). ICOS-dependent PI3K signaling in regulatory T cell development and function. *J. Immunol.* *196*, 204.21-204.21.
- Miyauchi, E., Ogita, T., Miyamoto, J., Kawamoto, S., Morita, H., Ohno, H., Suzuki, T., and Tanabe, S. (2013). *Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. *PLoS One* *8*, e79735.
- Miyoshi, Y., Okada, S., Uchimura, T., and Satoh, E. (2006). A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *70*, 1622–1628.
- Moayyedi, P., Ford, A.C., Talley, N.J., Cremonini, F., Foxx-Orenstein, A.E., Brandt, L.J., and Quigley, E.M.M. (2010). The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* *59*, 325–332.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W.V., Ruthel, G., Demmin, G.L., Warfield, K.L., Bavari, S., and Klaenhammer, T.R. (2005). Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2880–2885.
- Molina, M.A., Díaz, A.M., Hesse, C., Ginter, W., Gentilini, M.V., Nuñez, G.G., Canellada, A.M., Sparwasser, T., Berod, L., Castro, M.S., et al. (2015). Immunostimulatory Effects Triggered by *Enterococcus faecalis* CECT7121 Probiotic Strain Involve Activation of Dendritic Cells and Interferon-Gamma Production. *PLoS One* *10*, e0127262.
- Moratalla, A., Gómez-Hurtado, I., Moya-Pérez, Á., Zapater, P., Peiró, G., González-Navajas, J.M., Pulgar, E.M.G.D., Such, J., Sanz, Y., and Francés, R. (2016). *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis. *Eur. J. Nutr.* *55*, 197–206.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Papworth, G.D., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., and Thomson, A.W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* *101*, 611–620.
- Morris, G.P., and Allen, P.M. (2012). How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat. Immunol.* *13*, 121–128.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* *136*, 2348–2357.
- Mselle, T.F., Meadows, S.K., Eriksson, M., Smith, J.M., Shen, L., Wira, C.R., and Sentman, C.L. (2007). Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clin. Immunol.* *124*, 69–76.

- Mudd, J.C., and Brenchley, J.M. (2016). ILC You Later: Early and Irreparable Loss of Innate Lymphocytes in HIV Infection. *Immunity* *44*, 216–218.
- Muli (1999). Electron microscopy studies on *Gardnerella vaginalis* grown in conventional and biofilm systems.
- Müllner, K., Miheller, P., Herszényi, L., and Tulassay, Z. (2013). Probiotics in the management of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 4556–4560.
- Murugaiyan, G., Agrawal, R., Mishra, G.C., Mitra, D., and Saha, B. (2007). Differential CD40/CD40L Expression Results in Counteracting Antitumor Immune Responses. *J. Immunol.* *178*, 2047–2055.
- Myer, L., Denny, L., Telerant, R., de Souza, M., Wright, T.C., and Kuhn, L. (2005). Bacterial Vaginosis and Susceptibility to HIV Infection in South African Women: A Nested Case-Control Study. *J. Infect. Dis.* *192*, 1372–1380.
- Myziuk, L., Romanowski, B., and Johnson, S.C. (2003). BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 1925–1928.
- Na, H., Cho, M., and Chung, Y. (2016). Regulation of Th2 Cell Immunity by Dendritic Cells. *Immune Netw.* *16*, 1.
- Nagot, N., Ouedraogo, A., Defer, M.-C., Vallo, R., Mayaud, P., and Perre, P.V. de (2007). Association between bacterial vaginosis and Herpes simplex virus type-2 infection: implications for HIV acquisition studies. *Sex. Transm. Infect.* *83*, 365–368.
- Nagy, E., FRÖMan, G., and MÅRDH, P.-A. (1992). Fibronectin binding of *Lactobacillus* species isolated from women with and without bacterial vaginosis. *J. Med. Microbiol.* *37*, 38–42.
- Nakanishi, K. (2010). Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 814–820.
- Nakanishi, J., Wada, Y., Matsumoto, K., Azuma, M., Kikuchi, K., and Ueda, S. (2006). Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol. Immunother.* *56*, 1173–1182.
- Nakano, H., Lin, K.L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D.N., Kakiuchi, T., and Gunn, M.D. (2009). Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* *10*, 394–402.
- Nasioudis, D., Beghini, J., Bongiovanni, A.M., Giraldo, P.C., Linhares, I.M., and Witkin, S.S. (2015). α -Amylase in Vaginal Fluid: Association With Conditions Favorable to Dominance of *Lactobacillus*. *Reprod. Sci.* Thousand Oaks Calif *22*, 1393–1398.
- Nasu, K., Narahara, H., Nasu, K., and Narahara, H. (2010). Pattern Recognition via the Toll-Like Receptor System in the Human Female Genital Tract. *Mediat. Inflamm. Mediat. Inflamm.* *2010*, *2010*, e976024.
- Neefjes, J., Jongasma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 823–836.
- Ness, R.B., Hillier, S.L., Richter, H.E., Soper, D.E., Stamm, C., McGregor, J., Bass, D.C., Sweet, R.L., and Rice, P. (2002). Douching in relation to bacterial vaginosis, lactobacilli, and facultative bacteria in the vagina. *Obstet. Gynecol.* *100*, 765.

Nibali, L., and Henderson, B. (2016). *The Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis as a Cause of Human Pathology* (John Wiley & Sons).

Niers, L.E.M., Hoekstra, M.O., Timmerman, H.M., Van Uden, N.O., De Graaf, P.M.A., Smits, H.H., Kimpen, J.L.L., and Rijkers, G.T. (2007). Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: immunomodulation of neonatal dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* *149*, 344–352.

Nieto, A., Wahn, U., Bufe, A., Eigenmann, P., Halken, S., Hedlin, G., Høst, A., Hourihane, J., Just, J., Lack, G., et al. (2014). Allergy and asthma prevention 2014. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* *25*, 516–533.

Nishihira, J., Kagami-Katsuyama, H., Tanaka, A., Nishimura, M., Kobayashi, T., and Kawasaki, Y. (2014). Elevation of natural killer cell activity and alleviation of mental stress by the consumption of yogurt containing *Lactobacillus gasseri* SBT2055 and *Bifidobacterium longum* SBT2928 in a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Funct. Foods* *11*, 261–268.

Nissle (1916). Ueber die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora1). *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* *42*, 1181–1184.

Norbury, C.C. (2006). Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* *117*, 443–451.

Noverr, M.C., and Huffnagle, G.B. (2004). Regulation of *Candida albicans* Morphogenesis by Fatty Acid Metabolites. *Infect. Immun.* *72*, 6206.

Nugent, R.P., Krohn, M.A., and Hillier, S.L. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.* *29*, 297–301.

Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M., et al. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* *448*, 480–483.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* *325*, 1001–1005.

Nutsch, K.M., and Hsieh, C.-S. (2012). T cell tolerance and immunity to commensal bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 385–391.

Ocaña, V.S., Holgado, A.A.P. de R., and Nader-Macías, M.E. (1999). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *23*, 87–92.

Oers, N.S. van, Killeen, N., and Weiss, A. (1996). Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* *183*, 1053–1062.

O'Garra, A., and Vieira, P. (2007). TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 425–428.

Ogita, T., Bergamo, P., Maurano, F., D'Arienzo, R., Mazzarella, G., Bozzella, G., Luongo, D., Sashihara, T., Suzuki, T., Tanabe, S., et al. (2015). Modulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* OLL2838 in a mouse model of intestinal immunopathology. *Immunobiology* *220*, 701–710.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Núñez, G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF-κB. *J. Biol. Chem.* *276*, 4812–4818.

- Oh, J.E., Kim, B.-C., Chang, D.-H., Kwon, M., Lee, S.Y., Kang, D., Kim, J.Y., Hwang, I., Yu, J.-W., Nakae, S., et al. (2016). Dysbiosis-induced IL-33 contributes to impaired antiviral immunity in the genital mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E762–E771.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Förster, R. (2004). CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. *Immunity* *21*, 279–288.
- Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J. Immunol.* *159*, 3838–3848.
- Ohta, T., Sugiyama, M., Hemmi, H., Yamazaki, C., Okura, S., Sasaki, I., Fukuda, Y., Orimo, T., Ishii, K.J., Hoshino, K., et al. (2016). Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. *Sci. Rep.* *6*, 23505.
- Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Dos santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., et al. (2009). Decrease of Foxp3+ Treg Cell Number and Acquisition of Effector Cell Phenotype during Lethal Infection. *Immunity* *31*, 772–786.
- Olinger, G.G., Hashemi, F.B., Sha, B.E., and Spear, G.T. (1999). Association of indicators of bacterial vaginosis with a female genital tract factor that induces expression of HIV-1. *AIDS Lond. Engl.* *13*, 1905–1912.
- O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F., et al. (2005). Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* *128*, 541–551.
- Osugi, Y., Vuckovic, S., and Hart, D.N.J. (2002). Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* *100*, 2858–2866.
- Otsuka, A., Nakajima, S., Kubo, M., Egawa, G., Honda, T., Kitoh, A., Nomura, T., Hanakawa, S., Moniaga, C.S., Kim, B., et al. (2013). Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. *Nat. Commun.* *4*, 1738.
- Otsuka, A., Nonomura, Y., and Kabashima, K. (2016). Roles of basophils and mast cells in cutaneous inflammation. *Semin. Immunopathol.* *38*, 563–570.
- Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Sha, W.C., and Murphy, K.M. (1998). Inhibition of Th1 Development Mediated by GATA-3 through an IL-4-Independent Mechanism. *Immunity* *9*, 745–755.
- Page, D.M., Kane, L.P., Onami, T.M., and Hedrick, S.M. (1996). Cellular and biochemical requirements for thymocyte negative selection. *Semin. Immunol.* *8*, 69–82.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1353–1362.
- Panduru, M., Panduru, N.M., Sălăvăstru, C.M., and Tiplica, G.-S. (2015). Probiotics and primary prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* *29*, 232–242.

- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* *6*, 1133–1141.
- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9543–9553.
- Passeron, T., Lacour, J.-P., Fontas, E., and Ortonne, J.-P. (2006). Prebiotics and synbiotics: two promising approaches for the treatment of atopic dermatitis in children above 2 years. *Allergy* *61*, 431–437.
- Patterson, E., Ryan, P.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad. Med. J.* [postgradmedj-2015-133285](https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133285).
- Patterson, J.L., Girerd, P.H., Karjane, N.W., and Jefferson, K.K. (2007). Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *197*, 170.e1-170.e7.
- Patterson, J.L., Stull-Lane, A., Girerd, P.H., and Jefferson, K.K. (2010). Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology* *156*, 392–399.
- Pearson, J.S., and Whorwell, P.J. (2017). Progress with treating the microbial dysbiosis associated with irritable bowel syndrome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *33*, 21–25.
- Peine, M., Rausch, S., Helmstetter, C., Fröhlich, A., Hegazy, A.N., Kühl, A.A., Grevelding, C.G., Höfer, T., Hartmann, S., and Löhning, M. (2013). Stable T-bet + GATA-3 + Th1/Th2 Hybrid Cells Arise In Vivo , Can Develop Directly from Naive Precursors, and Limit Immunopathologic Inflammation. *PLOS Biol* *11*, e1001633.
- Pellis, V., De Seta, F., Crovella, S., Bossi, F., Bulla, R., Guaschino, S., Radillo, O., Garred, P., and Tedesco, F. (2005). Mannose binding lectin and C3 act as recognition molecules for infectious agents in the vagina. *Clin. Exp. Immunol.* *139*, 120–126.
- Pelucchi, C., Chatenoud, L., Turati, F., Galeone, C., Moja, L., Bach, J.-F., and La Vecchia, C. (2012). Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. *Epidemiol. Camb. Mass* *23*, 402–414.
- Peña, J.A., and Versalovic, J. (2003). *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell. Microbiol.* *5*, 277–285.
- Pendharkar, S., Brandsborg, E., Hammarström, L., Marcotte, H., and Larsson, P.-G. (2015). Vaginal colonisation by probiotic lactobacilli and clinical outcome in women conventionally treated for bacterial vaginosis and yeast infection. *BMC Infect. Dis.* *15*.
- Peng, X., and Jiang, Y. (2014). Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 Against Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury in Mice. *Inflammation* *37*, 1599–1607.
- Peng, Y., Li, A., Yu, L., and Qin, G. (2015). The role of probiotics in prevention and treatment for patients with allergic rhinitis: A systematic review. *Am. J. Rhinol. Allergy* *29*, 292–298.

- Percopo, C.M., Rice, T.A., Brenner, T.A., Dyer, K.D., Luo, J.L., Kanakabandi, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Domachowske, J.B., Keicher, J.D., et al. (2015). Immunobiotic *Lactobacillus* administered post-exposure averts the lethal sequelae of respiratory virus infection. *Antiviral Res.* *121*, 109–119.
- Persson, E.K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hägerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Håkansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., et al. (2013). IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103+CD11b+ Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation. *Immunity* *38*, 958–969.
- Pessi, T., Sütas, Y., Hurme, M., and Isolauri, E. (2000). Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin. Exp. Allergy* *30*, 1804–1808.
- Peters, A., Lee, Y., and Kuchroo, V.K. (2011). The many faces of Th17 cells. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 702–706.
- Petricevic, L., and Witt, A. (2008). The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* *115*, 1369–1374.
- Petrova, M.I., van den Broek, M., Balzarini, J., Vanderleyden, J., and Lebeer, S. (2013). Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol. Rev.* *37*, 762–792.
- Petrova, M.I., Reid, G., Vaneechoutte, M., and Lebeer, S. (2016). *Lactobacillus iners*: Friend or Foe? *Trends Microbiol.*
- Pheifer, T.A., Forsyth, P.S., Durfee, M.A., Pollock, H.M., and Holmes, K.K. (1978). Nonspecific Vaginitis. *N. Engl. J. Med.* *298*, 1429–1434.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Kelly, J.M., Wilkinson, S.R., and Radi, R. (2008). Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem. J.* *410*, 359–368.
- Pieniz, S., Andreazza, R., Pereira, J.Q., de Oliveira Camargo, F.A., and Brandelli, A. (2013). Production of selenium-enriched biomass by *Enterococcus durans*. *Biol. Trace Elem. Res.* *155*, 447–454.
- Pinget, G.V., Corpuz, T.M., Stolp, J., Lousberg, E.L., Diener, K.R., Robertson, S.A., Sprent, J., and Webster, K.E. (2016). The majority of murine $\gamma\delta$ T cells at the maternal–fetal interface in pregnancy produce IL-17. *Immunol. Cell Biol.* *94*, 623–630.
- Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswynghels, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013). Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity* *38*, 322–335.
- Plantinga, T.S., Maren, W.W.C. van, Bergenhenegouwen, J. van, Hameetman, M., Nierkens, S., Jacobs, C., Jong, D.J. de, Joosten, L.A.B., Land, B. van't, Garssen, J., et al. (2011). Differential Toll-Like Receptor Recognition and Induction of Cytokine Profile by *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus* Strains of Probiotics. *Clin. Vaccine Immunol.* *18*, 621–628.
- Platz-Christensen, J.J., Mattsby-Baltzer, I., Thomsen, P., and Wiqvist, N. (1993). Endotoxin and interleukin-1 α in the cervical mucus and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *169*, 1161–1166.

- Pohjavuori, E., Viljanen, M., Korpela, R., Kuitunen, M., Tiittanen, M., Vaarala, O., and Savilahti, E. (2004). Lactobacillus GG effect in increasing IFN- γ production in infants with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *114*, 131–136.
- Poulin, L.F., Reyat, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B.U., Sancho, D., Murphy, K.M., Håkansson, U.K., Moita, L.F., Agace, W.W., Bonnet, D., et al. (2012). DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* *119*, 6052–6062.
- Powell, J.D., Lerner, C.G., and Schwartz, R.H. (1999). Inhibition of Cell Cycle Progression by Rapamycin Induces T Cell Clonal Anergy Even in the Presence of Costimulation. *J. Immunol.* *162*, 2775–2784.
- Powell, N., Walker, M.M., and Talley, N.J. (2017). The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *advance online publication*.
- Power, C.A., Church, D.J., Meyer, A., Alouani, S., Proudfoot, A.E.I., Clark-Lewis, I., Sozzani, S., Mantovani, A., and Wells, T.N.C. (1997). Cloning and Characterization of a Specific Receptor for the Novel CC Chemokine MIP-3 α from Lung Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* *186*, 825–835.
- Powrie, F., Carlino, J., Leach, M.W., Mauze, S., and Coffman, R.L. (1996). A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* *183*, 2669–2674.
- Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., and Immanuel, G. (2010). Production and Characterization of an Antifungal Compound (3-Phenyllactic Acid) Produced by *Lactobacillus plantarum* Strain. *Food Bioprocess Technol.* *3*, 379–386.
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., et al. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* *332*, 65–68.
- Qiu, X., Zhang, M., Yang, X., Hong, N., and Yu, C. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *J. Crohns Colitis* *7*, e558-568.
- Qu, C., Brinck-Jensen, N.-S., Zang, M., and Chen, K. (2014). Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int. J. Infect. Dis.* *19*, 1–5.
- Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermúdez-Humarán, L.G., Pigneur, B., et al. (2015). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* *gutjnl-2014-307649*.
- Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F., and Noelle, R.J. (2004). CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 307–328.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., et al. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* *126*, 520–528.
- Rakasz, E., Hagen, M., Sandor, M., and Lynch, R.G. (1997). Gamma delta T cells of the murine vagina: T cell response in vivo in the absence of the expression of CD2 and CD28 molecules. *Int. Immunol.* *9*, 161–167.

- Ramsdell, F. (2003). Foxp3 and Natural Regulatory T Cells: Key to a Cell Lineage? *Immunity* 19, 165–168.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G.M., Koenig, S.S.K., McCulle, S.L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C.O., et al. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4680–4687.
- Recine, N., Palma, E., Domenici, L., Giorgini, M., Imperiale, L., Sassu, C., Musella, A., Marchetti, C., Muzii, L., and Benedetti Panici, P. (2016). Restoring vaginal microbiota: biological control of bacterial vaginosis. A prospective case-control study using *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 as adjuvant treatment against bacterial vaginosis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 293, 101–107.
- Redelinghuys, M.J., Ehlers, M.M., Bezuidenhout, J.E., Becker, P.J., and Kock, M.M. (2017). Assessment of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* concentrations in a cohort of pregnant South African women. *Sex. Transm. Infect.*
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (1999). Fcγ Receptor–mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I–restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371–380.
- Rehman, A., Lepage, P., Nolte, A., Hellmig, S., Schreiber, S., and Ott, S.J. (2010). Transcriptional activity of the dominant gut mucosal microbiota in chronic inflammatory bowel disease patients. *J. Med. Microbiol.* 59, 1114–1122.
- Reid, G., Bruce, A.W., McGroarty, J.A., Cheng, K.J., and Costerton, J.W. (1990). Is there a role for lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infections? *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 335–344.
- Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C., and Bruce, A.W. (2001). Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32, 37–41.
- Reid, G., Charbonneau, D., Erb, J., Kochanowski, B., Beuerman, D., Poehner, R., and Bruce, A.W. (2003). Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 131–134.
- Reid, G., Kim, S.O., and Köhler, G.A. (2006). Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, 149–157.
- Reiner, S.L. (2007). Development in Motion: Helper T Cells at Work. *Cell* 129, 33–36.
- Remus, D.M., van Kranenburg, R., van Swam, I.I., Taverne, N., Bongers, R.S., Wels, M., Wells, J.M., Bron, P.A., and Kleerebezem, M. (2012). Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. *Microb. Cell Factories* 11, 149.
- Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Liu, H., Zhang, Y., Wang, C., Rong, F., and Jin, N. (2015). Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic *Lactobacillus* strains by in vivo tests. *Anaerobe* 35, Part B, 22–27.
- Rhee, S.H., Pothoulakis, C., and Mayer, E.A. (2009). Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 306–314.
- Ribeiro, C.M.S., Sarrami-Forooshani, R., Setiawan, L.C., Zijlstra-Willems, E.M., van Hamme, J.L., Tigchelaar, W., van der Wel, N.N., Kootstra, N.A., Gringhuis, S.I., and Geijtenbeek, T.B.H. (2016).

Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5 α in dendritic cell subsets. *Nature* *540*, 448–452.

Rice, T.A., Brenner, T.A., Percopo, C.M., Ma, M., Keicher, J.D., Domachowske, J.B., and Rosenberg, H.F. (2016). Signaling via pattern recognition receptors NOD2 and TLR2 contributes to immunomodulatory control of lethal pneumovirus infection. *Antiviral Res.* *132*, 131–140.

Riella, L.V., Paterson, A.M., Sharpe, A.H., and Chandraker, A. (2012). Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 2575–2587.

Rincón, M. (2001). MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 339–345.

Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., and Martinotti, M.G. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *83*, 541–553.

Rivino, L., Messi, M., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Geginat, J. (2004). Chemokine Receptor Expression Identifies Pre-T Helper (Th)1, Pre-Th2, and Nonpolarized Cells among Human CD4+ Central Memory T Cells. *J. Exp. Med.* *200*, 725–735.

Rizzo, A., Losacco, A., and Carratelli, C.R. (2013). *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human β -defensins 2 and 3. *Immunol. Lett.* *156*, 102–109.

Roan, N.R., Gierahn, T.M., Higgins, D.E., and Starnbach, M.N. (2006). Monitoring the T cell response to genital tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 12069–12074.

Rodrigues, L., Mei, H.C. van der, Teixeira, J., and Oliveira, R. (2004). Influence of Biosurfactants from Probiotic Bacteria on Formation of Biofilms on Voice Prostheses. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 4408–4410.

Rodriguez-Garcia, M., Shen, Z., Barr, F.D., Boesch, A.W., Ackerman, M.E., Kappes, J.C., Ochsenbauer, C., and Wira, C.R. (2016). Dendritic cells from the human female reproductive tract rapidly capture and respond to HIV. *Mucosal Immunol.*

Romagnani, S. (2004). The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* *112*, 352.

Romani, N., Clausen, B.E., and Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* *234*, 120–141.

Roncarolo, M.-G., and Gregori, S. (2008). Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *Eur. J. Immunol.* *38*, 925–927.

Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* *212*, 28–50.

Roos, S., and Jonsson, H. (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* *148*, 433–442.

Roose, J.P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T., and Weiss, A. (2007). Unusual Interplay of Two Types of Ras Activators, RasGRP and SOS, Establishes Sensitive and Robust Ras Activation in Lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 2732–2745.

Rossi, O., van Berkel, L.A., Chain, F., Tanweer Khan, M., Taverne, N., Sokol, H., Duncan, S.H., Flint, H.J., Harmsen, H.J.M., Langella, P., et al. (2016). Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci. Rep.* *6*, 18507.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2010). Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 12204–12209.

Royce, R.A., Thorp, J., Granados, J.L., and Savitz, D.A. (1999). Bacterial vaginosis associated with HIV infection in pregnant women from North Carolina. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* *20*, 382–386.

Ruedl, C., Bachmann, M.F., and Kopf, M. (2000). The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand. *Eur. J. Immunol.* *30*, 2056–2064.

Russell, J.B., and Diez-Gonzalez, F. (1997). The Effects of Fermentation Acids on Bacterial Growth. In *Advances in Microbial Physiology*, R.K. Poole, ed. (Academic Press), pp. 205–234.

Ryckman, K.K., Williams, S.M., and Kalinka, J. (2008). Correlations of selected vaginal cytokine levels with pregnancy-related traits in women with bacterial vaginosis and mycoplasmas. *J. Reprod. Immunol.* *78*, 172–180.

Ryu, S.-H., Park, J.-H., Choi, S.-Y., Jeon, H.-Y., Park, J.-I., Kim, J.-Y., Ham, S.-H., and Choi, Y.-K. (2016). The Probiotic *Lactobacillus* Prevents *Citrobacter rodentium*-Induced Murine Colitis in a TLR2-Dependent Manner. *J. Microbiol. Biotechnol.* *26*, 1333–1340.

Sabatté, J., Maggini, J., Nahmod, K., Amaral, M.M., Martínez, D., Salamone, G., Ceballos, A., Giordano, M., Vermeulen, M., and Geffner, J. (2007). Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev.* *18*, 5–17.

sadhu K (1989). *Gardnerella vaginalis* has a gram positive cell wall ultrastructure and lacks classical cell wall lipopolysaccharide. *J MED Microbiol.*

Saez-Lara, M.J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., and Gil, A. (2015). The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *BioMed Res. Int.* *2015*, e505878.

Sáez-Lara, M.J., Robles-Sanchez, C., Ruiz-Ojeda, F.J., Plaza-Diaz, J., and Gil, A. (2016). Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 928.

Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J., and Boehmer, H. von (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* *266*, 1208–1212.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* *155*, 1151–1164.

Sakai, F., Hosoya, T., Ono-Ohmachi, A., Ukibe, K., Ogawa, A., Moriya, T., Kadooka, Y., Shiozaki, T., Nakagawa, H., Nakayama, Y., et al. (2014). *Lactobacillus gasseri* SBT2055 Induces TGF- β Expression in Dendritic Cells and Activates TLR2 Signal to Produce IgA in the Small Intestine. *PLOS ONE* *9*, e105370.

Sallusto, F. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* *27*:2760–2769.

- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* *179*, 1109–1118.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* *182*, 389–400.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 745–763.
- Sallusto, F., Zielinski, C.E., and Lanzavecchia, A. (2012). Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.* *42*, 2215–2220.
- Sánchez, B., Urdaci, M.C., and Margolles, A. (2010). Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa–bacteria interactions. *Microbiology* *156*, 3232–3242.
- Sanders, M.E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P.R., Quigley, E.M., Sartor, R.B., Sherman, P.M., and Mayer, E.A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* *62*, 787–796.
- Sano, T., Yang, Y., Diehl, G., Chen, A., Kaplan, D.H., and Littman, D.R. (2016). Multi-step Th17 differentiation in response to segmented filamentous bacteria in the mouse intestine. *J. Immunol.* *196*, 67.1-67.1.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* *134*, 577–594.
- Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., and Saito, S. (2004). Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 347–353.
- Sathe, P., Metcalf, D., Vremec, D., Naik, S.H., Langdon, W.Y., Huntington, N.D., Wu, L., and Shortman, K. (2014). Lymphoid Tissue and Plasmacytoid Dendritic Cells and Macrophages Do Not Share a Common Macrophage-Dendritic Cell-Restricted Progenitor. *Immunity* *41*, 104–115.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., et al. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.* *203*, 2673–2682.
- Saulnier, D.M., Riehle, K., Mistretta, T., Diaz, M., Mandal, D., Raza, S., Weidler, E.M., Qin, X., Coarfa, C., Milosavljevic, A., et al. (2011). Gastrointestinal Microbiome Signatures of Pediatric Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *141*, 1782–1791.
- Sautter, R.L., and Brown, W.J. (1980). Sequential vaginal cultures from normal young women. *J. Clin. Microbiol.* *11*, 479–484.
- Savchenyuk, O.A., Virchenko, O.V., Falalyeyeva, T.M., Beregova, T.V., Babenko, L.P., Lazarenko, L.M., and Spivak, M.Y. (2015). Effect of Probiotic Therapy on the Experimental Obesity Development in Rats Caused by Monosodium Glutamate. *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* *6*.

- Sawicka, M., Stritesky, G.L., Reynolds, J., Abourashchi, N., Lythe, G., Molina-París, C., and Hogquist, K.A. (2014). From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8 Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection. *Front. Immunol.* 5.
- Schellenberg, J.J., Card, C.M., Ball, T.B., Mungai, J.N., Irungu, E., Kimani, J., Jaoko, W., Wachihi, C., Fowke, K.R., and Plummer, F.A. (2012). Bacterial vaginosis, HIV serostatus and T-cell subset distribution in a cohort of East African commercial sex workers: retrospective analysis. *AIDS Lond. Engl.* 26, 387–393.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., and Fellermann, K. (2007). Induction of Human β -Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infect. Immun.* 75, 2399–2407.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013). IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* 38, 970–983.
- Schlitzer, A., Sivakamasundari, V., Chen, J., Sumatoh, H.R.B., Schreuder, J., Lum, J., Malleret, B., Zhang, S., Larbi, A., Zolezzi, F., et al. (2015a). Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* 16, 718–728.
- Schlitzer, A., McGovern, N., and Ginhoux, F. (2015b). Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin. Cell Dev. Biol.* 41, 9–22.
- Schmitt, E., Klein, M., and Bopp, T. (2014). Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol.* 35, 61–68.
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Gros, M., Friedman, R., Moya-Nilges, M., Nigro, G., Cerf-Bensussan, N., and Sansonetti, P.J. (2015). Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro. *Nature* 520, 99–103.
- Schraml, B.U., and Reis e Sousa, C. (2015). Defining dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 32, 13–20.
- Schreibelt, G., Tel, J., Sliepen, K.H.E.W.J., Benitez-Ribas, D., Figdor, C.G., Adema, G.J., and Vries, I.J.M. de (2010). Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1573–1582.
- Schuster, C., Vaculik, C., Prior, M., Fiala, C., Mildner, M., Eppel, W., Stingl, G., and Elbe-Bürger, A. (2012). Phenotypic Characterization of Leukocytes in Prenatal Human Dermis. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2581–2592.
- Schwebke, J.R., Muzny, C.A., and Josey, W.E. (2014). Role of *Gardnerella vaginalis* in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis – A Conceptual Model. *J. Infect. Dis.* jiu089.
- Schwartz, A., Knauf, M., Pohl, U., Hackel, B., and Muller, H.J. (2015). Effectiveness and Tolerability of a Synbiotic Vaginal Suppository for the Treatment of Bacterial Vaginosis. *Gynecol. Obstet.* 2015.
- Scott, T.G., Curran, B., and Smyth, C.J. (1989). Electron Microscopy of Adhesive Interactions between *Gardnerella vaginalis* and Vaginal Epithelial Cells, McCoy Cells and Human Red Blood Cells. *Microbiology* 135, 475–480.

- Scuotto, A., Djorie, S., Colavizza, M., Romond, P.-C., and Romond, M.-B. (2014). Bifidobacterium breve C50 secretes lipoprotein with CHAP domain recognized in aggregated form by TLR2. *Biochimie* 107, Part B, 367–375.
- Segura, E. (2016). Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1423, 3–15.
- Senok, A.C., Verstraelen, H., Temmerman, M., and Botta, G.A. (2009). Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, The Cochrane Collaboration, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Seré, K., Baek, J.-H., Ober-Blöbaum, J., Müller-Newen, G., Tacke, F., Yokota, Y., Zenke, M., and Hieronymus, T. (2012). Two Distinct Types of Langerhans Cells Populate the Skin during Steady State and Inflammation. *Immunity* 37, 905–916.
- Sewankambo, N., Gray, R.H., Wawer, M.J., Paxton, L., McNairn, D., Wabwire-Mangen, F., Serwadda, D., Li, C., Kiwanuka, N., Hillier, S.L., et al. (1997). HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *The Lancet* 350, 546–550.
- Sgibnev, A., and Kremleva, E. (2016). Influence of Hydrogen Peroxide, Lactic Acid, and Surfactants from Vaginal Lactobacilli on the Antibiotic Sensitivity of Opportunistic Bacteria. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 1–11.
- Sha, B.E., Zariffard, M.R., Wang, Q.J., Chen, H.Y., Bremer, J., Cohen, M.H., and Spear, G.T. (2005). Female Genital-Tract HIV Load Correlates Inversely with Lactobacillus Species but Positively with Bacterial Vaginosis and Mycoplasma hominis. *J. Infect. Dis.* 191, 25–32.
- Shen, J., Obin, M.S., and Zhao, L. (2013). The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 34, 39–58.
- Shen, L., Fahey, J.V., Hussey, S.B., Asin, S.N., Wira, C.R., and Fanger, M.W. (2004). Synergy between IL-8 and GM-CSF in reproductive tract epithelial cell secretions promotes enhanced neutrophil chemotaxis. *Cell. Immunol.* 230, 23–32.
- Shen, R., Richter, H.E., Clements, R.H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Clapham, P.R., Smythies, L.E., et al. (2009). Macrophages in Vaginal but Not Intestinal Mucosa Are Monocyte-Like and Permissive to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* 83, 3258–3267.
- Shen, R., Richter, H.E., and Smith, P.D. (2011). Early HIV-1 Target Cells in Human Vaginal and Ectocervical Mucosa. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 65, 261–267.
- Shen, R., Richter, H.E., and Smith, P.D. (2014). Interactions between HIV-1 and Mucosal Cells in the Female Reproductive Tract. *Am. J. Reprod. Immunol.* 71, 608–617.
- Shey, M.S., Maharaj, N., Archary, D., Ngcapu, S., Garrett, N., Abdool Karim, S., and Passmore, J.-A.S. (2016). Modulation of Female Genital Tract-Derived Dendritic Cell Migration and Activation in Response to Inflammatory Cytokines and Toll-Like Receptor Agonists. *PLoS ONE* 11.
- Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516–521.

- Shipitsyna, E., Roos, A., Datcu, R., Hallen, A., Fredlund, H., Jensen, J.S., Engstrand, L., and Unemo, M. (2013). Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive Age - Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible? *PLoS ONE* *8*.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* *284*, 1835–1837.
- Singh, A., Hacini-Rachinel, F., Gosoni, M.L., Bourdeau, T., Holvoet, S., Doucet-Ladeveze, R., Beaumont, M., Mercenier, A., and Nutten, S. (2013). Immune-modulatory effect of probiotic *Bifidobacterium lactis* NCC2818 in individuals suffering from seasonal allergic rhinitis to grass pollen: an exploratory, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* *67*, 161–167.
- Smedt, T.D., Smith, J., Baum, P., Fanslow, W., Butz, E., and Maliszewski, C. (2002). Ox40 Costimulation Enhances the Development of T Cell Responses Induced by Dendritic Cells In Vivo. *J. Immunol.* *168*, 661–670.
- Smits, H.H., Engering, A., van der Kleij, D., de Jong, E.C., Schipper, K., van Capel, T.M.M., Zaat, B.A.J., Yazdanbakhsh, M., Wierenga, E.A., van Kooyk, Y., et al. (2005). Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 1260–1267.
- Sobel, J.D., Schneider, J., Kaye, D., and Levison, M.E. (1981). Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells at various times in the menstrual cycle. *Infect. Immun.* *32*, 194–197.
- Sokol, C.L., Chu, N.-Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer, T.M., and Medzhitov, R. (2009a). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat. Immunol.* *10*, 713–720.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16731–16736.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Doré, J. (2009b). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 1183–1189.
- Somerset, D.A., Zheng, Y., Kilby, M.D., Sansom, D.M., and Drayson, M.T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* *112*, 38–43.
- Song, Y.-L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C.-X., Kato, H., and Watanabe, K. (1999). Identification of and Hydrogen Peroxide Production by Fecal and Vaginal Lactobacilli Isolated from Japanese Women and Newborn Infants. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 3062–3064.
- Sookhee, S., Chulasiri, M., and Prachyabrued, W. (2001). Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J. Appl. Microbiol.* *90*, 172–179.
- Soumelis, V., and Liu, Y.-J. (2006). From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2286–2292.

- Spear, G.T., Gilbert, D., Landay, A.L., Zariffard, R., French, A.L., Patel, P., and Gillevet, P.M. (2011). Pyrosequencing of the Genital Microbiotas of HIV-Seropositive and -Seronegative Women Reveals *Lactobacillus iners* as the Predominant *Lactobacillus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 378–381.
- Sperling, A.I., and Bluestone, J.A. (2001). ICOS costimulation: it's not just for TH2 cells anymore. *Nat. Immunol.* *2*, 573–574.
- Sprent, J., and Kishimoto, H. (2002). The thymus and negative selection. *Immunol. Rev.* *185*, 126–135.
- St. John, E.P., Martinson, J., Simoes, J.A., Landay, A.L., and Spear, G.T. (2007). Dendritic cell activation and maturation induced by mucosal fluid from women with bacterial vaginosis. *Clin. Immunol.* *125*, 95–102.
- Stålhammar-Carlemalm, M., Stenberg, L., and Lindahl, G. (1993). Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J. Exp. Med.* *177*, 1593–1603.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice II. Functional Properties in Vitro. *J. Exp. Med.* *139*, 380–397.
- Stenman, L. k., Waget, A., Garret, C., Klopp, P., Burcelin, R., and Lahtinen, S. (2014). Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Benef. Microbes* *5*, 437–445.
- Stetinova, V., L, S., J, K., Z, S., Z, Z., and H, T.-H. (2009). Caco-2 cell monolayer integrity and effect of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 components. *Neuro Endocrinol. Lett.* *31 Suppl 2*, 51–56.
- Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S73–S80.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* *299*, 1259–1260.
- Strbo, N., Alcaide, M.L., Romero, L., Bolivar, H., Jones, D., Podack, E.R., and Fischl, M.A. (2016). Loss of Intra-Epithelial Endocervical Gamma Delta (GD) 1 T Cells in HIV-Infected Women. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989 75*, 134–145.
- Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A.V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., et al. (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* *7*, 937–945.
- Sturm, A., Rilling, K., Baumgart, D.C., Gargas, K., Abou-Ghazalé, T., Raupach, B., Eckert, J., Schumann, R.R., Enders, C., Sonnenborn, U., et al. (2005). *Escherichia coli* Nissle 1917 Distinctively Modulates T-Cell Cycling and Expansion via Toll-Like Receptor 2 Signaling. *Infect. Immun.* *73*, 1452–1465.
- Sturm-Ramirez, K., Gaye-Diallo, A., Eisen, G., Mboup, S., and Kanki, P.J. (2000). High Levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β in Bacterial Vaginosis May Increase Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus. *J. Infect. Dis.* *182*, 467–473.
- Sullivan, D.A., and Wira, C.R. (1984). Hormonal Regulation of Immunoglobulins in the Rat Uterus: Uterine Response to Multiple Estradiol Treatments. *Endocrinology* *114*, 650–658.

- Sumeksri, P., Kopraser, C., and Panichkul, S. (2005). BVBLUE test for diagnosis of bacterial vaginosis in pregnant women attending antenatal care at Phramongkutklao Hospital. *J. Med. Assoc. Thai. Chotmaihet Thangphaet* 88 Suppl 3, S7-13.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145, 3796–3806.
- Sweet, R.L. (1995). Role of Bacterial Vaginosis in Pelvic Inflammatory Disease. *Clin. Infect. Dis.* 20, S271–S275.
- Sweet, R.L. (2011). Treatment of Acute Pelvic Inflammatory Disease. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2011, e561909.
- Swidsinski, A., Mendling, W., Loening-Baucke, V., Ladhoff, A., Swidsinski, S., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005). Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 106, 1013–1023.
- Swidsinski, A., Mendling, W., Loening-Baucke, V., Swidsinski, S., Dörffel, Y., Scholze, J., Lochs, H., and Verstraelen, H. (2008). An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198, 97.e1-97.e6.
- Swidsinski, A., Verstraelen, H., Loening-Baucke, V., Swidsinski, S., Mendling, W., and Halwani, Z. (2013). Presence of a Polymicrobial Endometrial Biofilm in Patients with Bacterial Vaginosis. *PLoS ONE* 8, e53997.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 100, 655–669.
- Taha, T.E., Hoover, D.R., Dallabetta, G.A., Kumwenda, N.I., Mtimaavalye, L.A., Yang, L.P., Liomba, G.N., Broadhead, R.L., Chipangwi, J.D., and Miotti, P.G. (1998). Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS Lond. Engl.* 12, 1699–1706.
- Takagi, A., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, K., Morotomi, M., and Yokokura, T. (2001). Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis* 22, 599–605.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25+Cd4+Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J. Exp. Med.* 192, 303–310.
- Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1–14.
- Takeda, K., Sasaki, K., and Okumura, K. (2016). Extract of metabolic products of *Bacillus subtilis* AK augments natural killer cell cytotoxic activity. *Tradit. Kampo Med.* 3, 100–106.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tan, T.G., Sefik, E., Geva-Zatorsky, N., Kua, L., Naskar, D., Teng, F., Pisman, L., Ortiz-Lopez, A., Jupp, R., Wu, H.-J.J., et al. (2016). Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201617460.
- Tanabe, S., Kinuta, Y., and Saito, Y. (2008). *Bifidobacterium infantis* suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. *Int. J. Mol. Med.* 22, 181–185.

- Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., and Uddy, M.C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* *361*, 82–85.
- Tang, H., Cao, W., Kasturi, S.P., Ravindran, R., Nakaya, H.I., Kundu, K., Murthy, N., Kepler, T.B., Malissen, B., and Pulendran, B. (2010). The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nat. Immunol.* *11*, 608–617.
- Tang, R.-B., Chang, J.-K., and Chen, H.-L. (2015). Can probiotics be used to treat allergic diseases? *J. Chin. Med. Assoc.* *78*, 154–157.
- Taverniti, V., Scabiosi, C., Arioli, S., Mora, D., and Guglielmetti, S. (2014). Short-term daily intake of 6 billion live probiotic cells can be insufficient in healthy adults to modulate the intestinal bifidobacteria and lactobacilli. *J. Funct. Foods* *6*, 482–491.
- Taylor-Robinson, D. (2008). Hormones in bacterial vaginosis. *Int. J. STD AIDS* *19*, 67–67.
- Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Blüthmann, H., and von Boehmer, H. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* *335*, 229–233.
- Tel, J., Leun, A.M. van der, Figdor, C.G., Torensma, R., and Vries, I.J.M. de (2012). Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer Immunol. Immunother.* *61*, 1279–1288.
- Teunissen, M.B.M., Bos, J.D., Koomen, C.W., de Waal Malefyt, R., and Wierenga, E.A. (1998). Interleukin-17 and Interferon- γ Synergize in the Enhancement of Proinflammatory Cytokine Production by Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *111*, 645–649.
- Thomas, S., Przesdzing, I., Metzke, D., Schmitz, J., Radbruch, A., and Baumgart, D.C. (2009). *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* *156*, 78.
- Thonart, P., and Dortu, C. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Base.
- Tissier, H. (1907). Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin.
- Todorov, S.D., Danova, S.T., Van Reenen, C.A., Meincken, M., Dinkova, G., Ivanova, I.V., and Dicks, L.M.T. (2006). Characterization of bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions. *J. Basic Microbiol.* *46*, 226–238.
- Toldi, G., Rigó, J., Stenczer, B., Vásárhelyi, B., and Molvarec, A. (2011). Increased Prevalence of IL-17-Producing Peripheral Blood Lymphocytes in Pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* *66*, 223–229.
- Tomusiak, A., Strus, M., and Heczko, P.B. (2011). [Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* isolated from cases of bacterial vaginosis]. *Ginekol. Pol.* *82*, 900–904.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., et al. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* *11*, 55–62.
- Triantafilou, M., Brandenburg, K., Gutschmann, T., Seydel, U., and Triantafilou, K. (2002). Innate recognition of bacteria: engagement of multiple receptors. *Crit. Rev. Immunol.* *22*, 251–268.

- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nat. Immunol.* *10*, 864–871.
- Trombetta, E.S., and Mellman, I. (2005). Cell Biology of Antigen Processing in Vitro and in Vivo. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 975–1028.
- Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., and Mellman, I. (2003). Activation of Lysosomal Function During Dendritic Cell Maturation. *Science* *299*, 1400–1403.
- Tuettenberg, A., Huter, E., Hubo, M., Horn, J., Knop, J., Grimbacher, B., Kroczeck, R.A., Stoll, S., and Jonuleit, H. (2009). The Role of ICOS in Directing T Cell Responses: ICOS-Dependent Induction of T Cell Anergy by Tolerogenic Dendritic Cells. *J. Immunol.* *182*, 3349–3356.
- Tuettenberg, A., Fondel, S., Steinbrink, K., Enk, A.H., and Jonuleit, H. (2010). CD40 signalling induces IL-10-producing, tolerogenic dendritic cells. *Exp. Dermatol.* *19*, 44–53.
- Ueno, H. (2016a). Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *J. Clin. Immunol.* *36*, 34–39.
- Ueno, H. (2016b). T follicular helper cells in human autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* *43*, 24–31.
- Urbancsek, H., Kazar, T., Mezes, I., and Neumann, K. (2001). Results of a double-blind, randomized study to evaluate the efficacy and safety of Antibiophilus in patients with radiation-induced diarrhoea. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 391–396.
- Urdaci, M.C., Jacquot, C., Racedo, S.M., Rambert, J., and Pinchuk, I.V. (2016). Tu2027 Probiotic *Bacillus subtilis* attenuate Inflammation in a Rat Model of Arthritis Through Modulation of Intestinal Microbiota. *Gastroenterology* *150*, S1009.
- Vaghef-Mehrabany, E., Alipour, B., Homayouni-Rad, A., Sharif, S.-K., Asghari-Jafarabadi, M., and Zavvari, S. (2014). Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* *30*, 430–435.
- Valdés-Varela, L., Hernández-Barranco, A.M., Ruas-Madiedo, P., and Gueimonde, M. (2016). Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* Growth and Toxicity When Co-cultured in Different Prebiotic Substrates. *Front. Microbiol.* *7*, 738.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., et al. (2000). Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules. *Immunity* *12*, 71–81.
- Valore, E.V., Wiley, D.J., and Ganz, T. (2006). Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis. *Infect. Immun.* *74*, 5693–5702.
- Van esbroeck, M., Vandamme, P., Falsen, E., Vancanneyt, M., Moore, E., Pot, B., Gavini, F., Kersters, K., and Goossens, H. (1996). Polyphasic Approach to the Classification and Identification of *Gardnerella vaginalis* and Unidentified *Gardnerella vaginalis*-Like Coryneforms Present in Bacterial Vaginosis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *46*, 675–682.
- Van Tassell, M.L., and Miller, M.J. (2011). *Lactobacillus* Adhesion to Mucus. *Nutrients* *3*, 613–636.

- Varela, E., Manichanh, C., Gallart, M., Torrejón, A., Borrueal, N., Casellas, F., Guarner, F., and Antolin, M. (2013). Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *38*, 151–161.
- Varshney, P., Yadav, V., and Saini, N. (2016). Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology* *149*, 13–24.
- Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., and Bolen, J.B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* *55*, 301–308.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006a). TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* *24*, 179–189.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Flavell, R.A., and Stockinger, B. (2006b). Signals mediated by transforming growth factor- β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat. Immunol.* *7*, 1151–1156.
- Vélez, M.P., Keersmaecker, S.C.J.D., and Vanderleyden, J. (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* *276*, 140–148.
- Velraeds, M.M.C., Van De Belt-Gritter, B., Van Der Mei, H.C., Reid, G., and Busscher, H.J. (1998). Interference in Initial Adhesion of Uropathogenic Bacteria and Yeasts to Silicone Rubber by A *Lactobacillus Acidophilus* Biosurfactant. *J. Med. Microbiol.* *47*, 1081–1085.
- Vick, E.J., Park, H.S., Huff, K.A., Brooks, K.M., Farone, A.L., and Farone, M.B. (2014). *Gardnerella vaginalis* triggers NLRP3 inflammasome recruitment in THP-1 monocytes. *J. Reprod. Immunol.* *106*, 67–75.
- Vidal, M., Forestier, C., Charbonnel, N., Henard, S., Rabaud, C., and Lesens, O. (2010). Probiotics and Intestinal Colonization by Vancomycin-Resistant Enterococci in Mice and Humans. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 2595.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 523–532.
- Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* *29*, 352–361.
- Villena, J., and Kitazawa, H. (2014). Modulation of Intestinal TLR4-Inflammatory Signaling Pathways by Probiotic Microorganisms: Lessons Learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Front. Immunol.* *4*.
- Voellmy, R. (2005). The stress protein response: consequences of stress exposure—cytoprotection—potential diagnostic and therapeutic applications. *Methods* *35*, 115–116.
- Vogelzang, A., McGuire, H.M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C.R., and King, C. (2008). A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity* *29*, 127–137.
- Vongbhavit, K., and Underwood, M.A. (2016). Prevention of Necrotizing Enterocolitis Through Manipulation of the Intestinal Microbiota of the Premature Infant. *Clin. Ther.* *38*, 716–732.
- Voo, K.S., Wang, Y.-H., Santori, F.R., Boggiano, C., Wang, Y.-H., Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., et al. (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 4793–4798.

- Vu, M.D., Xiao, X., Gao, W., Degauque, N., Chen, M., Kroemer, A., Killeen, N., Ishii, N., and Li, X.C. (2007). OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood* *110*, 2501–2510.
- Wagner, R.D., Pierson, C., Warner, T., Dohnalek, M., Farmer, J., Roberts, L., Hilty, M., and Balish, E. (1997). Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect. Immun.* *65*, 4165–4172.
- Wagner, R.D., Warner, T., Pierson, C., Roberts, L., Farmer, J., Dohnalek, M., Hilty, M., and Balish, E. (1998). Biotherapeutic effects of *Bifidobacterium* spp. on orogastric and systemic candidiasis in immunodeficient mice. *Rev. Iberoam. Micol.* *15*, 265–270.
- Waickman, A.T., and Powell, J.D. (2012). Mammalian Target of Rapamycin Integrates Diverse Inputs To Guide the Outcome of Antigen Recognition in T Cells. *J. Immunol.* *188*, 4721–4729.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J.-P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of Dendritic Cells that Induce Tolerance and T Regulatory 1 Cell Differentiation In Vivo. *Immunity* *18*, 605–617.
- Walker, W.A. (2013). Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann. Nutr. Metab.* *63 Suppl 2*, 8–15.
- Walter, J. (2008). Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 4985–4996.
- Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* *445*, 766–770.
- Wang, P., Tao, J.-H., and Pan, H.-F. (2016). Probiotic bacteria: a viable adjuvant therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis. *Inflammopharmacology* *24*, 189–196.
- Wang, Y., Sui, Y., Kato, S., Hogg, A.E., Steel, J.C., Morris, J.C., and Berzofsky, J.A. (2015). Vaginal type-II mucosa is an inductive site for primary CD8+ T-cell mucosal immunity. *Nat. Commun.* *6*, 6100.
- Wang, Y.-Y., Kannan, A., Nunn, K.L., Murphy, M.A., Subramani, D.B., Moench, T., Cone, R., and Lai, S.K. (2014). IgG in cervicovaginal mucus traps HSV and prevents vaginal Herpes infections. *Mucosal Immunol.* *7*, 1036–1044.
- Wanke, M., and Szajewska, H. (2012). Lack of an Effect of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Preventing Nosocomial Diarrhea in Children: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J. Pediatr.* *161*, 40–43.e1.
- Ward, S.G., and Cantrell, D.A. (2001). Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 332–338.
- Wassink, L., Vieira, P.L., Smits, H.H., Kingsbury, G.A., Coyle, A.J., Kapsenberg, M.L., and Wierenga, E.A. (2004). ICOS Expression by Activated Human Th Cells Is Enhanced by IL-12 and IL-23: Increased ICOS Expression Enhances the Effector Function of Both Th1 and Th2 Cells. *J. Immunol.* *173*, 1779–1786.
- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* *15*, 98–108.
- Wells, J.M. (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb. Cell Factories* *10*, S17.

- West, M.A., Wallin, R.P.A., Matthews, S.P., Svensson, H.G., Zaru, R., Ljunggren, H.-G., Prescott, A.R., and Watts, C. (2004). Enhanced Dendritic Cell Antigen Capture via Toll-Like Receptor-Induced Actin Remodeling. *Science* 305, 1153–1157.
- Whorwell, P.J., Altringer, L., Morel, J., Bond, Y., Charbonneau, D., O'Mahony, L., Kiely, B., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2006). Efficacy of an Encapsulated Probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in Women with Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1581–1590.
- Wiesenfeld, H.C., Hillier, S.L., Krohn, M.A., Landers, D.V., and Sweet, R.L. (2003). Bacterial Vaginosis Is a Strong Predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Infection. *Clin. Infect. Dis.* 36, 663–668.
- Wilks, M., and Tabaqchali, S. (1987). Quantitative bacteriology of the vaginal flora during the menstrual cycle. *J. Med. Microbiol.* 24, 241–245.
- Wills-Karp, M., Santeliz, J., and Karp, C.L. (2001). The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 69–75.
- Wira, C.R., Fahey, J.V., Sentman, C.L., Pioli, P.A., and Shen, L. (2005). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol. Rev.* 206, 306–335.
- Witkin, S.S., Linhares, I.M., and Giraldo, P. (2007). Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21, 347–354.
- de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A.W.P., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat. Med.* 13, 367–371.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21, 241–254.
- Workowski, K.A., Berman, S.M., and others (2006). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006 (US Department of Health and Human Services).
- Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M., and Lewis, R.S. (2006a). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 174, 803–813.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., et al. (2006b). FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375–387.
- Yang, L., and Seki, E. (2012). Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Gastrointest. Sci.* 3, 138.
- Yang, J., Ren, F., Zhang, H., Jiang, L., Hao, Y., and Luo, X. (2015). Induction of Regulatory Dendritic Cells by *Lactobacillus paracasei* L9 Prevents Allergic Sensitization to Bovine β -Lactoglobulin in Mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1687–1696.
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. *J. Biol. Chem.* 282, 9358–9363.

- Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., et al. (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28, 29–39.
- Yang, Y., Torchinsky, M.B., Gobert, M., Xiong, H., Xu, M., Linehan, J.L., Alonzo, F., Ng, C., Chen, A., Lin, X., et al. (2014). Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature* 510, 152–156.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., et al. (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest.* 116, 1310–1316.
- Yeom, M., Sur, B.J., Park, J., Cho, S.G., Lee, B., Kim, S.T., Kim, K.S., Lee, H., and Hahm, D.H. (2015). Oral administration of *Lactobacillus casei* variety *rhamnosus* partially alleviates TMA-induced atopic dermatitis in mice through improving intestinal microbiota. *J. Appl. Microbiol.* 119, 560–570.
- Yeoman, C.J., Yildirim, S., Thomas, S.M., Durkin, A.S., Torralba, M., Sutton, G., Buhay, C.J., Ding, Y., Dugan-Rocha, S.P., Muzny, D.M., et al. (2010). Comparative Genomics of *Gardnerella vaginalis* Strains Reveals Substantial Differences in Metabolic and Virulence Potential. *PLoS ONE* 5, e12411.
- Yeung, C.-Y., Chan, W.-T., Jiang, C.-B., Cheng, M.-L., Liu, C.-Y., Chang, S.-W., Chiang Chiau, J.-S., and Lee, H.-C. (2015). Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. *PLoS One* 10, e0138746.
- Yoshida, A., Yamada, K., Yamazaki, Y., Sashihara, T., Ikegami, S., Shimizu, M., and Totsuka, M. (2011). *Lactobacillus gasseri* OLL2809 and its RNA suppress proliferation of CD4+ T cells through a MyD88-dependent signalling pathway. *Immunology* 133, 442.
- Yoshinaga, K., Akahira, J.-I., Niikura, H., Ito, K., Moriya, T., Murakami, T., Kameoka, J.-I., Ichinohasama, R., Okamura, K., and Yaegashi, N. (2004). A case of primary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the vagina. *Hum. Pathol.* 35, 1164–1166.
- Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., et al. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, 827–832.
- Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Proietto, A., ten Broeke, T., Matsuki, Y., Mount, A.M., Belz, G.T., O’Keeffe, M., Ohmura-Hoshino, M., et al. (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* 9, 1244–1252.
- Yu, J., Jang, S.-O., Kim, B.-J., Song, Y.-H., Kwon, J.-W., Kang, M.-J., Choi, W.-A., Jung, H.-D., and Hong, S.-J. (2010). The Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on the Prevention of Asthma in a Murine Model. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2, 199–205.
- Yue, F.Y., Merchant, A., Kovacs, C.M., Loutfy, M., Persad, D., and Ostrowski, M.A. (2008). Virus-Specific Interleukin-17-Producing CD4+ T Cells Are Detectable in Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* 82, 6767–6771.
- Zaretsky, A.G., Taylor, J.J., King, I.L., Marshall, F.A., Mohrs, M., and Pearce, E.J. (2009). T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J. Exp. Med.* 206, 991–999.

- Zariffard, M.R., Saifuddin, M., Sha, B.E., and Spear, G.T. (2002). Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for *Lactobacilli*, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *34*, 277–281.
- Zariffard, M.R., Novak, R.M., Lurain, N., Sha, B.E., Graham, P., and Spear, G.T. (2005). Induction of Tumor Necrosis Factor- α Secretion and Toll-Like Receptor 2 and 4 mRNA Expression by Genital Mucosal Fluids from Women with Bacterial Vaginosis. *J. Infect. Dis.* *191*, 1913–1921.
- Zelensky, A.N., and Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* *272*, 6179–6217.
- Zeuthen, L.H., Christensen, H.R., and Frøkiær, H. (2006). Lactic Acid Bacteria Inducing a Weak Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha Response in Human Dendritic Cells Inhibit Strongly Stimulating Lactic Acid Bacteria but Act Synergistically with Gram-Negative Bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* *13*, 365–375.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., and Frøkiær, H. (2008). Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology* *124*, 489–502.
- Zhang, L., Li, Y., Li, Y., Qi, L., Liu, X., Yuan, C., Hu, N., Ma, D., Li, Z., Yang, Q., et al. (2012). Increased Frequencies of Th22 Cells as well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis. *PLOS ONE* *7*, e31000.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998). LAT: The ZAP-70 Tyrosine Kinase Substrate that Links T Cell Receptor to Cellular Activation. *Cell* *92*, 83–92.
- Zhang, Y., Li, L., Guo, C., Mu, D., Feng, B., Zuo, X., and Li, Y. (2016). Effects of probiotic type, dose and treatment duration on irritable bowel syndrome diagnosed by Rome III criteria: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* *16*, 62.
- Zhang, Z., Cheng, L., Zhao, J., Li, G., Zhang, L., Chen, W., Nie, W., Reszka-Blanco, N.J., Wang, F.-S., and Su, L. (2015). Plasmacytoid dendritic cells promote HIV-1-induced group 3 innate lymphoid cell depletion. *J. Clin. Invest.* *125*, 3692–3703.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* *89*, 587–596.
- Zheng, B., van Bergenhenegouwen, J., Overbeek, S., van de Kant, H.J.G., Garssen, J., Folkerts, G., Vos, P., Morgan, M.E., and Kraneveld, A.D. (2014). *Bifidobacterium breve* attenuates murine dextran sodium sulfate-induced colitis and increases regulatory T cell responses. *PLoS One* *9*, e95441.
- Zhou, L., Ivanov, I.I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* *8*, 967–974.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L.T., and Bluestone, J.A. (2009a). Plasticity of CD4⁺ FoxP3⁺ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 281–285.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J.A. (2009b). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* *10*, 1000–1007.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2009). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* *20*, 4–12.

- Zhu, D., Sun, Y., Huo, G.-C., Yang, L., Liu, F., Li, A., and Meng, X.-C. (2016). Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* KLDS 2.0603, a probiotic strain with digestive tract resistance and adhesion to the intestinal epithelial cells. *J. Biotechnol.* *220*, 49–50.
- Zhu, D.-L., Yang, W.-X., and Yang, H.-M. (2010). [Meta analysis of lactic acid bacteria as probiotics for the primary prevention of infantile eczema]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi Chin. J. Contemp. Pediatr.* *12*, 734–739.
- Zhu, Y., Gumlaw, N., Karman, J., Zhao, H., Zhang, J., Jiang, J.-L., Maniatis, P., Edling, A., Chuang, W.-L., Siegel, C., et al. (2011). Lowering glycosphingolipid levels in CD4+ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th17 lineage. *J. Biol. Chem.* *286*, 14787–14794.
- Živković, M., Miljković, M.S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M.B., Veljović, K., Tolinački, M., Soković, S., Korać, A., and Golić, N. (2016). EPS-SJ Exopolisaccharide Produced by the Strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 Is Involved in Adhesion to Epithelial Intestinal Cells and Decrease on *E. coli* Association to Caco-2 Cells. *Front. Microbiol.* *7*.
- Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Dewulf, J., Pot, B., and Grangette, C. (2009). Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Int. J. Food Microbiol.* *131*, 40–51.
- Zúñiga-Pflücker, J.C. (2004). T-cell development made simple. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 67–72.
- Zuo, L., Yuan, K.-T., Yu, L., Meng, Q.-H., Chung, P.C.-K., and Yang, D.-H. (2014). *Bifidobacterium infantis* attenuates colitis by regulating T cell subset responses. *World J. Gastroenterol.* *20*, 18316–18329.

Annexes

Bibliographie personnelle

Publication internationale

Publiée

Bertran, T., Brachet, P., Vareille-Delarbre, M., Falenta, J., Dosgilbert, A., Vasson, M.-P., Forestier, C., Tridon, A., and Evrard, B. (2016). Slight Pro-Inflammatory Immunomodulation Properties of Dendritic Cells by *Gardnerella vaginalis*: The “Invisible Man” of Bacterial Vaginosis? *J. Immunol. Res.* 2016. **Premier article de la these d’université**

En cours de soumission

Bertran, T., Brachet, P., Vareille-Delarbre, M., Dosgilbert, A., Vasson, M.-P., Forestier, C., and Evrard, B. (2017). Dose-dependent immunomodulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 on human dendritic cells and T cells. **Second article de la thèse d’université**

Vareille-Delarbre, M., Bertran, T., Garcin, S., Lagrafeuille, R., Forestier, C., Evrard, B. (2017). *Lactobacillus plantarum* control inflammatory response induced by *Klebsiella pneumoniae*.

Communications orales

Caractérisation in vitro des comportements immunomodulateurs différentiels d’une bactérie probiotique, Lactobacillus rhamnosus Lcr35, et d’un pathogène vaginal, Gardnerella vaginalis. 19^{èmes} journées de l’école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Agronomie, Environnement de Clermont-Ferrand le 03 juin 2016

Caractérisation in vitro des comportements immunomodulateurs différentiels d’une bactérie probiotique, Lactobacillus rhamnosus Lcr35, et d’un pathogène vaginal, Gardnerella vaginalis. 17^{èmes} journées stéphanoises de cytométrie: CYTIMA, St-Etienne, le 01 juin 2016

Determination of immunomodulatory properties of probiotic Lcr35 with therapeutic aim in the gynecological field. 15^{èmes} Journées stéphanoises de cytométrie: CYTIMA, St-Etienne, le 14 mai 2014

Communications affichées

Etude des mécanismes d'action du Lactobacillus rhamnosus Lcr35 sur la réponse Immunitaire mucosale. Journée scientifique du CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, le 20 novembre 2014

Diffusion de la science

Etude des propriétés immunomodulatrices du probiotique Lcr35 dans le traitement de la vaginose bactérienne. Thomas Bertran et Bertrand Evrard publié sur le site de Sciences Auvergne en 2017

Présentation de vulgarisation sur le thème de la santé et du microbiote intestinal : les incroyables pouvoirs des intestins avec le Dr. Marjoleinne Vareille-Delarbre. Pint of sciences, Clermont-Ferrand, le 16 mai 2017

Résumé

La vaginose bactérienne (VB) est une infection génitale basse considérée comme une dysbiose de la flore vaginale, avec diminution des lactobacilles protecteurs et colonisation par une flore polymicrobienne anaérobie, au sein de laquelle *Gardnerella (G.) vaginalis* tient un rôle prépondérant. Les probiotiques, dont le *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35, trouvent une bonne indication dans cette pathologie, en permettant de restaurer la flore vaginale et de diminuer le taux de récurrence des VB, problème récurrent survenant après traitement antibiotique du fait de la persistance d'une altération de la flore. Cependant, l'effet de ces bactéries bénéfiques sur le système immunitaire, bras armé de l'organisme dont le but est de nous défendre contre un grand nombre d'attaques extérieures, notamment infectieuses, est mal connu. Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle critique dans ce système en orchestrant les réponses immunitaires adaptatives, tolérogènes ou inflammatoires. A l'état immature, ces cellules assurent la surveillance et la protection des muqueuses, notamment intestinales et vaginales, par la reconnaissance de produits microbiens, les PAMP *via* leurs récepteurs membranaires appelés les PRR. Une fois l'antigène microbien capté, les DC subissent un processus de maturation et s'activent, permettant ainsi la polarisation lymphocytaire T CD4⁺ et la génération des sous-populations effectrices Th1, Th2 et Th17 ou tolérogènes, les T régulateurs. L'objectif de ce travail était donc d'étudier *in vitro*, sur une large gamme de concentrations, les propriétés immunomodulatrices différentielles de *G. vaginalis* et du Lcr35 sur les réponses des DC et lymphocytaire T (Test de transformation lymphoblastique et Réaction Leucocytaire Mixte) afin de mieux caractériser les effets propres à chaque souche et de confirmer ou non la pertinence, d'un point de vue immunologique, d'utiliser ce probiotique dans le traitement de la vaginose bactérienne. Par microscopie électronique, nous avons montré que *G. vaginalis* réduisait les capacités d'internalisation des DC en formant des amas, induisant une faible maturation de ces cellules et une faible sécrétion de cytokines anti- et pro-inflammatoires, en testant un large panel par technologie Luminex. De même, sur les lymphocytes T, *G. vaginalis* induisait peu de prolifération et sécrétion de cytokines. Prises ensemble, nos données indiquent que *G. vaginalis* possède *in vitro* des propriétés immunomodulatrices peu intenses contre les DC et les lymphocytes T, induisant une réponse inflammatoire de bas grade, qui pourrait, de manière intéressante, bien concorder avec la clinique atypique de la VB, par nature peu inflammatoire. Au contraire, le Lcr35 est fortement internalisé par les DC conduisant à une maturation dose-dépendante et une sécrétion significative de cytokines essentiellement pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α ...). La prolifération lymphocytaire est significativement augmentée aux faibles concentrations de Lcr35, avec un pic à 10⁵ CFU/mL associé à une production d'IFN- γ , cytokine pro-Th1 et à une activation maximum de l'IDO. Le Lcr35 semble ainsi posséder des propriétés immunostimulatrices importantes et pourrait ainsi induire une réponse pro-inflammatoire, pro-Th1. Pour conclure, ce profil pourrait donc potentiellement être efficace pour lutter localement contre les effets de *G. vaginalis*, en restaurant une réponse inflammatoire au niveau vaginal de meilleure qualité. Cette hypothèse, que nous avons dénommée « effet Booster » reste à confirmer dans des études complémentaires à la fois *in vitro*, chez l'animal, et cliniques. Dans un futur proche, nous avons ainsi prévu de réaliser de nouvelles expériences, , dans lesquelles nous étudierons l'effet de ces deux bactéries dans un modèle de polarisation autologue à partir de DC et de lymphocytes CD4⁺ naïfs, les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans les résultats observés, l'effet de la co-incubation des deux bactéries sur ces mêmes cellules et enfin l'effet de la composante épithéliale grâce à des modèles Transwell® associant les cellules épithéliales aux cellules immunitaires.