



HAL
open science

Rôle des polysaccharides fongiques et du microbiote intestinal dans la clairance digestive de *Candida glabrata*

Rogatien Charlet

► To cite this version:

Rogatien Charlet. Rôle des polysaccharides fongiques et du microbiote intestinal dans la clairance digestive de *Candida glabrata*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS025 . tel-04794983

HAL Id: tel-04794983

<https://theses.hal.science/tel-04794983v1>

Submitted on 21 Nov 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.

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Domaine scientifique : Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et nutrition

Présentée et soutenue publiquement par

Rogatien CHARLET

Le 15 Novembre 2022

**Rôle des polysaccharides fongiques et du microbiote intestinal
dans la clairance digestive de *Candida glabrata***

Thèse dirigée par le Pr. Boualem SENDID et le Dr. Samir JAWHARA

Jury :

Dr. Anne-Judith WALIGORA DUPRIET	Rapporteuse
Dr. Alicia MORENO SABATER	Rapporteuse
Pr. Guillaume BOUGUEN	Président du jury
Pr. Jagadeesh BAYRY	Examineur
Pr. Boualem SENDID	Co-directeur de thèse
Dr. Samir JAWHARA	Co-directeur de thèse

Glycobiology in Fungal Pathogenesis and Clinical Applications
UGSF – UMR 8576 CNRS – INSERM U1285Faculté de Médecine - Pôle Recherche - 1 Place de Verdun – 4^{ème} Epicentre-est 59045 Lille

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier chaleureusement le Professeur Boualem SENDID pour m'avoir donné la possibilité de réaliser une thèse au sein de son laboratoire et de l'avoir co-encadrée. Vous avez également toute ma gratitude pour m'avoir soutenu, encouragé et conseillé sur le plan scientifique et personnel tout au long de ces années. Je tiens aussi à remercier le Dr. Samir JAWHARA pour son encadrement et son investissement, durant ces 4 dernières années, dans le projet et la rédaction de l'article.

Je remercie mes rapporteurs, les Dr. Anne-Judith WALIGORA DUPRIET et Alicia MORENO-SABATER, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et dont je suis sincèrement reconnaissant pour votre investissement ainsi que pour le partage de vos remarques et de votre expertise.

Je remercie le Pr. Jagadeesh BAYRY de participer à ce jury et de pouvoir partager votre savoir ainsi que vos conseils avisés.

J'adresse aussi mes remerciements au Pr. Guillaume BOUGUEN pour avoir accepté de présider ce jury.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont pu participer et contribuer de près ou de loin à ce projet et qui m'ont notamment permis de réaliser de magnifiques rencontres et d'être chaleureusement accueilli.

A Clovis, mon co-équipier, mon ami qui m'accompagne depuis tant d'années dans cette aventure. Tout d'abord, je tiens à te remercier pour ton soutien permanent, pour ton aide et tes conseils techniques tout au long de ce projet ainsi que pour m'avoir supporté chaque jour depuis maintenant plus de 5 ans. Je tiens aussi à te remercier pour tous ces moments passer ensemble riches en souvenir comme ta fameuse apparition à partir d'un carton, les promenades du midi, les défis (le curling de bureau ou encore le ShiFuMi) pour déterminer celui qui fera le café du midi, nos échanges sur « google traduction » et encore tant d'autres moments passés ensemble que ce soit dans ou en dehors du laboratoire... Du fond du cœur, merci à toi, même si comme tu peux le lire, ces quelques phrases ne suffiront pas à te montrer toute l'affection que j'éprouve pour toi.

Au Docteur Karine LECOINTE, dont les quelques mots qui suivent ne seront pas suffisants pour exprimer toute ma gratitude. Merci pour ta présence si précieuse, ta bienveillance, ton expertise, ton implication, tes remarques pertinentes ainsi que pour ton dévouement sans relâche malgré les difficultés rencontrées. Grâce à toi et au temps que tu m'as consacré, ce projet a pu évoluer et se concrétiser. Avec beaucoup d'affection, un immense merci à toi, la maman du laboratoire. Je tiens également à te remercier pour tous ces agréables moments passer dans le laboratoire ainsi qu'en dehors de celui-ci, je pense notamment à tous ces beaux souvenirs partagés ensemble comme les promenades du midi, tes recherches dignes du FBI, ton EVJF, ton mariage, et encore tant d'autres je l'espère...

Au Docteur Faustine DUBAR, je tiens à te remercier d'avoir toujours pris de ton temps pour me conseiller, me rassurer et m'encourager. Merci pour ta gentillesse, ta générosité mais surtout d'être toujours bon public et de rigoler à mes blagues (pas) très raffinées...

A Sabrina, encore merci pour ton soutien et ta gentillesse au cours de nos nombreux échanges ainsi que pour ton travail. Je pense aussi à nos moments de partage sur l'heure du midi à discuter des dernières séries ou films du moment.

A Anne-Marie, la « petite vieille » comme on aime si bien le dire, qui a toujours su trouver les mots pour me faire rire et animer mes journées au laboratoire.

Au Docteur Pauline COULON, merci pour ta bonne humeur, toutes tes petites attentions et ta générosité. Grâce à tes chocolats et tes bonbons, je te pardonne (enfin, pas totalement !) pour la disparition à répétition de mes tic-tacs ! Au Docteur Jordan LEROY, encore merci pour ta gentillesse et tous les fous rires partagés au sein du laboratoire ! Au Docteur Marjorie CORNU, merci pour ton écoute, ton attention, tes conseils et surtout ta bonne humeur. Un grand merci également à Pierre, Camille, Rachid et Caroline pour votre aide tout au long de ce projet.

A Christophe et Matthias, merci pour votre écoute et vos précieux conseils. En écrivant ces quelques lignes, je pense aussi aux fameux « potins » de Christophe qui sont pour la plupart du temps digne de « TPMP » ou encore à la répartie de Matthias qui n'a d'égal que sa gentillesse. Encore un grand merci à vous deux pour tous ces bons moments en espérant qu'ils ne soient que le début d'une longue série.

Je tiens à remercier sincèrement Madjid DJOUINA pour m'avoir partagé son excellente expertise. Auprès de lui j'ai eu grand plaisir à pouvoir discuter, échanger et obtenir de l'aide ainsi que de précieux conseils prodigués tout au long de cette thèse.

A toutes les personnes du laboratoire, de l'unité, des plateformes ou avec qui j'ai pu collaborer et que je n'ai pas pu citer, merci pour tous ces moments passés ensemble ainsi que pour votre participation à ce projet.

A mes parents, merci du fond du cœur de m'avoir soutenu tout au long de mes études, pour vos efforts et vos encouragements ainsi que pour votre confiance qui m'ont permis d'arriver là où je suis aujourd'hui, ce travail et cet aboutissement représentent également votre réussite.

Pascale, à toi que je considère comme ma seconde maman, un grand merci pour ta présence tout au long de mon parcours universitaire ainsi que pour m'avoir donné confiance en moi aussi bien dans ma vie personnelle que professionnelle. Je te remercie également pour ton écoute cruciale et ta présence essentielle pour moi. Comme tu te doutes, tu as toute ma gratitude pour avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Même si malheureusement ces mots et ces quelques phrases ne peuvent exprimer toute la reconnaissance que j'ai pour toi.

A toi ma chérie qui me supporte chaque jour dans les bons ou dans les mauvais moments. Toi qui as su m'épauler tant de fois à travers toutes ces innombrables difficultés. A toi qui a toujours eu confiance en moi, qui a su me rassurer, m'apaiser et me consoler face aux difficultés de la vie en devenant mon plus grand soutien. Merci Valentine pour tout l'amour que tu me transmets et qui me permet chaque jour de me surpasser et d'être un homme comblé.

Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui peut s'expliquer par une dysbiose et une dérégulation de la réponse immune chez des individus génétiquement susceptibles. Des observations expérimentales et cliniques suggèrent le rôle prépondérant de certains microorganismes du microbiote intestinal comme agents pouvant contribuer au déclenchement ou au maintien de l'inflammation associée à la MC. Parmi ces derniers, nous retrouvons les levures commensales du genre *Candida* dont la colonisation digestive est accrue chez les patients atteints de MC. Dans ce contexte, notre équipe étudie le rôle des composants pariétaux fongiques dans la régulation de l'inflammation intestinale. Dans le cas de *Candida glabrata* (*C. glabrata*), ces études montrent que la chitine fongique est capable d'atténuer l'inflammation tout en réduisant la prolifération fongique dans un modèle murin de colite chimio-induite. Dans ce même modèle, nous avons montré que la biodiversité bactérienne intestinale se réduit au fur et à mesure du développement de la colite et que cette diminution est corrélée à une augmentation de la prolifération de *C. glabrata*. De plus, l'ajout de la chitine a pour conséquence de modifier le microbiote intestinal en faveur des bactéries anaérobies : *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Lactobacillus johnsonii*. Par la suite et dans ce même modèle, l'administration orale de ces deux bactéries anaérobies a permis de révéler que celles-ci participent au même titre que la chitine à l'atténuation de l'inflammation intestinale et à la réduction des populations pathobiontes.

Toutefois, les mécanismes qui régissent l'interaction *Candida*-bactéries anaérobies ainsi que les déterminants moléculaires mis en jeu restent à caractériser. La première partie de ce projet a été d'étudier les métabolites impliqués dans l'interaction bactéries anaérobies- cellules épithéliales intestinales coliques de souris. Nos études montrent que l'acide oléique (OA), seul ou combiné avec l'acide palmitique (PA), présente des propriétés anti-inflammatoires notables en réduisant l'expression de plusieurs marqueurs inflammatoires exprimés par les cellules Caco-2 exposées au DSS (Dextran sulfate de sodium). Nos investigations ont également démontré que l'activité de l'OA sur les macrophages induirait une augmentation de l'expression de l'IL-10 et une diminution de divers marqueurs pro-inflammatoires,

probablement en lien avec la reconnaissance de l'OA par les récepteurs FFARs et AhR. Ces AG présentent aussi des propriétés inhibitrices sur la formation du biofilm, l'adhérence et la viabilité fongique. L'ensemble de ces propriétés a été confirmé dans un modèle murin de colite DSS-induite où l'administration orale de ces deux AG atténue les paramètres inflammatoires tout en réduisant la prolifération de *C. glabrata* ainsi que les populations bactériennes pathobiontes.

Dans la seconde partie de ce projet, nos investigations confirment les propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices de la chitine administrée de manière curative (par voie intra-péritonéale) à des souris avec colite DSS-induite. Ce traitement induit une diminution des paramètres inflammatoires (scores clinique et histologique), de l'expression des cytokines et médiateurs pro-inflammatoires conduisant à une diminution des charges fongique et bactérienne aérobie fécales. Les souris, prétraitées avec de la chitine (administrée par voie sous-cutanée) préalablement à leur exposition au DSS, sont protégées contre la colonisation digestive par *C. glabrata*. Bien qu'il s'agisse d'un résultat déterminant, les mécanismes qui régissent la clairance fongique associés à ce traitement restent encore à explorer. Nos données montrent aussi que ce traitement préventif permet d'induire des anticorps dirigés contre la chitine. Cependant et contrairement au traitement curatif, ce traitement ne permet pas de réduire l'inflammation intestinale.

Mots clés : *Candida glabrata* – Inflammation – Microbiote intestinal

Abstract

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory disease of the intestine caused by dysbiosis and dysregulation of the immune response in genetically-susceptible individuals. Experimental and clinical studies suggest that certain microorganisms in the intestinal microbiota play a major role in the triggering or maintenance of inflammation associated with CD. These microorganisms include commensal yeasts of the genus *Candida*, which increase significantly in the digestive tract of patients with CD. In this context, our group studied the role of fungal cell wall components in the regulation of intestinal inflammation. In the case of *Candida glabrata*, these studies showed that fungal chitin is capable of attenuating inflammation while reducing fungal proliferation in a murine model of chemically-induced colitis. In this same model, we also showed that the intestinal bacterial biodiversity decreases gradually as colitis develops and that this decrease is correlated with an increase in proliferation of *C. glabrata*. In addition, the addition of chitin modifies the intestinal microbiota in favour of the anaerobic bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus johnsonii*. As a result, and in this same model, oral administration of these two anaerobic bacteria revealed that they participate in the same way as chitin in the attenuation of intestinal inflammation and the reduction of disease-causing populations.

However, the mechanisms that regulate the interaction between *Candida* and anaerobic bacteria, as well as the molecular determinants brought into play, remain to be characterised. The first part of our work studied the metabolites involved in the interaction between anaerobic bacteria and colonic epithelial cells of mice. These studies showed that oleic acid (OA), alone or combined with palmitic acid (PA), had notable anti-inflammatory properties by reducing the expression of several inflammatory markers expressed by Caco-2 cells exposed to DSS (dextran-sulphate sodium). Our investigations also demonstrated that the action of OA on macrophages induced an increase in expression of IL-10 and a decrease in diverse pro-inflammatory markers, probably linked to the recognition of OA by the receptors FFARs and AhR. These fatty acids also had inhibitory properties on biofilm formation, adherence and fungal viability. All of these properties were confirmed in a murine model of DSS-induced colitis where the oral administration of these two fatty acids

attenuated inflammation by reducing the proliferation of *C. glabrata* and disease-causing bacterial populations.

In the second part of this project, our investigations confirmed the anti-inflammatory and immunomodulating properties of chitin administered curatively (by intra-peritoneal administration) to mice with DSS-induced colitis. This treatment induced a decrease in inflammatory parameters (clinical and histological scores) and the expression of cytokines and pro-inflammatory mediators, leading to a decrease in the fungal and aerobic bacterial load in the faeces. Mice, pretreated with chitin (administered subcutaneously) prior to their exposure to DSS, were protected against digestive colonisation by *C. glabrata*. Although this is a significant result, the mechanisms that lead to fungal clearance associated with this treatment are unknown. Our data show that this preventive treatment induces antibodies directed against chitin. However, and contrary to curative treatment, this treatment does not reduce intestinal inflammation.

Key words : *Candida glabrata* - Inflammation - Intestinal microbiota

Sommaire

Remerciements	3
Résumé.....	5
Abstract	7
Sommaire	9
Liste des abréviations.....	15
Liste des figures.....	18
Introduction.....	22
Partie 1 : Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	22
1. Généralités	22
2. Épidémiologie.....	24
3. Symptomatologie, diagnostic, prise en charge thérapeutique	25
4. Les marqueurs diagnostiques.....	29
5. Facteurs étiologiques	30
A. Facteurs environnementaux	31
B. Facteurs génétiques	33
a. Mutation du gène « NOD2/CARD15 ».....	34
b. Mutations des gènes « Toll-like Receptors ».....	35
c. Autres mutations génétiques corrélées au risque accru de MICI	36
C. Facteurs immunitaires.....	36
D. L'implication du microbiote intestinal.....	37
Partie 2 : Le microbiote intestinal	39
1. Généralités	39
2. Evolution du microbiote au cours de la vie.....	40
3. Rôle et fonction de ce microbiote	43
4. Le microbiote intestinal et les pathologies associées	44
5. Modification de la biodiversité bactérienne chez les patients atteints de MICI.....	45
A. Les espèces pathobiontes	46
B. Les espèces probiotiques/protectrices	48
Partie 3 : Les métabolites et le microbiote intestinal	51
1. Généralités	51
2. Le tryptophane	53
3. Les acides gras	54
A. La structure des acides gras	55
B. La biosynthèse des acides gras chez les animaux	56

C.	Apport de ces acides gras sur la composition du microbiote et sur la santé.....	58
4.	Les acides gras à chaîne courte	61
5.	Les acides gras à chaîne moyenne	64
6.	Les acides gras à chaîne longue.....	66
A.	Les acides gras saturés	66
B.	Les acides gras monoinsaturés.....	67
C.	Les acides gras polyinsaturés	69
D.	Les acides gras « trans »	72
Partie 4 :	<i>Candida spp</i>	74
1.	Généralités	74
2.	Physiopathologie des candidoses.....	75
3.	Les facteurs de virulence.....	76
A.	Les facteurs de virulence de <i>C. albicans</i>	77
B.	Les facteurs de virulence de <i>C. glabrata</i>	78
4.	Immunité de l'hôte face à <i>Candida</i>	80
A.	Le système immunitaire inné	81
B.	Le système immunitaire adaptatif.....	84
a.	Le système immunitaire adaptatif à réponse cellulaire	84
b.	Le système immunitaire adaptatif à réponse humorale	85
5.	Mécanismes d'évasion de <i>Candida</i> face aux défenses de l'hôte	86
6.	La paroi fongique : composition et fonction	88
A.	Le mannane	89
B.	Le β -glucane.....	90
C.	La chitine	91
7.	Développement des vaccins et d'immunothérapies à partir des composants de la paroi fongique.....	92
Objectifs de la thèse		94
Matériels et méthodes		96
1.	Souches fongiques et conditions de culture	96
2.	Lignées cellulaires Caco-2 et THP-1.....	96
3.	Extraction et purification des ARNm	96
4.	Synthèse d'ADN complémentaire par RT-PCR	97
5.	q-PCR	97
6.	Étude des propriétés anti-inflammatoires des acides gras	98
A.	Détection des métabolites bactériens (<i>ex-vivo</i>) : GC-MS.....	98

B.	Mise au point d'un modèle Caco-2 mimant une barrière épithéliale intestinale traitée au DSS	98
a.	MTT Assay.....	98
b.	Microscopie optique.....	99
c.	Expression des gènes de certaines cytokines pro-inflammatoires des cellules Caco-2 traitées avec diverses concentrations en DSS.....	99
d.	Expression des gènes de certaines cytokines pro-inflammatoires des cellules Caco-2 traitées à 1.5% de DSS et ce, en présence ou non des acides gras.....	99
e.	Migration des macrophages à travers une barrière épithéliale Caco-2 traitée à diverses concentrations en DSS.....	100
f.	Migration des macrophages à travers une barrière épithéliale Caco-2 traitée 24h avec 1.5% de DSS et les acides gras.....	100
C.	Expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires et de certains récepteurs des macrophages dérivés de la lignée cellulaire THP-1.....	101
D.	ELISA des cytokines pro-inflammatoires des macrophages.....	101
7.	Étude des propriétés antifongiques des acides gras.....	102
A.	Adhérence de <i>C. glabrata</i> ATCC 2001 sur une lignée cellulaire Caco-2.....	102
B.	Viabilité de <i>C. albicans</i> CEC749 <i>Gluc</i> en présence des acides gras.....	102
C.	Viabilité de <i>C. glabrata</i> en présence des acides gras.....	103
D.	Evolution du biofilm de <i>Candida spp</i> en présence des acides gras.....	103
8.	Expérimentations animales réalisées au cours de l'étude.....	103
A.	Animaux.....	103
B.	Procédures générales.....	104
a.	Procédures générales concernant le traitement avec les acides gras.....	104
1)	Inoculation de <i>C. glabrata</i> , des acides gras et induction de la colite chimio-induite par DSS.....	104
b.	Procédures générales concernant les traitements avec la chitine fongique.....	105
1)	Extraction de la chitine.....	105
2)	Inoculation de <i>C. glabrata</i> , de la chitine et induction de la colite chimio-induite lors de la 1 ^{ère} procédure.....	105
3)	Inoculation de <i>C. glabrata</i> , de la chitine et induction de la colite chimio-induite lors de la 2 ^{nde} procédure.....	106
4)	Purification des IgG murines.....	107
5)	Détection et quantification des IgG murines.....	107
6)	Reconnaissance de la chitine par les IgG murines par test ELISA.....	108
7)	Effet des anticorps murins sur la modulation de l'expression de récepteurs, médiateurs et cytokines exprimés par les macrophages.....	108
C.	Recueil des données.....	109

D.	Détermination du score clinique	110
E.	Score histologique	110
F.	Coloration des coupes histologiques.....	111
G.	Colonisation de <i>C. glabrata</i> au sein du tube digestif	111
H.	Purification des ARNm issus du côlon murin.....	112
9.	Analyses statistiques	112
Partie 1 : Étude des propriétés antifongiques et anti-inflammatoires présentées par l'acide oléique et l'acide palmitique issus de l'interaction des bactéries « <i>B. thetaiotaomicron</i> » et « <i>L. johnsonii</i> » avec des cellules épithéliales de côlon murin.		113
Résultats.....		114
A)	Caractérisation des acides gras et étude de leurs propriétés anti-inflammatoires	114
1.	Caractérisation et identification des acides gras provenant de l'interaction de <i>B. thetaiotaomicron</i> et <i>L. johnsonii</i> avec des cellules épithéliales de côlon murin.....	114
2.	Effet du traitement par DSS sur la viabilité des cellules Caco-2.....	115
3.	Observation au microscope des cellules Caco-2 traitées par DSS.....	116
4.	Modulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires exprimées par les cellules Caco-2 traitées avec du DSS	118
5.	Mise au point du modèle permettant la migration des macrophages vers <i>C. albicans</i> à travers une barrière épithéliale traitée avec du DSS	119
6.	Effet des acides gras sur la modulation de l'expression des cytokines inflammatoires exprimées par les cellules Caco-2 exposées au DSS.....	120
7.	Effet des acides gras sur la migration des macrophages vers <i>C. albicans</i> à travers une barrière épithéliale de cellules Caco-2 soumises à 1,5 % de DSS.....	122
8.	Effet des acides gras sur la modulation de l'expression des cytokines, des médiateurs et des récepteurs impliqués dans les voies de signalisation inflammatoire des macrophages	123
9.	Effet des acides gras sur les taux protéiques de TNF α , d'IL-6 et d'IL-1 β sécrétés par les macrophages	127
10.	Effet des acides gras sur l'interaction entre <i>C. glabrata</i> et les cellules épithéliales	129
B)	Détermination des propriétés antifongiques des acides gras.....	130
1.	Rôle des acides gras sur la viabilité de <i>Candida spp.</i>	130
2.	Rôle des acides gras sur le biofilm de <i>Candida spp.</i>	131
C)	Rôle des acides gras sur l'élimination de <i>C. glabrata</i> et sur la modulation de l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS.....	133
1.	Évaluation des effets des AG sur les paramètres inflammatoires à travers un modèle murin de colite chimio-induite par DSS	133
2.	Caractérisation de la charge fongique dans les selles et les organes des animaux sous DSS et recevant du <i>C. glabrata</i> seul ou en présence d'un traitement par AG	136
3.	Détermination de la charge bactérienne dans les selles de souris sous colite DSS-induite et recevant du <i>C. glabrata</i> seul ou en présence d'un traitement par AG	137

4. Effets des acides gras sur la modulation de l'expression des récepteurs de l'immunité, des facteurs de signalisation et des cytokines inflammatoires exprimés dans le côlon des souris avec colite chimio-induite par DSS	138
Discussion	140
Conclusions et perspectives	146
Partie 2 : Analyse de l'effet d'un traitement par chitine fongique sur l'élimination de <i>C. glabrata</i> et sur l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite chimio-induite.....	150
Résultats.....	151
A) Effet(s) du traitement curatif avec de la chitine sur l'élimination de <i>C. glabrata</i> et sur l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite chimio-induite.....	151
1. Évaluation des effets d'un traitement curatif par la chitine sur les paramètres inflammatoires à travers un modèle murin de colite chimio-induite par DSS.....	151
2. Détermination de la charge fongique dans les selles et dans les organes des animaux avec colite chimio-induite et traités de manière curative par la chitine.....	153
3. Détermination de la charge bactérienne dans les selles des animaux sous colite chimio-induite et traités de manière curative par la chitine.....	154
4. Effet d'un traitement curatif par la chitine sur la modulation de l'expression des cytokines et des récepteurs exprimés au sein du côlon murin et impliqués dans la réponse inflammatoire de l'hôte.....	156
5. Purification et détection des anticorps de type IgG issus de souris sous DSS et ayant reçu un traitement curatif par la chitine	157
6. Reconnaissance de la chitine par les anticorps murins de type IgG issus de souris sous DSS et traités de manière curative par la chitine	159
B) Effet(s) du traitement préventif avec de la chitine sur l'élimination de <i>C. glabrata</i> et sur l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite chimio-induite.....	160
1. Évaluation des effets d'un traitement préventif par la chitine sur les paramètres inflammatoires à travers un modèle murin de colite chimio-induite par DSS.....	160
2. Détermination de la charge fongique dans les selles et dans les organes des animaux avec une colite chimio-induite et traitées de manière préventive par la chitine	162
3. Détermination de la charge bactérienne dans les selles des animaux sous colite chimio-induite et traités de manière préventive par la chitine	163
4. Effet du traitement préventif par la chitine sur la modulation de l'expression des cytokines, des médiateurs et des récepteurs exprimés au sein du côlon murin et impliqués dans la réponse inflammatoire de l'hôte.....	165
5. Analyse des populations de cellules T régulatrices spléniques, de la modulation de l'expression de FOXP3 au niveau colique des souris sous colite chimio-induite et traitées de manière préventive par la chitine	167
6. Purification et détection des anticorps de type IgG issus de souris sous DSS et ayant reçu un traitement préventif par la chitine.....	168
7. Reconnaissance de la chitine par les anticorps murins de type IgG issus de souris sous DSS et traités de manière préventive par la chitine.....	169

8. Effet des anticorps IgG murins sur la modulation de l'expression des cytokines, des médiateurs et des récepteurs impliqués dans les voies de signalisation inflammatoire des macrophages	169
Discussion	172
Conclusions et perspectives	177
Bibliographie.....	182
Annexes	232
1. Annexe 1 : Communications.....	232
2. Annexe 2 : Article publié dans <i>Microorganisms</i> ⁵⁴⁷ :	233
3. Annexe 3 : Séquence des amorces humaines et murines	258

Liste des abréviations

ACCA : Anti-chitobioside carbohydrate antibodies

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AG : Acide gras

AGCC : Acide gras à chaîne courte

AGCL : Acide gras à chaîne longue

AGCM : Acide gras à chaîne moyenne

AhR : Récepteur d'aryl hydrocarbure

AIEC : *E. coli* adhérents et invasifs

ALCA : Anti-laminaribioside carbohydrate antibodies

Als : Agglutinin like sequences

AMCA : Anti-mannobioside carbohydrate antibodies

AMPK : AMP-activated protein kinase

ARN : Acide ribonucléique

ASCA : Anti-*saccharomyces cerevisiae* antibodies

ATG16L1 : *Autophagy related 16 like 1*

ATP : Adénosine triphosphate

B. fragilis : *Bacteroides fragilis*

β -Man : β -1,2 oligomannosides

BSA : Bovine serum albumin

B. thetaiotaomicron : *Bacteroides thetaiotaomicron*

C. albicans : *Candida albicans*

CARD : Caspase recruitment domain

CCR : Cancer colorectal

C. difficile : *Clostridium difficile*

C. glabrata : *Candida glabrata*

Chi3L1 : Chitinase 3 like protein 1

CI : Candidoses invasives

CLRs : Lectines de type C

COX-2 : Cyclo-oxygénase-2

CRP : Protéine C-réactive

DAEC : *E. coli* à adhésion diffuse

DC-SIGN : Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

DHA : Acide docosahexaénoïque

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DSS : Dextran sulfate de sodium

EAEC : *E. coli* entéroagréatifs

E. coli : *Escherichia coli*

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

EIEC : *E. coli* entéroinvasifs

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EPA : Acide eicosapentaénoïque

EpA : Epithelial adhesin

EPEC : *E. coli* entérotoxigènes

ETEC : *E. coli* entérotoxigènes

FFAR : Free fatty acid receptor

F. nucleatum : *Fusobacterium nucleatum*

FOXP3 : forkhead box P3

F. prausnitzii : *Faecalibacterium prausnitzii*

GlcNAc : N-acétyl-glucosamine

GM-CSF : Granyocyte-macrophages colony stimulating factor

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GRP : G-protein coupled receptor

H. pylori : *Helicobacter pylori*

Hwp1 : Hyphal wall protein 1

Hyr1 : Hyphally regulated 1

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intercellulaire 1

IFN γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

IVIg : Immunoglobulines polyvalentes intraveineuses

IL : Interleukine

KO : Knock out

L. johnsonii : *Lactobacillus johnsonii*

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : Leucine-rich repeat

GWAS : Genome-wide association studies

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MC : Maladie de Crohn

MDP : Muramyl di-peptide

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MR : Récepteur de mannose

n-3 : oméga-3

n-6 : oméga-6

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NBD : Nucleotide-bonding domain

NETs : Neutrophil extracellular traps

NF- κ B : Nuclear factor kappa B

NK : Natural killer

NLRP3 : NOD, LRR and pyrin domain-containing protein 3

NOD2/CARD15 : *Nucleotide-binding oligomerization domain 2/Caspase-activating recruitment domain 15*

OA : Acide oléique

PA : Acide palmitique

PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns

pANCA : Deoxyribonuclease Dnase-I sensitive perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic-autoantibody

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

PBS : Phosphate buffer saline

PCR : Polymerase chain reaction

PLM : Phospholipomannane

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

PPM : Phosphopeptidomannane

Pra1 : pH-regulated antigen 1

PRRs : Pattern recognition receptors

RCH : Rectocolite hémorragique

RIP2 : Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2

RIPK : Receptor-interacting protein kinase

ROS : espèces réactive de l'oxygène

RPMI : Roswell park memorial institute medium

SAPs : Secreted aspartyl proteinases

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SFB : Segmented Filamentous Bacterium

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SNP : Single nucleotide polymorphism

SPI : Souches pathogènes intestinales

SPE : Souches pathogènes extra-intestinales

STEC : *E. coli* producteurs de Shiga-toxines

SVF : Sérum de veau foetal

TG : Triglycérides

THP-1 : Human macrophage-like cell line

TLR : Toll-like receptor

TNBS : Acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique

TNF α : Tumor necrosis factor α

T reg : T régulatrice

UFC : Unité formant colonie

Liste des figures

Figure 1 : Schéma synthétique de la classification de Montréal fondée sur l'âge au diagnostic, la localisation et le phénotype clinique des lésions.

Figure 2 : Schéma représentatif des différents facteurs influençant le microbiote intestinal tout au long de la vie amenant à une « dysbiose » et au développement des MICI.

Figure 3 : Modulation du microbiote intestinal de la gestation à l'enfance en présence des divers facteurs (prénataux, néo-nataux et post-nataux) déterminants pour son développement et sa composition.

Figure 4 : Schéma des interactions possibles entre le microbiote intestinal et les fibres alimentaires lipidiques et les conséquences sur la physiologie de l'hôte.

Figure 5 : Structure chimique du tryptophane.

Figure 6 : Structure et conformation des acides gras.

Figure 7 : Biosynthèse des acides gras chez les animaux.

Figure 8 : Illustration de l'apport alimentaire en acide gras chez l'Homme.

Figure 9 : Principaux acides gras saturés à chaîne courte.

Figure 10 : Principaux acides gras à chaîne moyenne.

Figure 11 : Principaux acides gras saturés à chaîne longue.

Figure 12 : Illustration de la biosynthèse des acides gras monoinsaturés à chaîne longue.

Figure 13 : Principaux acides gras monoinsaturés à chaîne longue.

Figure 14 : Métabolismes des acides gras polyinsaturés n-3 et n-6.

Figure 15 : Répartition des espèces de levures retrouvées au sein d'isolats cliniques.

Figure 16 : Illustration des stratégies d'invasion de *C. albicans* et de *C. glabrata*.

Figure 17 : Illustration des mécanismes d'échappement de *C. albicans* et *C. glabrata* face aux défenses de l'hôte.

Figure 18 : Organisation structural de la paroi cellulaire de *C. albicans*.

Figure 19 : Structure chimique de la chitine.

Figure 20 : Schéma de la migration des macrophages à travers une barrière épithéliale Caco-2 traitée au DSS vers *C. albicans*.

Figure 21 : Schéma du modèle expérimental de la première procédure.

Figure 22 : Schéma du modèle expérimental de la seconde procédure.

Figure 23 : Schéma du recueil des données concernant le modèle murin.

Figure 24 : Données représentatives de l'analyse obtenue par GC-MS.

Figure 25 : Mesure par MTT de la viabilité des cellules Caco-2 traitées par DSS à diverses concentrations.

Figure 26 : Observation des cellules épithéliales Caco-2, traitées avec du DSS à différentes concentrations, après 2h et 24h par l'intermédiaire d'un microscope optique (Gx20).

Figure 27 : Variation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires des cellules Caco-2 exposées au DSS.

Figure 28 : Migration des macrophages, à travers une membrane semi-perméable de cellules épithéliales Caco-2 traitées par DSS, vers *C. albicans* contenue dans le compartiment inférieur.

Figure 29 : Évaluation de la modulation de l'expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires par différentes concentrations en AG dans le modèle de cellules Caco-2 traitées au DSS.

Figure 30 : Effet des acides gras utilisés individuellement ou de façon combinée sur la modulation de l'expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires dans les cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS.

Figure 31 : Migration des macrophages vers *C. albicans* à travers des cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS et traitées avec les acides gras.

Figure 32 : Expression des récepteurs et médiateurs inflammatoires exprimés dans les macrophages exposés à du LPS et traités par les acides gras.

Figure 33 : Expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires exprimées dans les macrophages exposés à du LPS et traités par les acides gras.

Figure 34 : Effet des acides gras sur les niveaux protéiques de TNF α , d'IL-6 et d'IL-1 β sécrétées par les macrophages exposés ou non à du LPS.

Figure 35 : Effet des acides gras sur la capacité d'adhérence de *C. glabrata* sur les cellules épithéliales Caco-2.

Figure 36 : Effet des acides gras sur la viabilité de *Candida spp.*

Figure 37 : Effet des acides gras sur la production des biofilms de *Candida spp.*

Figure 38 : Effets des acides gras sur les paramètres inflammatoires dans un modèle de colite chimio-induite par DSS.

Figure 39 : Effet des acides gras sur l'élimination de *C. glabrata* dans le tractus digestif lors d'une colite chimio-induite par DSS.

Figure 40 : Détermination des populations bactériennes fécales viables après traitement par les acides gras chez des souris atteintes de colite chimio-induite par DSS.

Figure 41 : Expression des récepteurs, des médiateurs et des cytokines dans le côlon des souris sous colite chimio-induite par DSS et traitées avec les acides gras.

Figure 42 : Schéma de synthèse des effets observés après administration orale des acides gras sur l'inflammation intestinale, les variations du microbiote intestinal ainsi que sur la colonisation de *C. glabrata* dans un modèle murin de colite chimio-induite.

Figure 43 : Effets du traitement curatif par la chitine sur les paramètres inflammatoires dans un modèle de colite chimio-induite par DSS.

Figure 44 : Effet du traitement curatif par la chitine sur la colonisation de *C. glabrata* au sein des souris sous colite induite par DSS.

Figure 45 : Evolution de la charge des populations bactériennes fécales des souris sous colite induite par DSS et traitées de manière curative par la chitine.

Figure 46 : Expression des récepteurs et des médiateurs intestinaux ainsi que des cytokines produites dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS et traité de manière curative par la chitine.

Figure 47 : Détection par SDS-PAGE des IgG totales murines purifiées à partir du sérum de souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine.

Figure 48 : Analyse par ELISA de la réponse anticorps anti-chitine (IgG totales) purifiées à partir des sérums des souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine.

Figure 49 : Effets du traitement préventif par la chitine sur les paramètres inflammatoires dans un modèle de colite chimio-induite par DSS.

Figure 50 : Effet du traitement préventif par la chitine sur la colonisation de *C. glabrata* au sein des souris sous colite induite par DSS.

Figure 51 : Evolution des populations bactériennes fécales au cours de la colite chimio-induite par DSS après traitement préventif avec de la chitine.

Figure 52 : Expression des récepteurs et des médiateurs intestinaux ainsi que des cytokines inflammatoires dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS et traité de manière préventive par la chitine.

Figure 53 : Variation des populations des cellules T régulatrices spléniques ainsi que de l'expression de FOXP3 colique des souris sous DSS et traitées de manière préventive avec la chitine.

Figure 54 : Détection par SDS-PAGE et Dot-blots des IgG totales murines purifiées à partir du sérum de souris sous DSS et traitées de manière préventive par la chitine.

Figure 55 : Analyse par ELISA de la réponse anticorps anti-chitine (IgG totales) purifiées à partir des sérums des souris sous DSS et traitées de manière préventive par la chitine.

Figure 56 : Expression des récepteurs, des médiateurs et des cytokines qui sont exprimés par les macrophages exposés au LPS et traités aux anticorps murins.

Figure 57 : Schéma de synthèse des effets d'une administration curative avec la chitine sur l'inflammation intestinale, le microbiote intestinal et la colonisation de *C. glabrata* dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS.

Figure 58 : Schéma de synthèse des effets d'une administration préventive avec la chitine sur l'inflammation intestinale, le microbiote intestinal et la colonisation de *C. glabrata* dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS.

Partie 1 : Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

1. Généralités

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des maladies avec un désordre chronique dû à une dérégulation de la réponse immune aux composants du microbiote intestinal, chez des individus génétiquement susceptibles¹⁻⁵. Parmi ces maladies, la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont deux formes de MICI qui se caractérisent toutes les deux par une inflammation de la paroi du tube digestif et sont le plus souvent diagnostiquées chez des sujets jeunes, âgés de 20 à 30 ans⁶⁻⁸. Néanmoins, la RCH et la MC diffèrent en termes de physiopathologie et de localisation des lésions tissulaires au sein du tractus digestif ainsi qu'en termes de complications, de gestion et d'évolution de la maladie⁵.

Dans le cas de la RCH, l'inflammation est localisée uniquement au niveau du rectum et peut s'étendre au côlon avec des lésions continues et une inflammation superficielle limitée à la muqueuse, entraînant des érosions, des ulcères et des diarrhées sanglantes⁵.

En ce qui concerne la MC, elle fut découverte en 1932 par un médecin américain, Burill B. Crohn, qui décrit 14 cas d'affection localisée au niveau terminal de l'iléon⁹. Cette maladie se caractérise par une activation exacerbée du système immunitaire comprenant des phases de poussée et des phases de rémission causant une inflammation chronique, récurrente ainsi que des lésions tissulaires. Celles-ci peuvent être localisées sur l'ensemble du tractus digestif au niveau de divers segments, allant de la bouche jusqu'à l'anus. Néanmoins, les segments préférentiels des lésions se limitent au niveau de l'iléon terminal, du côlon et de l'anus. Ces lésions sont discontinues sur toute l'épaisseur de la paroi intestinale dont notamment des lésions précoces nommées « ulcération aphtoïde », causées par la nécrose des

cellules M au niveau des plaques de Peyer, qui par la suite provoquent des ulcérations superficielles ou profondes amenant à la formation d'abcès et de fistules^{5,6}.

Les crises sont sévères chez 15 à 20 % des patients atteints de MICI et peuvent imposer une hospitalisation, un arrêt de l'alimentation et un traitement sous perfusion pendant plusieurs jours avec un fort impact sur la vie personnelle et professionnelle. Ces maladies peuvent aussi être à l'origine de cancer colorectal (CCR), notamment en présence de lésions coliques. En effet, les facteurs inflammatoires qui en découlent comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS ; reactive oxygen species), les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines contribuent à la croissance et à la propagation des cellules tumorales^{10,11}.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes principalement intéressés à la MC en raison de plusieurs observations expérimentales et cliniques qui ont permis de suggérer que *Candida albicans* (*C. albicans*) agirait comme agent pouvant contribuer au déclenchement et/ou au maintien de l'inflammation intestinale associée à la MC. En effet, notre équipe a pu mettre en évidence i) qu'un taux anormalement élevé d'anticorps anti-levures est retrouvé chez les patients atteints de la MC ; ii) que ce taux d'anticorps est corrélé avec la sévérité de la maladie ; iii) et qu'une colonisation digestive accrue par *Candida spp.* est retrouvée chez des patients atteints de la MC ainsi que chez leurs parents sains du premier degré¹²⁻¹⁴. Or, il faut souligner que les espèces du genre *Candida* interagissent avec les cellules de l'hôte par l'intermédiaire de leur paroi. Une structure dynamique, stratifiée et complexe composée essentiellement de polysaccharides compacts et fibrillaires associés à des protéines et des lipides¹². Dans ce contexte, nous avons exploré le rôle de la chitine issue de cette paroi dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS en présence de *C. glabrata*. Au cours de cette étude expérimentale, les souris sous traitement ont conservé une biodiversité du microbiote intestinal cultivable proche de celle retrouvée chez les souris contrôles (sans inflammation) notamment pour *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. thetaiotaomicron*) et *Lactobacillus johnsonii* (*L. johnsonii*)¹⁵. Il s'agit de bactéries possédant une activité bénéfique lors des colites ulcératives mais également protectrice vis-à-vis de la colonisation par *Candida*¹⁶⁻¹⁸.

Pour aller plus loin, nous avons démontré que ces deux bactéries sont également capables d'interagir directement avec *Candida* en induisant notamment une dégradation de la paroi fongique *via* des activités de type chitinase ou mannosidase favorisant l'inhibition de la croissance fongique. Nos données ont aussi montré que l'administration de ces bactéries par voie orale dans un modèle murin de colite chimio-induite atténue le développement de l'inflammation intestinale et réduit la prolifération des populations d'*Escherichia coli* (*E. coli*), d'*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) et de *C. glabrata*¹⁹. Il faut aussi souligner que des études ont démontré que ces bactéries sont également capables d'inhiber la formation du biofilm de *C. albicans* grâce à des médiateurs moléculaires^{20,21}. Néanmoins, malgré la mise en évidence d'interactions entre les espèces du genre *Candida* et les espèces bactériennes du microbiote intestinal, de nombreux déterminants moléculaires régissant ces interactions restent encore à caractériser. Par ailleurs, les propriétés biologiques exercées par la chitine, les mécanismes d'action et les interactions mettant en jeu l'immunité restent également mal définis. L'objectif de cette thèse est d'explorer l'interaction *Candida*-hôte d'une part et d'étudier l'implication du microbiote intestinal et de ses métabolites sur l'inflammation intestinale, d'autre part.

2. Épidémiologie

La prévalence des MICI s'est fortement accentuée au cours du dernier siècle notamment dans les pays occidentaux industrialisés, tels que les États-Unis et les pays d'Europe de l'ouest, où elle s'est multipliée par trois depuis les années 1970²². De nos jours, la répartition des maladies est discontinue dans le monde et ce sont les pays industrialisés qui sont le plus affectés par les MICI avec 1,5 millions de personnes aux USA, 2,5 millions en Europe et 75000 en Australie²³. En termes d'incidence annuelle, les MICI touchent de 0,25 à 13,3/100 000 personnes en Amérique du Nord et en Europe. En Europe, l'incidence de la MC est caractérisée par un gradient Nord-Sud avec 80 % des cas suivis dans les hôpitaux du nord de ce continent. Ces maladies surviennent à n'importe quel âge mais affectent le plus souvent les adultes jeunes (de 20 à 30 ans)^{1,2,7,24,25}. Cette incidence est également en augmentation pour les pays adoptant le mode de vie occidental^{8,26,27}. De nombreuses études ne montrent pas de différence d'incidence entre les sexes pour

les pays occidentaux à l'inverse des pays asiatiques où l'incidence de la MC est plus élevée chez l'homme^{8,28-31}. De plus, une étude a également mis en avant que les immigrés ou leur progéniture provenant de pays à faible risque de MICI et ayant migrés vers des pays à fort risque, acquièrent le même risque de développer la maladie que les personnes du pays de résidence^{1,2,26,32}.

En France, un registre INSERM dédié aux MICI dénommé registre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin du Nord-Ouest (EPIMAD) a vu le jour en 1988. Ce registre couvrant 6 millions d'habitants soit 9,3 % de la population française est l'un des plus importants en Europe³³⁻³⁵. L'intérêt de ce registre, créé il y a plus de 34 ans, est de : i) mieux connaître la fréquence de la maladie qui est en perpétuelle évolution surtout chez l'adolescent ; ii) mieux connaître l'hétérogénéité spatiale sur le territoire national pour isoler les zones épidémiques dites « clusters » afin de pouvoir monter des études permettant d'identifier les facteurs de risque environnementaux associés aux MICI (Source EPIMAD). Par ailleurs, même si les MICI peuvent se déclencher à n'importe quel moment de la vie, leurs phénotypes diffèrent selon l'âge. Bien que l'étiologie de ces maladies reste à ce jour inconnue, cette hétérogénéité semble suggérer qu'il s'agit de maladies multifactorielles avec une contribution de facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux^{2,36}.

3. Symptomatologie, diagnostic, prise en charge thérapeutique

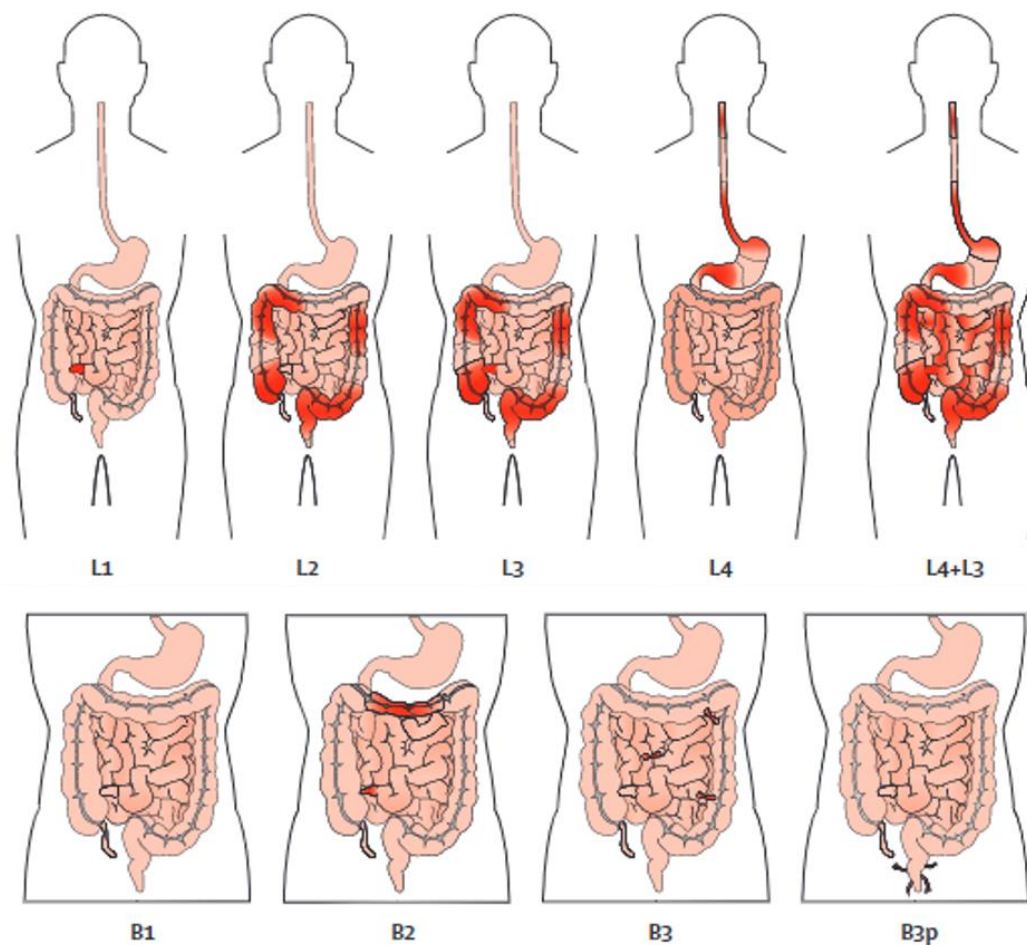
Les MICI évoluent sous la forme de poussées inflammatoires, entrecoupées de phases de rémission, de durée et de fréquence variables selon les patients. La maladie affecte principalement le tractus digestif avec des symptômes essentiellement au niveau intestinal. Elles se caractérisent souvent par des symptômes typiques tels que des douleurs abdominales et des diarrhées, parfois sanglantes et très fréquentes lors des phases de poussée ou encore par une atteinte de la région anale se traduisant par des fissures, des abcès ou des fistules. L'évolution de la maladie peut amener au rétrécissement du segment intestinal atteint, puis à une occlusion ou à un abcès conduisant à la formation d'une fistule. Ces divers symptômes ont pour conséquence d'altérer la qualité de vie des patients et peuvent être accompagnés par d'autres symptômes tels que la fatigue, la fièvre,

l'anorexie et parfois même des symptômes extra-intestinaux au niveau articulaire, hépatique, cutané et oculaire^{5,37}. Par ailleurs, de par leur inflammation chronique au niveau intestinal, les MICI sont associées à un risque accru de développer un CCR^{10,38}.

Ces maladies présentent des symptômes communs rendant difficile leur diagnostic différentiel. Leur diagnostic repose donc sur un panel d'arguments cliniques, radiologiques, endoscopiques, histologiques et biologiques³⁹. Ainsi, lorsque des symptômes cliniques suggèrent un risque de MICI, un bilan biologique (non invasif) doit être réalisé afin de détecter des carences nutritionnelles, la présence de marqueurs spécifiques ou de doser des marqueurs inflammatoires sériques ou fécaux (voir la section : « Les marqueurs diagnostiques »). En cas de suspicion d'inflammation intestinale, un examen d'endoscopie digestive permet alors de rechercher la présence et la localisation des lésions tissulaires et de collecter quelques biopsies pour un examen histologique approfondi en vue d'une prise en charge thérapeutique différenciée selon que le patient présente une RCH ou une MC^{36,39}. En dépit des localisations préférentielles de la RCH, il est parfois difficile de la différencier d'une MC extensive ayant un phénotype grélo-colique ou colique pur. De ce fait, dans environ 10 % des cas, la classification de ces formes reste incertaine. Ces formes sont dénommées les « colites indéterminées ». Il existe d'ailleurs un consensus international sur les modalités de classification des MICI, selon l'âge du patient lors du diagnostic, la localisation et le phénotype des lésions tissulaires (**Figure 1**). Ces patients bénéficient également d'un bilan d'extension à la recherche de manifestation extra-intestinale et des maladies auto-immunes associées³⁹.

Dans la grande majorité des cas, un contrôle de ces maladies pendant plusieurs années est assuré par des médicaments anti-inflammatoires dont le but est de prévenir l'apparition des phases de poussée, d'éviter les récurrences et de prolonger les phases de rémission *via* la cicatrisation accrue des lésions. Ces traitements fondés essentiellement sur les dérivés 5-aminosalicylés permettent de gérer les phases de poussée au cours des RCH. Dans le cas de la MC, il n'existe aucun traitement étiologique, le traitement est avant tout symptomatique et anti-

inflammatoire. L'objectif des traitements est de traiter les poussées et de favoriser une rémission clinique afin de prévenir les récurrences. Ce traitement doit tenir compte du phénotype clinique de la maladie et de sa localisation. En ce qui concerne les poussées, on utilise en première intention les aminosalicylés et les corticostéroïdes (pendant une courte durée). En cas de corticorésistance et dans les formes graves, on peut avoir recours aux immunomodulateurs (azathioprine) ou à des biothérapies (comme par exemple l'infliximab ou remicabe pour l'anti-TNF α). En ce qui concerne les traitements préventifs des rechutes, on utilise préférentiellement les immunomodulateurs et les biothérapies pour favoriser une rémission clinique. Malheureusement, ces traitements peuvent s'avérer insuffisants en raison de phénomènes d'immunisation que certains patients développent contre ces molécules « chimériques ». Ainsi, dans certains cas de MC, le recours à la chirurgie est inévitable en raison de complications tissulaires ou de résistances à ces traitements innovants^{5,39-41}.



Age au diagnostic	A1	≤ 16 ans
	A2	16 à 40 ans
	A3	≥ 40 ans
Localisation	L1	Iléale
	L2	Côlon
	L3	Iléo-colique
	L4	Segment haut du tube digestif
Forme	B1	Non sténosante / Non pénétrante
	B2	Sténosante
	B3	Pénétrante

Figure 1 : Schéma synthétique de la classification de Montréal fondée sur l'âge au diagnostic, la localisation et le phénotype clinique des lésions, figure adaptée d'après Baumgart DC & Sandborn WJ, 2012³⁹ et Silverberg MS *et al.*, 2005⁴².

4. Les marqueurs diagnostiques

La recherche de marqueurs sériques spécifiques et non invasifs représente un intérêt majeur pour le diagnostic différentiel des MICI et pour certains d'entre eux, un diagnostic précoce de la maladie permettant un suivi optimal des patients⁵. Plusieurs marqueurs ont été rapportés pour évaluer l'importance de l'inflammation au niveau systémique. Il s'agit notamment des taux sériques de CRP (Protéine C-réactive), de TNF α (Tumor necrosis factor) ou encore d'IL-6 (Interleukine-6). D'autres marqueurs d'origine microbienne ont été spécifiquement décrits chez le patient atteint de MC. Il s'agit d'anticorps dirigés contre des motifs glycaniques ou protéiques exprimés sur certaines espèces bactériennes (comme par exemple l'anti-Omp-C Ab, l'anti-CBir Ab ou encore l'anti-I2 Ab) ou fongiques⁴³⁻⁴⁶. Nous nous focaliserons dans ce chapitre uniquement sur les marqueurs d'origine fongique.

Ces marqueurs ayant des valeurs diagnostiques et pronostiques pour les MICI, sont dirigés principalement contre des constituants de la paroi fongique et sont représentés par les ASCA (Anti-*saccharomyces cerevisiae* antibodies ; mannane), les ALCA (anti-laminaribioside carbohydrate antibodies, fragment de glucane), les ACCA (anti-chitobioside carbohydrate antibodies, fragment de chitine) et les AMCA (anti-mannobioside carbohydrate antibodies, fragment de mannane)⁵.

Ainsi, la prévalence des ASCA a été estimée de 60 à 70 % dans le cas de la MC, de 10 à 15 % pour la RCH et moins de 5 % dans la population saine. Il est intéressant de noter que les ASCA reconnaissent également des résidus de mannose à la surface des levures pathogènes telles que *C. albicans*. Ces anticorps sont associés à des formes jeunes touchant le grêle et l'iléon^{12,47}. Parallèlement, d'autres outils sérologiques ont été proposés pour le diagnostic de la RCH, il s'agit principalement des pANCA (Deoxyribonuclease Dnase-I sensitive perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic-autoantibody) qui reconnaissent les antigènes présents dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (comme la myéloperoxydase ou encore la protéinase 3). Ces derniers ont été rapportés dans 60 à 70 % des personnes atteintes de la RCH, de 10 à 15 % pour ceux atteints de la MC et moins de 5 % dans la population saine^{43,44,47}. De manière intéressante, le test ASCA couplé à celui du pANCA permet de différencier la RCH des formes coliques de la MC^{12,47}.

Plusieurs études récentes décrivent des variations importantes du microbiote intestinal en relation avec les processus inflammatoires associés aux MICI. Qu'il s'agisse de signature microbiologique ou de métabolites sécrétés par le microbiote, ces outils permettent de diagnostiquer ou de suivre l'évolution de la maladie^{48,49}. C'est le cas de plusieurs études prospectives multicentriques qui mettent en avant des signatures au niveau du microbiote fécal. Ainsi, l'étude de Lo Presti *et al.*, a rapporté une augmentation significative des *Gammaproteobacteria*, *Enterococcaceae* et *Enterococcus* chez les personnes atteintes de MICI⁵⁰. Une seconde étude sur une population asiatique par Guo S *et al.*, a mis en évidence une diminution de *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) et une augmentation de *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) chez les patients atteints de MC⁵¹. Cette partie de la thèse sera détaillée ultérieurement dans la partie II dans la section « Modification de la biodiversité bactérienne chez les patients atteints de MICI ».

5. Facteurs étiologiques

Même si l'étiologie de la maladie reste inconnue, la MC est une maladie multifactorielle qui se caractérise par des prédispositions génétiques mais également par une contribution des facteurs immunologiques et environnementaux, qui participent au phénotype de la maladie. D'ailleurs, l'hypothèse la plus communément partagée fait intervenir une dérégulation du système immunitaire intestinal en lien avec un déséquilibre du microbiote intestinal dénommé « dysbiose », sous l'effet de facteurs génétiques ou environnementaux (**Figure 2**)^{36,52}.

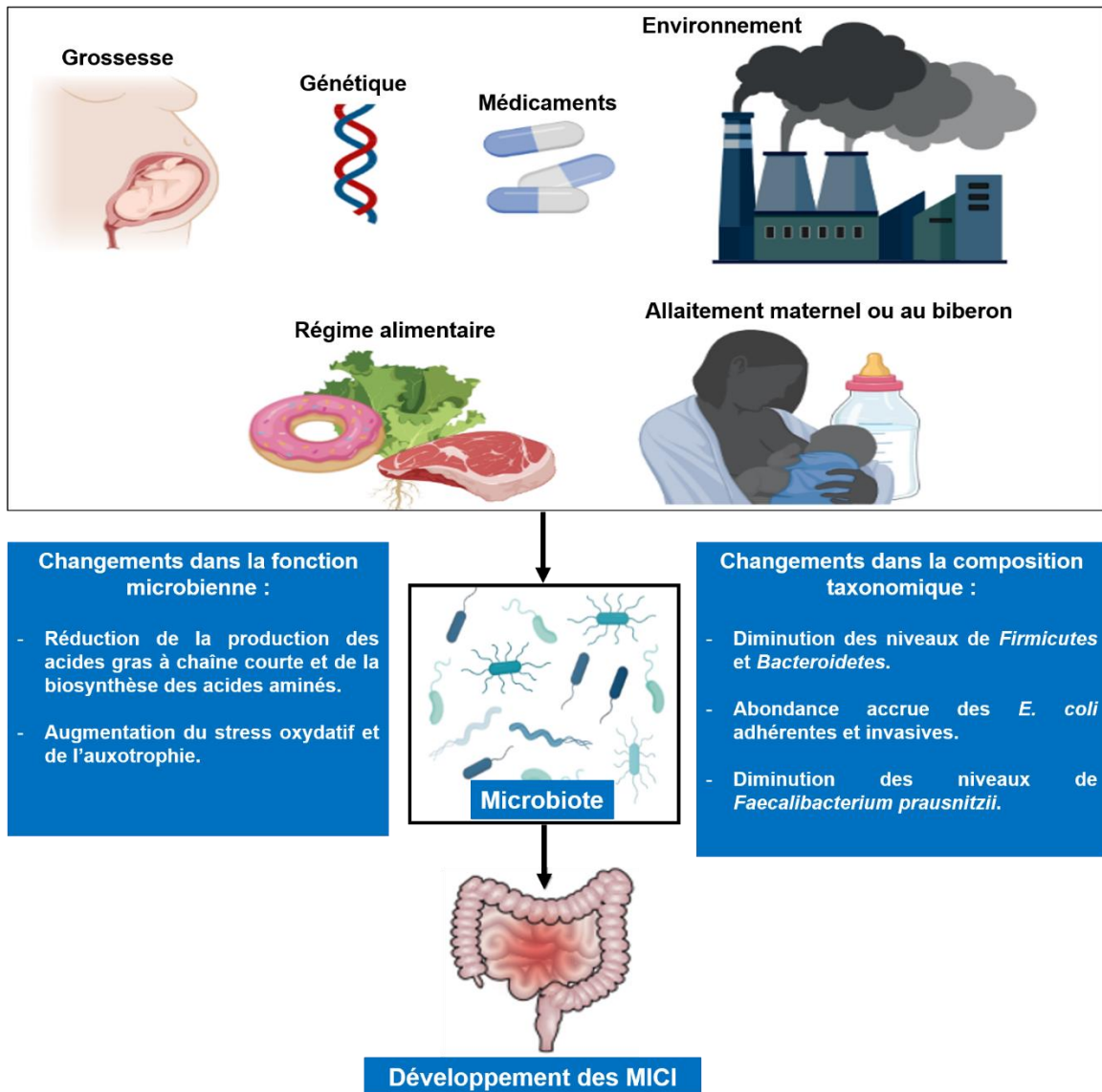


Figure 2 : Schéma représentatif des différents facteurs influençant le microbiote intestinal tout au long de la vie amenant à une dysbiose et au développement des MICI, figure adaptée d'après Ananthakrishnan AN *et al.*, 2018³⁰.

A. Facteurs environnementaux

Les variations épidémiologiques observées dans le temps et l'espace avec une augmentation de la prévalence dans les pays en voie d'industrialisation et un gradient Nord-Sud bien établi suggèrent un rôle important de l'environnement dans l'évolution vers les MICI^{5,12}.

Ainsi, différents facteurs environnementaux semblent influencer les MICI tels que les appendicectomies, les antibiotiques, l'hygiène ou encore le régime alimentaire. D'ailleurs des études épidémiologiques récentes ont mis en évidence le

rôle essentiel des acides gras (AG) saturés et insaturés issus de l'alimentation dans le développement des MICI^{1,53}.

Dans la littérature, le régime alimentaire de type occidental, favorisant probablement l'émergence d'une dysbiose, est fortement mis en avant dans la pathogenèse des MICI. À l'inverse, d'autres facteurs alimentaires peuvent quant à eux avoir des effets bénéfiques sur la fréquence des récives et sur la période de rémission dont notamment les vitamines D, les minéraux comme le zinc et le sélénium, les AG mono- et poly-insaturés ainsi que les flavonoïdes^{54,55}. D'autre part, les AG saturés présents dans l'alimentation occidentale, seraient impliqués dans de nombreuses voies de signalisation inflammatoires pouvant aboutir à des lésions tissulaires et également jouer un rôle important dans l'inflammation au cours de la MC. De plus, les patients atteints par les MICI présentent le plus souvent un métabolisme lipidique altéré⁵⁶. Cette altération se manifeste par un déséquilibre du ratio des AG de type oméga-6 (n-6 ; ω -6) sur oméga-3 (n-3 ; ω -3). Ce déséquilibre est d'ailleurs corrélé avec un risque accru de développer un CCR ou une MICI. Une alimentation riche en huiles de poisson, une source riche en ω -3 montre justement des propriétés anti-inflammatoires à l'inverse d'une alimentation riche en ω -6 aux propriétés pro-inflammatoires et qui participe à la tumorigenèse⁵⁷. Ainsi, une alimentation équilibrée peut représenter un moyen de prévention du déclenchement de l'inflammation intestinale ou du maintien de l'état de rémission.

D'autres travaux démontrent que l'exposition à des antibiotiques pendant l'enfance augmente également le risque de développer une MC^{58,59}. En parallèle, des études ont rapporté l'impact des polluants environnementaux dans la survenue des MICI avec en particulier l'implication des métaux lourds ou des microparticules^{60,61}. D'autres données obtenues sur un modèle murin suggèrent aussi le rôle délétère des polluants environnementaux, notamment l'aluminium qui a été décrit comme un agent délétère dans les processus de réparation des muqueuses et qui entretient l'inflammation intestinale⁶².

Parmi ces facteurs environnementaux, le tabac est actuellement le facteur de risque le mieux défini dans le développement et la progression de ces maladies⁶³.

Une étude réalisée en 1982, par Harries AD *et al.*, a montré une association négative entre la RCH et l'exposition au tabac. En effet, dans cette étude, seulement 8 % des patients atteints de la RCH fumaient, tandis que dans le cas des patients atteints de la MC, 40 % d'entre eux étaient fortement exposés au tabac⁶⁴. Ces données ont été ultérieurement confirmées par les travaux de Somerville KW *et al.*⁶⁵. Au total, ce facteur exerce un effet délétère dans le cas de la MC alors que certains auteurs lui attribuent un rôle protecteur dans le cas de la RCH⁶⁶⁻⁶⁸. Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet dichotomique du tabagisme : i) Modifications au niveau du système immunitaire. A titre d'exemple, une exposition à la nicotine diminue la sécrétion de TNF α et augmente celle de l'IL-10 en présence des macrophages issus de patients RCH. À l'inverse, cette exposition fait diminuer l'expression d'IL-10 en présence des cellules mononucléaires du sang périphérique des patients atteints de MC⁶³ ; ii) Modifications au niveau de la perméabilité intestinale⁶⁹ ; iii) Modifications de la biodiversité du microbiote intestinal, amenant à une colite exacerbée chez les patients atteints de MC^{63,68}. Paradoxalement, dans le cas de la RCH, la nicotine a un effet stimulant sur l'activité de certaines bactéries comme *Lachnospiraceae spp.* qui produisent du butyrate connu pour son activité anti-inflammatoire ainsi que pour son effet protecteur sur la barrière épithéliale⁷⁰. La pertinence de ces mécanismes reste cependant à démontrer aux moyens d'études cliniques de grande envergure.

B. Facteurs génétiques

Des études du génome de patients atteints de MICI ont permis de mettre en évidence des mutations ponctuelles sur un certain nombre de gènes. Ces mutations, appelées aussi « Single Nucleotide Polymorphism » (SNP) sont associées à un risque accru de MICI. Ainsi, les analyses par « Genome-wide association studies » (GWAS) ont permis l'identification de susceptibilités génétiques avec plus de 230 loci corrélés au risque des MICI⁷¹⁻⁷³. Ainsi, contrairement aux facteurs environnementaux, de grands progrès ont été réalisés dans l'analyse et la compréhension des variations génomiques associées à la maladie. D'autre part, une corrélation entre la MC et l'héritage génétique a été mise en évidence avec des taux de concordance et des caractéristiques cliniques élevés chez des jumeaux monozygotes : 50 % pour la MC et 15 % pour la RCH^{74,75}. L'ensemble de ces

analyses génétiques ont permis d'identifier les mutations sur les gènes d'autophagie, les gènes de la réponse immunitaire dont les récepteurs de l'immunité innée comme des facteurs de susceptibilités pour le développement d'une MICI. Le poids de ces différentes mutations dans le développement d'une MICI est variable, néanmoins les mutations des gènes *NOD2/CARD15* (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2/Caspase-Activating Recruitment Domain 15*), *ATG16L1* (*Autophagy Related 16 Like 1*), *TLR4* ou encore *IL-23R* semblent avoir un impact déterminant sur le développement de la MC⁷³. Cependant, ces associations entre les variants génétiques et le risque de développer une inflammation intestinale, peut différer selon les populations. En effet, ces gènes de prédisposition impactent différemment le risque de développer une MICI au sein des cohortes des populations asiatiques par rapport aux cohortes des populations occidentales^{5,71}.

a. Mutation du gène « NOD2/CARD15 »

NOD2 est un récepteur impliqué dans la reconnaissance du muramyl dipeptide (MDP) bactérien. Celui-ci est constitué d'une partie *N*-terminale contenant deux domaines CARD (Caspase recruitment domain) et un domaine central NBD (Nucleotide-bonding domain). La partie *C*-terminale contient quant à elle des motifs riches en leucine et répétés, dénommés LRR (Leucine-rich repeat)⁷⁶. Le MDP induit alors un changement de conformation du récepteur NOD2 et le recrutement de RIP2 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2), une kinase qui active principalement deux voies de signalisation : NF- κ B (Nuclear factor kappa B) et MAPK (Mitogen-activated protein kinases). Par conséquent, ces voies de signalisation régulent la transcription de gènes codant pour des peptides antimicrobiens et diverses cytokines pro-inflammatoires⁷⁶⁻⁷⁹.

Ainsi, deux études publiées en 2001 ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, le lien entre les SNPs du gène *NOD2/CARD15* et la MC. Dans ces études, il a été montré que la mutation du gène *NOD2* est associée à un risque 40 fois plus important de développer cette maladie par rapport à un sujet non porteur de ce SNP^{80,81}. Les patients porteurs d'une mutation du gène *NOD2* seule ou associée à d'autres SNPs se manifestent par des anomalies dans l'activité sécrétoire des cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle⁵. D'autres part, les cellules de Paneth

obtenues de patients atteints de MICI présentent d'autres mutations sur le gène de l'autophagie *ATG16L1* dont notamment l'allèle *ATG16L1 T300A*. De plus, dans ce cas, les cellules présentent alors des granules altérés et moins nombreux. Cet allèle cause également une augmentation de la libération des cytokines, une diminution de l'autophagie et de la clairance bactérienne intracellulaire, amenant à des cellules de Paneth anormales⁸². En parallèle, des preuves expérimentales ont montré que les polymorphismes de *NOD2* associés aux MICI sont aussi liés à une autophagie inefficace³⁹. Cette association du gène *ATG16L1* avec un risque accru de MC a été mise en évidence pour la première fois en 2007⁸³. En effet, l'activité des cellules de Paneth est associée au processus d'autophagie. Une perturbation dans l'autophagie amène à une modification de la réponse protéique de ces cellules et provoque une inflammation intestinale. Cette même mutation *ATG16L1 T300A* serait, d'après certains auteurs, en corrélation avec une dysbiose intestinale, dominée par *Bacteroides ovatus* et une polarisation de la réponse immune vers un profil Th1/Th17. Pour résumer, ces observations suggèrent que cette mutation, présente avant le déclenchement de la maladie, serait à l'origine de la dysbiose et de l'infiltration tissulaire par les cellules immunitaires⁸².

b. Mutations des gènes « Toll-like Receptors »

Les Toll-like receptor (TLRs) sont des récepteurs de reconnaissance permettant de détecter certains motifs ou molécules antigéniques, de natures variées, à la surface des microorganismes tels que les bactéries ou les champignons. Ils interviennent alors dans les réponses de l'immunité innée et adaptative permettant une protection contre ces agents infectieux⁸⁴. Les TLRs sont des protéines transmembranaires composées d'un domaine extracellulaire riche en motifs LRR impliqué dans la reconnaissance des PAMPs (Pathogen associated molecular patterns), d'un domaine transmembranaire et enfin d'un domaine intracellulaire contenant un « death domain » amenant à la transduction du signal d'activation⁸⁵. Le premier TLR (TLR1) chez les mammifères a été découvert en 1996⁸⁶. Puis, Medhitov R. *et al.* ont identifié un second TLR en 1997 correspondant au TLR4 dont le rôle dans la reconnaissance du LPS a été démontré par Poltorak A *et al.*, en 1998^{85,87}. Par la suite, d'autres données ont montré que le récepteur TLR4 joue un rôle primordial dans la pathogenèse liée aux MICI et proposent alors que

certaines SNPs de TLR4 peuvent être considérés comme des variants de susceptibilité aux MICI⁸⁸. D'ailleurs, une étude brésilienne a montré que les SNPs de TLR4 semblent également jouer un rôle dans le phénotype de la maladie chez les personnes atteintes de la MC⁸⁹.

c. Autres mutations génétiques corrélées au risque accru de MICI

D'autres mutations pourraient être corrélées au risque accru de développer des MICI. C'est le cas des gènes codant les protéines des jonctions serrées comme ceux de la claudine 2,5,8 ou de MAGI2 et MAGI3, amenant à une perméabilité intestinale plus élevée⁹⁰⁻⁹³. Ces jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires importantes dans le maintien de la polarité des cellules et la régulation du flux ionique. D'ailleurs, d'autres SNPs, de ces gènes codants des protéines de jonctions serrées, sont également liés au développement des cancers du côlon tels que ceux de la claudine 1 et claudine 7⁹⁴.

Le lien entre les polymorphismes de *MUC1* et *MUC19* avec les maladies inflammatoires est également évoqué, cependant les mécanismes impliqués restent peu connus. Il s'agit de mucines exprimées au niveau des cellules épithéliales permettant de lutter contre les agents pathogènes³⁹. D'ailleurs, une étude récente a permis de démontrer l'effet des polymorphismes de *MUC1* *via* notamment l'influence de la longueur des allèles *MUC1* sur la réponse inflammatoire NLRP3 (NOD, LRR and pyrin domain-containing protein 3) des macrophages humains. En effet, les longs allèles sont corrélés avec une modification de l'activité de l'inflammasome NLRP3 qui se traduit par une production accrue en IL-1 β ⁹⁵.

C. Facteurs immunitaires

Chez l'Homme, une altération des cellules de Paneth ou des cellules impliquées dans la sécrétion du mucus seraient impliquées dans la pathogenèse des MICI⁹⁶. En parallèle, des études mettent en avant une corrélation entre une réponse immunitaire excessive et l'inflammation intestinale^{5,82}. Ainsi, la réponse immunitaire des lymphocytes montre qu'il existe une activation continue des cellules T chez les personnes atteintes de MICI amenant alors à une réponse excessive de ces cellules. Plus précisément, dans le cas de la MC, il subsiste une réponse excessive des voies

Th1 et Th17 contre les bactéries, les champignons et les virus créant un déséquilibre entre les cellules T effectrices et les cellules T régulatrices (T reg)^{82,97}. Ce même phénomène est observé pour les macrophages activés qui infiltrent de manière massive la muqueuse intestinale. Ces cellules jouent alors un rôle clé dans la pathogenèse des MICI puisqu'elles contribuent à la production majeure des cytokines inflammatoires^{98,99}, telles que l'IFN γ (Interféron gamma), le TNF α ou encore l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8³⁹. Cependant, une réponse excessive médiée par la voie Th2 serait prépondérante dans le cas de la RCH¹⁰⁰. L'activité accrue des cellules T est également due à la libération de nombreuses cytokines inflammatoires en excès, telles que l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-23, par les macrophages et les cellules présentatrices d'antigènes^{73,101}. Ces mécanismes joueraient un rôle primordial dans l'initiation et la progression de ces maladies.

D'autre part, la découverte des cellules Th17 et de la réponse *via* IL-23 a provoqué un changement radical dans la compréhension de l'immunité et conduit au développement de nombreuses cibles thérapeutiques pour combattre les MICI⁷³. Parallèlement, le contrôle de l'inflammation intestinale par des récepteurs de lectine de type C (CLRs) est un concept émergent. Par exemple, la dectine-1 et le récepteur de mannose (MR), qui jouent un rôle clé dans la reconnaissance des pathogènes et la phagocytose par des macrophages, contribuent de manière différente à l'activation des voies de signalisation inflammatoires. Il est intéressant de noter qu'une étude récente met en évidence qu'au cours d'une colite chimio-induite, la perte du MR, sur des cellules dérivées myéloïdes, va exacerber l'inflammation intestinale alors qu'à contrario, l'absence de la dectine-1 la prévient. Ces résultats soulignent les rôles divergents des CLRs et soutiennent l'hypothèse que la dectine-1 joue un rôle essentiel dans le développement des MICI alors que le MR diminue l'inflammation et inhibe les réponses immunitaires de type Th1⁹⁹.

D. L'implication du microbiote intestinal

Parmi les facteurs associés aux MICI, les altérations du microbiote intestinal jouent un rôle déterminant¹⁰². En effet, même si dès la naissance un équilibre s'installe entre les microorganismes du microbiote intestinal et le système de défense immunitaire, des altérations du microbiote peuvent apparaître suite à des traitements

médicamenteux, face à des changements de régime alimentaire ou à certains états pathologiques^{103,104}. Cette dysbiose intestinale se traduit alors par une invasion et une multiplication de certains microorganismes pathogènes au sein des tissus de l'hôte. Elle serait de fait, impliquée dans la pathogenèse des MICI³⁰.

Au sein du microbiote intestinal, la flore fongique est faiblement représentée (moins de 1% des microorganismes), toutefois, elle joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Parmi ses constituants, *C. albicans* et *C. glabrata*, des levures commensales saprophytes du tube digestif humain, sont capables de coloniser de manière excessive la muqueuse digestive sous certaines conditions physiopathologiques, dont notamment une altération de la flore bactérienne intestinale, de la muqueuse digestive ou un déficit immunitaire amenant à favoriser la translocation de ces levures à travers la barrière épithéliale digestive¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Cette perturbation du microbiote intestinal et plus précisément des levures du genre *Candida spp.* semblent jouer un rôle décisif dans le maintien de l'inflammation intestinale associée aux MICI. Notre équipe fut pionnière dans l'exploration de la piste fongique comme facteur déclenchant ou participant au maintien de l'inflammation intestinale au cours de la MC. Ces travaux font suite à la description au début des années 1990 d'anticorps anti-levures dénommés ASCA retrouvés dans plus de 60 % de patients atteints de MC. Ultérieurement, ces anticorps ont été corrélés avec un âge jeune au moment du diagnostic et une localisation grêlique des lésions^{13,14,109}. D'autres études ont, quant à elles, démontré que l'amplitude des réponses sérologiques ASCA et des anticorps antimicrobiens sont corrélées à la sévérité de la maladie¹¹⁰⁻¹¹². Des études expérimentales récentes, dont plusieurs réalisées au sein de notre structure, suggèrent un lien entre la flore fongique et l'inflammation observée au cours de la MC. Toutefois, il reste difficile de conclure sur la nature de ce lien, notamment de déterminer s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de l'inflammation incontrôlée caractérisant la MC¹¹³⁻¹¹⁶.

Partie 2 : Le microbiote intestinal

1. Généralités

La première description d'un microorganisme au sein du tractus gastro-intestinal humain a été réalisée par Antoni van Leeuwenhoek en 1681. Ce microorganisme, isolé à partir de selles, est aujourd'hui identifié comme une *Giardia spp*¹¹⁷. Deux siècles plus tard, les publications des premières descriptions détaillées de cultures de microorganismes gastro-intestinaux apparaissent. Parmi ces publications, on retrouve celle de Casimir Davaine en 1854 qui est l'une des plus anciennes reflétant la description de *Pentatrichomonas hominis*, un parasite intestinal¹¹⁸. Plus tard, en 1885, apparaît la première description d'une bactérie du tractus gastro-intestinale par Teodor Escherich, intitulée « *Bacterium coli* » et renommée par la suite « *E. coli* »¹¹⁹.

Depuis, de nombreux microorganismes ont été décrits dans la littérature et le terme « microbiote intestinal » est apparu. Ce terme représente l'ensemble des microorganismes tels que les bactéries, les virus, les champignons, les archées, qui habitent au sein du tractus digestif et constituant un écosystème extrêmement complexe^{120,121}. Le microbiote intestinal évolue tout au long de la vie et diffère selon l'individu mais sa composition reste stable chez un adulte sain. En 2014, une étude unifie l'ensemble des connaissances établies sur le microbiote intestinal en effectuant une recherche bibliographique couvrant plus d'un siècle de publications. Cette étude met en avant l'identification et le regroupement d'environ 1000 espèces bactériennes déjà identifiées au sein de diverses cohortes humaines¹²². Puis en 2019, une analyse métagénomique a identifié près de 2000 nouvelles espèces bactériennes intestinales non cultivées et jusqu'alors méconnues¹²³. Le microbiote intestinal comprend son propre génome avec plus de 3,3 millions de gènes, soit 150 fois plus que celui de son hôte^{124,125}. L'ensemble de ces études permettent de mieux comprendre à la fois l'ampleur de la biodiversité du microbiote intestinal et la richesse génétique de cet écosystème. La densité des espèces bactériennes qui constituent le microbiote intestinal varie également selon la localisation dans le tractus digestif. Ainsi, un gradient de concentration de ces bactéries apparaît au sein

du tube digestif et où la densité bactérienne devient maximale au niveau colique avec 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme de fèces¹²⁶. De plus, des différences en termes de biodiversité bactérienne sont retrouvées selon les populations humaines étudiées (Caucasiennes, Asiatiques et Africaines)^{124,127-131}.

La variabilité de la composition du microbiote intestinal entre les différents individus peut être influencée par divers facteurs physiologiques (tels que le sexe et l'âge), l'environnement, la localisation géographique ou encore le régime alimentaire^{125,131,132}. Néanmoins, malgré ces différences inter-individuelles, les analyses phylogénétiques permettent de mettre en évidence quatre grands phyla. Ces derniers sont constitués essentiellement d'un microbiote anaérobie tels que : *Firmicutes* ; *Bacteroidetes* ; *Proteobacteria* et *Actinobacteria* dont deux dominants au niveau intestinal : *Firmicutes* (30-52%) et *Bacteroidetes* (9-42%). Dans le cas des *Bacteroidetes*, il s'agit de bactéries gram-négatives alors que dans le cas des *Firmicutes*, ce sont des bactéries gram-positives classées en deux sous-groupes : les *Bacilles* et les *Clostridia*. Il est également établi que ces quatre phyla restent constants chez un individu donné et ce de manière pérenne, toutefois de faibles variations peuvent intervenir de manière ponctuelle^{16,102,120,122,133,134}.

2. Evolution du microbiote au cours de la vie

Dès la naissance, la colonisation intestinale établie entre les bactéries commensales et l'hôte permet un dialogue crucial à la maturation du système immunitaire intestinal et ce, tout au long de la vie⁹⁶. Par ailleurs, ces communautés bactériennes intestinales constituent une source de diversités métaboliques ainsi que génétiques supplémentaires et essentielles¹³⁵.

Le microbiote intestinal évolue tout au long de la vie et diffère selon l'individu, mais sa composition reste stable chez un adulte sain à l'inverse de celle du nourrisson qui varie au cours du temps, notamment lors de la première année de vie. En effet, l'étude de Palmer C *et al.* a étudié l'évolution et à la composition bactérienne du tractus intestinal du nourrisson au cours de la première année de vie, se terminant par un microbiote intestinal qui s'enrichit progressivement pour tendre vers celui de l'adulte. Les résultats obtenus révèlent une variation importante de la

composition des communautés bactériennes d'un nourrisson à un autre. De plus, il a également été montré que le microbiote des jumeaux présente un haut niveau de similarité mettant l'accent sur l'intervention des facteurs génétiques et environnementaux sur la composition du microbiote intestinal¹³⁶.

Parmi les facteurs environnementaux, le type d'allaitement ainsi que les facteurs nutritionnels jouent un rôle important dans la composition du microbiote intestinal du nouveau-né. Ainsi, lorsque le nouveau-né est allaité, les bactéries lactiques comme les lactobacilles ou les bifidobactéries colonisent le tube digestif du nourrisson et semblent dominer le microbiote gastro-intestinal de ces derniers. Ces bactéries lactiques apparaissent alors cruciales pour la santé et le bien-être du nourrisson en jouant un rôle essentiel dans la protection contre certaines bactéries néfastes *via* la synthèse d'agents sélectifs (saccharolytiques, acidogènes, bactériocines), des enzymes lytiques ou encore des acides organiques contenant des effets antimicrobiens. D'ailleurs, il est largement établi que l'alimentation jouerait un rôle essentiel dans la biodiversité du microbiote intestinal. A l'inverse, lorsque le nouveau-né est nourri par un apport exogène de lait artificiel, ce dernier est alors colonisé par d'autres bactéries que les espèces lactiques, telles que les *Bacteroides* et *Clostridia*^{137,138}. Cependant, les effets de l'alimentation sur la composition du microbiote intestinal du nourrisson restent encore fortement controversés. Parmi les autres déterminants influençant la composition du microbiote intestinal, le mode d'accouchement a été également rapporté. Dans cette étude, les nouveau-nés par césarienne présentent un microbiote pauvre en *Bifidobactéries* et en *Bacteroides* contrairement aux nourrissons nés par voie basse (**Figure 3**). De même, l'utilisation d'antibiotiques diminue également le nombre de bactéries symbiotes. Dans le cas des hospitalisations liées à la prématurité, il a été rapporté une prévalence plus élevée d'infection à *Clostridium difficile* (*C. difficile*)¹³⁹.

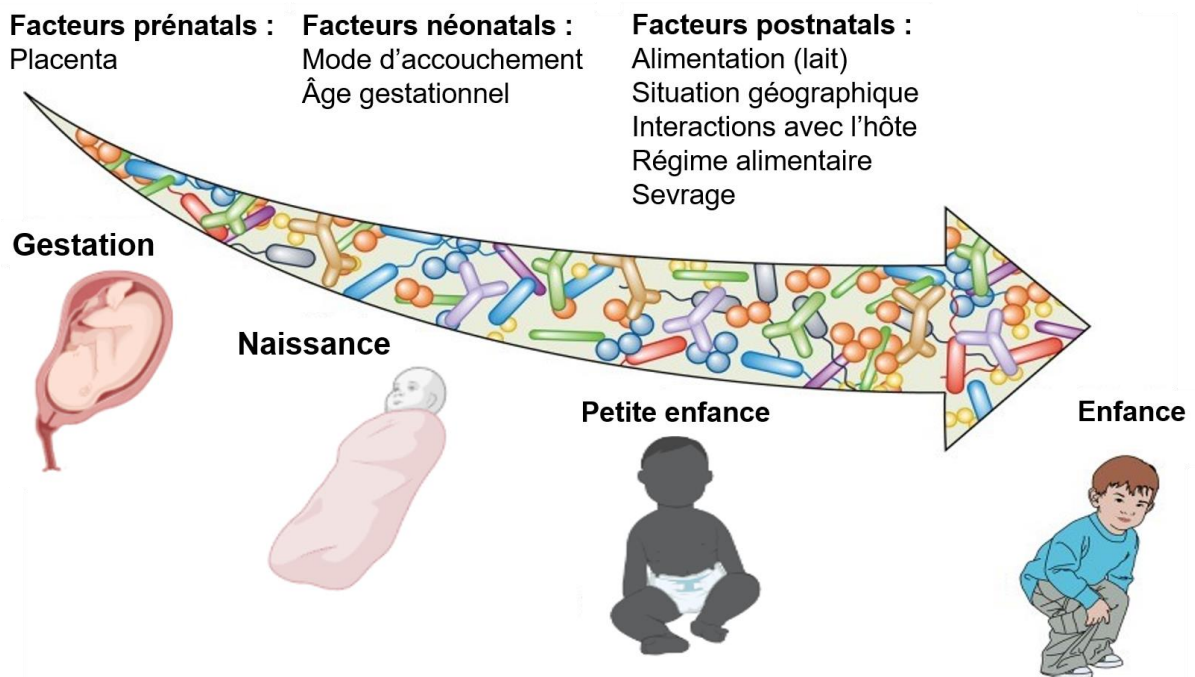


Figure 3 : Modulation du microbiote intestinal de la gestation à l'enfance en présence des divers facteurs (prénatals, néo-nataux et post-nataux) déterminants pour son développement et sa composition, figure adaptée d'après Milani C *et al.*, 2017¹⁴⁰.

En parallèle, il a été rapporté que le microbiote intestinal évoluait en fonction de l'âge. Ce dernier est également influencé par la sénescence de la fonction immunitaire ou par certaines conditions de vie (l'hygiène, le niveau de vie, ...). C'est le cas notamment du rapport *Bacteroides* / *Firmicutes* qui est bien plus important chez les personnes âgées que chez des sujets jeunes. C'est également le cas pour les *Bifidobactéries* qui diminuent au profit d'*Enterobacteriaceae*, de *Streptocoques* ou de *Clostridia* chez les personnes âgées par rapport aux individus jeunes^{2,120}. L'exposition à l'un ou à plusieurs de ces facteurs peut favoriser une dysbiose à l'origine du développement d'une MICI (**Figure 2**)³⁰.

Une autre étude quant-à-elle a examiné comment les microbiotes intestinaux diffèrent entre les populations humaines *via* la caractérisation des espèces bactériennes présentes dans les échantillons fécaux de 531 individus de diverses origines (Amérindiens d'amazonie, résidents de communautés rurales du Malawi ou encore des habitants de zones métropolitaines des Etats-Unis) et d'âge variable. En effet, l'étude a été réalisée sur des nourrissons, des enfants, des adolescents et des adultes¹³⁵. Les résultats de ces travaux ont permis, de par l'échantillonnage d'une large population composée de diverses traditions culturelles, de différentes localisations géographiques et d'âge variés, de mettre en évidence la façon dont les

microbiotes intestinaux évoluent, à la fois selon le stade de la vie, l'endroit ou encore le mode de vie. En effet, au sein des trois populations analysées, la composition phylogénétique du microbiote évolue au cours des trois premières années de la vie pour atteindre un microbiote du sujet adulte caractérisé par une diminution significative des *Bifidobacterium*. De plus, la biodiversité bactérienne croît avec l'âge au sein des trois populations à l'exception des individus issus des grandes métropoles américaines dont la biodiversité évolue de manière moins importante. Dans cette même étude, les auteurs démontrent que la variation interpersonnelle du microbiote est bien plus grande entre les enfants que celle observée chez les adultes. La composition phylogénétique de la communauté bactérienne diffère significativement selon la localisation géographique et les traditions culturelles des individus étudiés¹³⁵.

3. Rôle et fonction de ce microbiote

Le microbiote intestinal a co-évolué avec son hôte depuis des millénaires et exerce de nombreux rôles physiologiques cruciaux pour l'hôte tels que la digestion et la nutrition. Parmi ces rôles, nous pouvons citer : la fermentation des sucres, des protéines ou des fibres alimentaires en acide gras à chaîne courte (AGCC), la synthèse de certaines vitamines ou encore des activités enzymatiques essentielles à la digestion. D'autres rôles lui sont également attribués comme la modulation du système nerveux, la protection et la défense de l'hôte contre des pathogènes par une compétition d'adhésion à la muqueuse ou encore dans le développement et la maturation du système immunitaire et de son épithélium intestinal. De plus, de par sa biodiversité, le microbiote influence la composition, la structure et les propriétés du mucus^{38,54,121,141-146}.

De nombreuses études montrent que la colonisation des souris dites « germ-free » s'associe avec de multiples modifications telles que l'élargissement des villosités, l'activation du système immunitaire et le recrutement de lymphocytes^{125,147,148}. Ainsi, l'association entre le microbiote intestinal et l'hôte a conduit à une co-évolution présentant des avantages mutuels, on parle de symbiose et de commensalisme entre notre organisme et le microbiote. Celui-ci peut d'ailleurs intervenir dans la régulation de l'expression de divers gènes comme par exemple les

gènes antimicrobiens *Reg3β* et *Reg3γ* induits au niveau de l'épithélium. Il peut aussi influencer, indirectement, l'expression des gènes hypothalamiques et favoriser une suralimentation^{54,120,121,125,141}. Cependant, malgré les liens et les interactions mis en évidence entre l'hôte et le microbiote, la compréhension des mécanismes qui gouvernent les interactions microbiote-immunité de l'hôte dont notamment la différenciation des lymphocytes restent encore à élucider.

Toutefois, des études récentes mettent en avant la découverte de certaines bactéries commensales capables de réguler le système immunitaire et tentent de mieux comprendre leur rôle ainsi que les mécanismes mis en jeu. C'est le cas de la bactérie SFB (Segmented Filamentous Bacterium), cultivable depuis peu, qui joue un rôle essentiel dans la maturation des réponses immunitaires innée et adaptative de l'hôte^{149,150}. En effet, la SFB permet le développement du tissu lymphoïde dont les plaques de Peyer ainsi que d'engendrer la mise en place de réponses immunitaires telles que l'activation de cellules T reg et pro-inflammatoires, notamment les cellules Th17 ou encore la production d'IgA sécrétoires^{96,150,151}. D'autres études mettent l'accent sur la régulation du système immunitaire *via Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*). En effet, le polysaccharide A de cette même bactérie, a une activité immunomodulatrice qui lui permet d'induire la production d'IL-10 à partir des cellules T reg (FOXP3⁺ ; forkhead box P3) au niveau intestinal et de protéger contre les colites chimio-induites¹⁵²⁻¹⁵⁴.

4. Le microbiote intestinal et les pathologies associées

Le microbiote intestinal participe au développement et à la maturation du système immunitaire de l'hôte. Il est également impliqué dans le métabolisme énergétique. Ainsi, toute modification du microbiote (dysbiose) peut avoir des conséquences sur la qualité de la réponse immune et sur l'activité métabolique de l'hôte et ainsi être à l'origine d'états pathologiques^{38,120,146}. Au cours des deux dernières décennies, les résultats issus d'études épidémiologiques, physiologiques, cellulaires et expérimentales suggèrent que le microbiote intestinal contribue à la santé métabolique de l'hôte et influence le risque de maladie comme l'obésité, le diabète de type 2, les maladies cardio-métaboliques et la malnutrition^{54,154-156}. D'autre part, une dysbiose peut-être également à l'origine du développement

d'allergies, du syndrome de l'intestin irritable et pourrait même être impliquée dans le développement du CCR^{38,157-160}. En outre, des études suggèrent que le microbiote intestinal et plus précisément la dysbiose joue également un rôle capital dans l'apparition des MICI^{161,162}. Néanmoins, bien qu'une grande quantité de données ait été générée, de nombreuses questions restent sans réponse. De plus, ces études ne montrent pas clairement si la dysbiose du microbiote intestinal est une causalité ou une conséquence au sein de ces différentes pathologies. Ainsi, la question reste encore à ce jour complexe à étudier. Toutefois, une hypothèse séduisante a été formulée : les facteurs génétiques et environnementaux influenceraient la dysbiose au sein du microbiote intestinal qui jouerait à son tour un rôle dans l'initiation, le maintien ou la sévérité de l'inflammation, engendrant un cercle vicieux. De cette façon, mieux comprendre le fonctionnement et les mécanismes d'interactions établis entre l'hôte et son microbiote intestinal permettraient de mieux appréhender et d'améliorer les traitements des maladies qui en découlent.

5. Modification de la biodiversité bactérienne chez les patients atteints de MICI

La biodiversité et la concentration bactérienne est réduite chez les patients atteints de MICI, notamment au sein des phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes*³⁹. En effet, les patients atteints de MICI montrent une diminution de certaines communautés bactériennes telles que *F. prausnitzii*, *Roseburia spp.* (*Roseburia hominis* ; *Roseburia faecis*), *Eubacterium rectale*, *Bacteroides spp.*, *Ruminococcus bromii*, *Bifidobacterium spp.* ou *Lactobacillus spp.* au profit d'autres microorganismes qui sont majoritairement des pathobiontes tels que *C. difficile*, *F. nucleatum*, *Fusobacterium varium*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *E. faecalis* ou encore *E. coli*^{22,102,163}. Les principales communautés bactériennes rapportées dans la littérature comme étant impliquées de manière négative ou positive dans le développement et le maintien des MICI seront décrites dans les paragraphes suivants^{22,102}.

A. Les espèces pathobiontes

La relation définitive de cause à effet entre les MICI et les espèces pathogènes du microbiote intestinal n'est pas encore totalement établie. Néanmoins, de nombreuses populations bactériennes seraient susceptibles de participer au développement et au maintien des MICI¹⁶⁴. Parmi celles-ci, on retrouve notamment *C. difficile*, une bactérie gram-positive provoquant des infections, des diarrhées importantes et qui est impliquée dans les colites^{102,165}. L'infection à *C. difficile* met en jeu deux étapes : i) une perturbation du microbiote intestinal, notamment liée à l'utilisation d'antibiotiques, permettrait la colonisation du tractus digestif par la bactérie ; ii) la production de toxines A et B induisant des dommages de la barrière intestinale en détruisant les jonctions serrées^{166,167}. D'ailleurs, il a été montré que les patients atteints de MICI seraient bien plus susceptibles d'être infectés par *C. difficile* que des personnes saines notamment en lien avec l'utilisation des antibiotiques et des agents immunomodulateurs^{168,169}. De plus, *C. difficile* serait impliqué dans les rechutes des MICI¹⁰².

Certaines souches d'*E. coli*, une communauté bactérienne gram-négative, sont associées aux MICI et semblent jouer un rôle dans la pathogenèse, la rechute et même dans les poussées de la maladie. D'autant plus qu'un nombre accru d'isolats d'*E. coli* douées de facteurs de virulence est retrouvé chez des patients atteints de MICI^{170,171}. Plus communément, il existe 3 groupes majeurs d'*E. coli* différenciés selon des critères génétiques et cliniques : i) les souches commensales ; ii) les souches pathogènes intestinales (SPI) ; iii) les souches pathogènes extra-intestinales (SPE). On peut donc séparer les *E. coli* pathogènes en deux catégories (SPI et SPE) chacune divisées en sous-catégories provoquant différents types de lésions. Néanmoins, parmi ces groupes, seules les souches provenant des SPI ont été rapportées chez des patients atteints de MICI. Au sein de ces SPI, de nombreux types ont été identifiés : *E. coli* à adhésion diffuse (diffusely adherent *E. coli* ; DAEC) ; *E. coli* entéroagrégatifs (enteroaggregative *E. coli* ; EAEC) ; *E. coli* entéroinvasifs (enteroinvasive *E. coli* ; EIEC) ; *E. coli* entéropathogènes (enteropathogenic *E. coli* ; EPEC) ; *E. coli* entérotoxigènes (enterotoxigenic *E. coli* ; ETEC) ; *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (Shiga toxin-producing *E. coli* ;

STEC) et *E. coli* adhérents et invasifs (Adherent invasive *E. coli* ; AIEC). Les DAEC semblent associées aux patients atteints de la RCH et seraient responsables d'une perte de l'intégrité de la barrière épithéliale, alors que les AIEC ont été spécifiquement décrites chez les patients atteints de la MC. Ces AIEC sont alors capables d'adhérer aux cellules épithéliales, de les envahir et de s'y multiplier. A ce titre, les AIEC ont acquis des facteurs de virulence qui leur permettent de jouer un rôle dans la pathogenèse de la MC²². Par ailleurs, des études ont également démontré que l'inflammation intestinale provoque la génération de nitrate, d'éthanolamine ou encore de tétra-thionate qui permettent à certaines bactéries néfastes comme *E. coli* ou *Salmonella spp.* de croître et de stimuler à leur tour l'inflammation chronique^{11,172,173}.

En ce qui concerne *E. faecalis*, une bactérie gram-positif, sa présence a été rapportée significativement plus élevée dans les selles de patients atteints de MICI en comparaison de sujets sains. Cette colonisation semble être plus marquée chez les patients atteints de la RCH. Chez les patients atteints de MC, la présence de cette bactérie serait associée à un effet délétère sur l'inflammation intestinale¹⁷⁴. Une autre étude expérimentale sur un modèle de souris « germ-free » et IL-10 knockout (IL-10 KO), montre qu'une colonisation par *E. faecalis* serait susceptible d'induire une colite, une dysplasie et un carcinome¹⁷⁵.

Une autre étude a suggéré le rôle de *Mycobacterium avium*, une sous-espèce de *paratuberculosis* dans la pathogenèse de la MC. En effet, cette sous-espèce a été détectée de manière fréquente dans des biopsies de muqueuses intestinales issues de patients atteints de MC¹⁷⁶. Enfin, les infections à *Campylobacter concisus*, à *Salmonella spp.* ou encore à *F. nucleatum* seraient d'après certains auteurs responsables du développement d'une inflammation intestinale précédant le développement d'une MICI¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. La multiplication des agents pathogènes rapportée dans les prélèvements de patients atteints de MICI rend difficile l'interprétation des résultats et la part individuelle jouée par chaque famille de microorganismes.

B. Les espèces probiotiques/protectrices

Il existe de nombreuses populations bactériennes possédant un rôle préventif contre l'inflammation intestinale. C'est le cas par exemple de *F. prausnitzii* qui occupe jusqu'à 20 % du microbiote et qui produit la majorité du butyrate intestinal. Cette propriété lui confère la capacité de moduler la composition du microbiote intestinal et de protéger de l'inflammation intestinale^{102,180,181}. Ces propriétés biologiques ont été également confirmées dans un modèle expérimental de colite chimio-induite démontrant que l'administration de *F. prausnitzii* confère un effet anti-inflammatoire permettant d'améliorer les paramètres cliniques des animaux^{182,183}. D'un point de vue clinique, il a été montré par des études métagénomiques, une diminution significative de *F. prausnitzii* chez des patients atteints de MICI par rapport aux contrôles^{184,185}. De façon intéressante, le maintien de la rémission chez certains patients serait lié à la restauration du microbiote intestinal à forte composante de *F. prausnitzii*. Il est également rapporté que la faible proportion de cette bactérie au sein du microbiote intestinal serait associée à une récurrence de la maladie^{39,102,186}.

Les *Bacteroides spp.* représentent une communauté bactérienne gram-négative dont certaines espèces sont connues pour jouer un rôle dans la régulation du système immunitaire de l'hôte et dans le maintien de l'homéostasie intestinale. C'est le cas de *B. fragilis* dont certaines études mettent en avant sa capacité à réguler le système immunitaire à partir des cellules T reg^{152,153,187}. Une autre étude démontre les effets protecteurs de *Bacteroides ovatus* dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS en diminuant à la fois le développement de l'inflammation intestinale et en réduisant le taux de mortalité des animaux¹⁸⁸. Ce même modèle a également été utilisé pour démontrer les effets bénéfiques de *B. thetaiotaomicron* notamment en termes de réduction de la perte de poids des animaux et de l'inflammation intestinale¹⁸⁹. De façon inattendue, il a été montré que certaines espèces du genre *Bacteroides* telles que *Bacteroides vulgatus* auraient un rôle dans la pathogenèse des MICI^{190,191}.

Les *Bifidobacterium spp.* représentent une communauté bactérienne gram-positive souvent utilisée en tant que probiotique notamment pour leur rôle protecteur dans la RCH⁴¹. Il semblerait que les *Bifidobacterium spp.* exercent des effets anti-

inflammatoires en augmentant la production d'IL-10 des cellules mononucléaires du sang périphérique de patients atteints de RCH. Ces effets corroborent les résultats obtenus sur un modèle cellulaire de cellules épithéliales intestinales où *Bifidobacterium spp.* serait capable d'inhiber la sécrétion de l'IL-8¹⁹². D'autres études cliniques portant sur l'utilisation de lait fermenté avec des *Bifidobacterium spp.* démontrent que ces bactéries réduisaient l'exacerbation de l'inflammation lors de la RCH^{41,193,194}.

Les *Lactobacillus spp.*, comme les *Bifidobacterium spp.*, sont des bactéries gram-positives utilisées en tant que probiotiques et détiennent un rôle protecteur dans les MICI⁴¹. D'ailleurs, de nombreux effets et avantages sont attribués aux lactobacilles comme la diminution des cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation des cytokines anti-inflammatoires, la modulation du système immunitaire dont notamment les cellules T reg, les macrophages ou encore le renforcement des jonctions serrées¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Des études *in vitro* et *in vivo* ont également montré le fort impact des lactobacilles dans la prévention de la diarrhée, de la croissance d'*Helicobacter pylori* (*H. pylori*), des toxines libérées par *E. coli*, dans la colite induite par *C. difficile* ou encore dans la protection contre les infections à *Listeria monocytogenes*^{138,197}. Une autre étude expérimentale met en avant leurs effets protecteurs et bénéfiques contre l'inflammation intestinale chimio-induite, notamment par la modulation des cellules T reg¹⁹⁸.

Au cours de nos études antérieures sur un modèle murin de colite chimio-induite, nous avons montré que *L. johnsonii* et *B. thetaiotaomicron* sont réduites au fur et à mesure du développement de l'inflammation intestinale. De plus, cette diminution est reliée à une augmentation de la prolifération de *C. glabrata* dans le tractus digestif^{15,199}. Nos données ont également montré que ces deux bactéries seraient capables d'interagir directement avec *C. glabrata* en induisant notamment une dégradation de la paroi fongique *via* des activités de type chitinase ou mannosidase, favorisant l'inhibition de la croissance fongique¹⁹. Ces données sont corrélées avec une autre étude qui a mis en lumière que les lactobacilles présentaient une activité inhibitrice sur la croissance, l'adhésion et la filamentation par *C. albicans*²⁰⁰. C'est aussi le cas dans d'autres études où les lactobacilles présentent des enzymes impliquées dans la lyse de la paroi cellulaire permettant

ainsi la régulation et le maintien de certaines populations bactériennes ou fongiques^{138,201}. En parallèle, Cuskin F *et al.* ont rapporté que *B. thetaiotaomicron* a la capacité d'exposer une machinerie complexe lui permettant d'utiliser les α -mannanes issus de la paroi de *Candida* comme source d'énergie²⁰². Nos données ont aussi montré que l'administration de ces bactéries par voie orale dans un modèle murin de colite atténuée le développement de l'inflammation intestinale et réduit la prolifération des populations pathobiontes comme *E. coli*, *E. faecalis* et *C. glabrata*¹⁹. Ces données sont corrélées avec différentes études rapportant les activités bénéfiques et protectrices de ces bactéries sur la colite ainsi que sur la colonisation par *Candida*^{17,18,102}. Ainsi, les bactéries auraient la capacité d'interagir de diverses manières possibles avec *Candida*. Divers rôles peuvent être attribués comme l'utilisation d'enzymes impliquées dans la lyse de la paroi cellulaire ; l'utilisation des métabolites tels que la phenazine capable d'inhiber la formation du biofilm de *C. albicans* ou encore divers acides organiques comme des acides aminés ou des AG présentant des effets antimicrobiens^{138,201,203,204}. Certaines données ont permis de démontrer que les bactéries présentent des métabolites lipidiques capables d'inhiber la formation du biofilm de *C. albicans* comme par exemple le butyrate^{203,204}, toutefois, les interactions établies entre les espèces du genre *Candida* et les espèces bactériennes du microbiote intestinal, dont notamment les déterminants moléculaires qui régissent ces interactions, restent encore à caractériser.

Partie 3 : Les métabolites et le microbiote intestinal

1. Généralités

Les études cliniques suggèrent que les patients atteints de MICI montrent une atténuation de la biodiversité du microbiote fécal et adhérent. Cette baisse de la biodiversité est au détriment du microbiote probiotique, favorisant une augmentation accrue de la prolifération des pathogènes. Cette dysbiose s'associe également avec un déséquilibre dans la production de nombreux métabolites. En effet, les bactéries intestinales peuvent synthétiser ou moduler une quantité importante de métabolites grâce à des processus enzymatiques spécifiques dont les cellules hôtes sont dépourvues²⁰⁵. Par ailleurs, un certain nombre de données soutiennent l'idée que le microbiote joue un rôle central dans les MICI, en affectant par exemple la perméabilité intestinale et la réponse immunitaire. Il en est de même pour les métabolites produits par ces bactéries qui peuvent moduler la réponse inflammatoire *via* différentes voies¹⁶⁴. Il est ainsi établi que le microbiote synthétise des métabolites bioactifs dont certains sont des molécules de signalisation essentielles pour la physiologie et l'homéostasie intestinale de l'hôte^{206,207}. Ainsi, le microbiote intestinal est capable de réguler divers processus métaboliques de l'organisme tels que l'homéostasie énergétique, le métabolisme du glucose ou encore celui des lipides. D'ailleurs, des études sur des modèles murins mettent précisément en avant l'impact du microbiote intestinal sur la régulation du métabolisme des lipides de l'hôte^{208,209}. Ce métabolisme enveloppe la biosynthèse et la dégradation des lipides comme les AG, le cholestérol ou les triglycérides (TG) (**Figure 4**)²¹⁰.

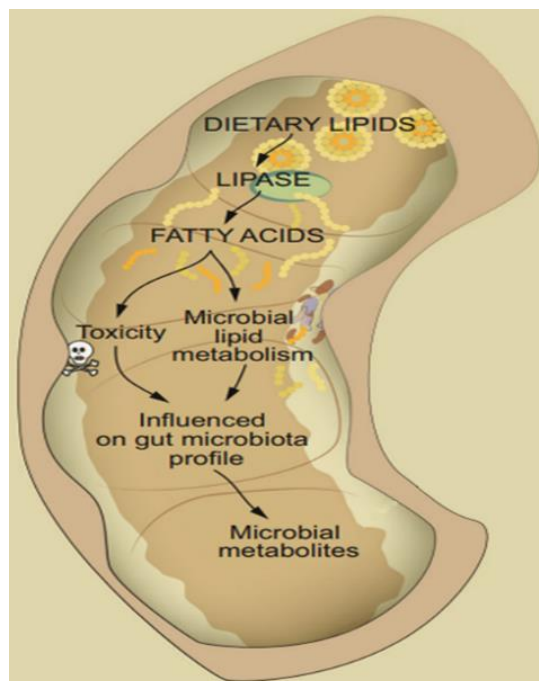


Figure 4 : Schéma des interactions possibles entre le microbiote intestinal et les fibres alimentaires lipidiques et les conséquences sur la physiologie de l'hôte, figure adaptée d'après Schoeler M et Caesar R., 2019²¹⁰. Les lipides alimentaires sont dégradés par des lipases permettant d'obtenir divers AG libres. Ces derniers détiennent alors des activités antimicrobiennes ou peuvent servir de substrats métaboliques pour les bactéries intestinales. Ils affectent alors le profil du microbiote ainsi que la production des autres métabolites microbiens, ce qui influence l'homéostasie de l'organisme.

Une étude sur un modèle d'iléite MC-like utilisant un modèle murin de TNF (Δ ARE/WT) montre l'importance de ces médiateurs lipidiques inflammatoires comme biomarqueurs potentiels de la maladie grâce à la mise en évidence de modifications notables dans la production des métabolites issus du cholestérol, des TG ou encore des phospholipides²¹¹. D'ailleurs, un autre modèle murin de colite utilisant des souris Rag2^{-/-} infectées par *Helicobacter hepaticus* montre qu'il existe des modifications métaboliques au niveau sérique, marquées par des changements dans les voies métaboliques des AG et du tryptophane susceptible d'identifier un état pathologique²¹². Ce profil métabolique a été également quantifié chez d'autres modèles murins de colite chimio-induite afin de différencier un animal malade ou non^{213,214}. Ces modifications métaboliques peuvent également être objectivées chez les patients atteints de MICI comparativement aux sujets sains^{215,216}. D'ailleurs, ces analyses sont également réalisables sur d'autres matrices telles que le plasma, le sérum ou encore l'urine²¹⁷. Les profils métaboliques obtenus sur ces deux dernières matrices seraient capables d'identifier les patients atteints de MICI²¹⁸.

En ce qui concerne les modifications métaboliques observées au niveau fécal, celles-ci peuvent fournir des indications précises sur la façon dont le microbiote contribue au maintien de l'inflammation intestinale. En effet, ces modifications révèlent une corrélation entre la signature microbienne et la composition des métabolites fécaux dont le profil serait pathognomonique d'une MICI^{215,219}. Toutefois, ces profils métaboliques ne permettent pas aujourd'hui de différencier une MC d'une RCH²²⁰.

Les profils métaboliques observés chez les patients atteints de MICI concernent essentiellement le tryptophane, les AGCC, les AG saturés et insaturés ou encore diverses petites molécules comme l'acide biliaire^{205,207,217,221,222}.

2. Le tryptophane

Pour l'organisme humain, le tryptophane est un acide aminé aromatique essentiel (**Figure 5**). Toutefois, même si ce dernier est indispensable pour l'Homme, il ne peut être synthétisé de manière suffisante par l'organisme, il nécessite donc un apport exogène par l'alimentation. Le tryptophane provient de divers apports nutritionnels dont les végétaux (légumineuse, fruits à coque, ...) qui représentent la meilleure source, bien qu'il soit aussi présent dans les produits d'origine animale comme la viande (volaille et poisson) ou encore les produits laitiers^{217,223,224}. Le tryptophane ainsi disponible peut être engagé dans trois voies principales. La voie kynurénine qui métabolise la majorité du tryptophane alimentaire ; la voie sérotonine (un neurotransmetteur important du système nerveux central) ; la troisième voie concerne la production des indoles par le microbiote. Les indoles agissent alors comme des ligands pour le récepteur d'aryl hydrocarbure (AhR), un récepteur impliqué dans la pathogenèse des MICI^{217,224}.

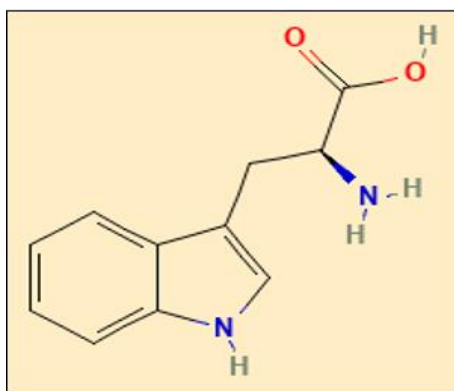


Figure 5 : Structure chimique du tryptophane, figure adaptée d'après PubChem, Tryptophan, National Library of Medicine, 2004²²⁵.

Nikolaus S *et al.*, ont pu montrer dans une cohorte de patients atteints de MICI qu'il existe une corrélation inverse entre l'augmentation du métabolisme du tryptophane et l'activité de la maladie²²². Cette observation a été secondairement confirmée par d'autres travaux montrant de faibles taux sériques de tryptophane au cours des maladies auto-immunes et chez des patients atteints de MICI^{223,226,227}. D'autre part, des échantillons de muqueuse de patients atteints de la MC montrent aussi une expression réduite du récepteur AhR²²⁸. D'autres résultats récents démontrent que les métabolites de l'indole présentent un effet protecteur dans un modèle murin de colite chimio-induite. Cette protection s'opère *via* le récepteur AhR qui à son tour régule l'expression du récepteur de l'IL-10²²⁹. Ces données sont à rapprocher de celle obtenue sur un modèle expérimental de colite chimio-induite au cours duquel l'utilisation de souris déficientes est associée à une augmentation de la sévérité de la colite et une perte de poids prononcée^{164,223,230}.

3. Les acides gras

Les AG sont un ensemble de molécules hydrophobes dont la structure détermine leur fonction biologique et dont la composition est spécifique des espèces et des tissus. Ce sont des molécules extrêmement importantes pour la cellule puisqu'elles sont utilisées comme composants clés pour la membrane cellulaire, comme précurseurs pour la synthèse de certains médiateurs et comme sources importantes d'énergie chez l'Homme²³¹⁻²³³. Ces AG sont des composants essentiels des triacylglycérols localisés dans les graisses ainsi que dans les huiles et représentent la 2^{ème} source d'énergie alimentaire pour l'Homme²³⁴. Ces molécules

peuvent être synthétisées par l'organisme *via* un processus métabolique nommé « lipogénèse »²³⁵. Cependant, en raison de l'absence de certaines désaturases, tous les AG ne peuvent pas être endogènes ce qui nécessite un apport nutritionnel par différents types d'aliments comme les graisses végétales ou animales ainsi que les huiles végétales. De plus, lorsque les AG circulent dans le sang, on les retrouve soit sous la forme « d'ester », soit sous une forme « libre » où ils sont toujours liés à une protéine de transport comme l'albumine²³⁶.

Les AG « saturés » proviennent des graisses animales comme le beurre ou des huiles végétales tropicales (noix de coco ou palme). Les AG « insaturés » quant à eux, proviennent de la nutrition marine (comme les algues, la chair et les huiles de poisson) ou de certaines huiles végétales (comme l'huile de soja et l'huile d'olive)²³⁷. Les AG les plus abondants au sein des tissus humains sont ceux contenant entre 16 et 18 carbones tels que les acides stéarique, palmitique, oléique ou encore linoléique²³⁷.

A. La structure des acides gras

Les AG sont constitués d'une chaîne d'atomes de carbone et d'hydrogène ainsi que d'un groupe acide carboxylique (**Figure 6A**). La chaîne de ces composés varie entre 2 et 30 carbones²³⁷. Cette chaîne carbonée peut être dite saturée (simple liaison) ou insaturée (monoinsaturée = 1 double liaison ou polyinsaturée ≥ 2 doubles liaisons) (**Figure 6B**). Ces composés sont aussi classés selon le nombre de carbone constituant leur chaîne principale : à chaîne courte (≤ 5 carbones) ; à chaîne moyenne (6 à 12 carbones) ou encore à chaîne longue (≥ 13 carbones)^{231,238-240}. De plus, la configuration des doubles liaisons va engendrer une structure tridimensionnelle particulière. Ainsi, les doubles liaisons peuvent adopter deux types de configuration, la configuration « cis » ou la configuration « trans », selon la localisation des carbones situés sur celles-ci (**Figure 6C**)^{231,237}. Selon la configuration des AG, l'isomérisation, les propriétés physicochimiques et les propriétés biologiques seront influencées²⁴¹. La plupart des AG insaturés naturels sont de configuration « cis » alors que les AG insaturés de configuration « trans » sont le plus souvent d'origine industrielle. D'ailleurs, il existe une relation étroite entre

une consommation importante d'AG « trans » et le développement de pathologies cardiovasculaire telles que l'athérosclérose²⁴¹⁻²⁴³.

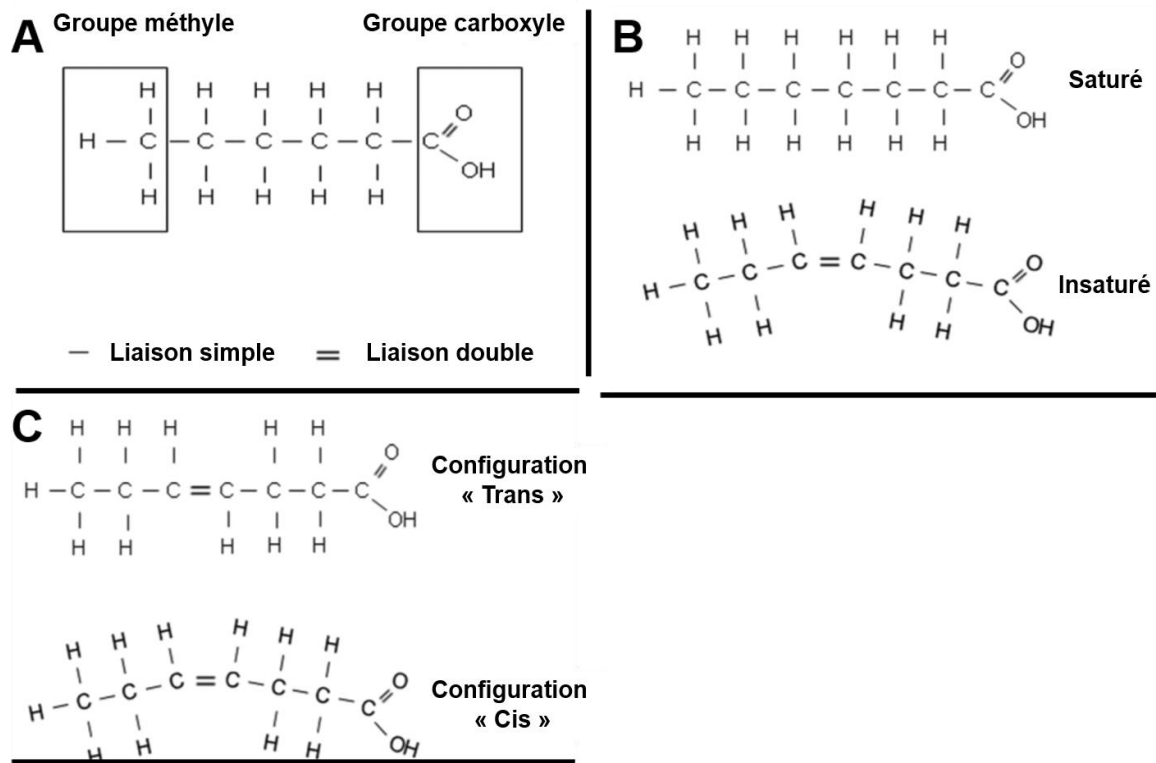


Figure 6 : Structure et conformation des acides gras. (A) Composition d'un AG. (B) Présentation d'un AG saturé par l'ajout d'un hydrogène et d'un AG insaturé constitué de doubles liaisons. (C) Configurations possibles en « cis » ou en « trans », selon l'orientation des atomes par rapport à la double liaison, figure adaptée d'après Kalish BT *et al.*, 2012²³¹.

B. La biosynthèse des acides gras chez les animaux

Les AG sont principalement synthétisés à partir des glucides au sein du foie, des glandes mammaires ou du tissu adipeux chez les mammifères²⁴⁴. Dans un premier temps, les glucides sont convertis en pyruvate qui est décarboxylé par un complexe enzymatique au sein des mitochondries pour former de l'acétyl-CoA. Ensuite, ce dernier est condensé avec de l'oxaloacétate pour obtenir du citrate *via* une citrate synthase. Le citrate quitte alors son cycle afin d'être dirigé vers le cytosol *via* un transporteur à travers la membrane mitochondriale. Une fois dans le cytosol, celui-ci est clivé en acétyl-CoA et en oxaloacétate grâce à une ATP citrate lyase. L'oxaloacétate cytosolique est ensuite transporté vers la mitochondrie sous la forme

de malate, grâce à une malate déshydrogénase et participe ainsi au cycle de Krebs **(Figure 7)**^{236,245}.

La biosynthèse des AG s'effectue avec l'acétyl-CoA qui est carboxylé en malonyl-CoA à l'aide de NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) et en présence d'acétyl-CoA-carboxylase^{246,247}. Puis, ce malonyl-CoA subit plusieurs étapes d'élongation qui permet d'allonger la chaîne des AG par paire de carbones^{248,249}. L'élongation se poursuit jusqu'à la formation de l'acide palmitique (C16 :0) qui peut à son tour donner lieu à d'autres AG saturés à chaîne longue et/ou à des réactions de désaturation donnant lieu à des AG insaturés à chaîne longue **(Figure 7)**²³¹.

Une fois cette biosynthèse achevée, les AG forment des TG, représentant la plus grande source d'énergie chez les animaux ainsi que la forme majeure de stockage de ces molécules²³⁶. Par la suite, les TG peuvent subir une lipolyse permettant de libérer les AG. Ces derniers circulent alors dans le plasma et peuvent être récupérés comme source d'énergie par diverses cellules *via* une étape d'oxydation donnant lieu à de l'ATP (adénosine triphosphate)^{236,250}.

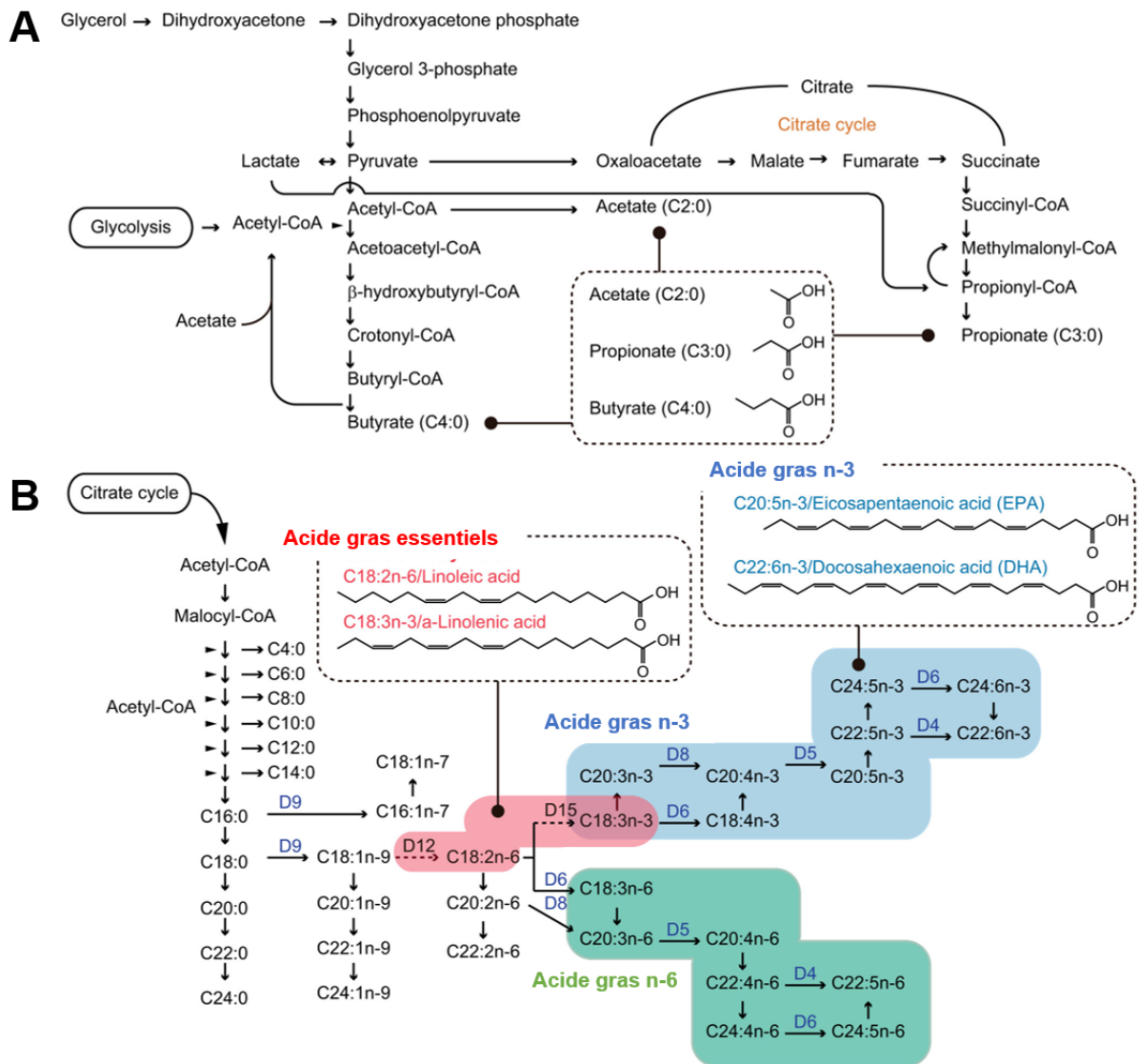


Figure 7 : Biosynthèse des acides gras chez les animaux. (A) Biosynthèse des acides gras à chaîne courte (AGCC). (B) Biosynthèse des acides gras à chaîne moyenne et longue (AGCM et AGCL), figure adaptée d'après Kimura I *et al.*, 2020²³⁶.

C. Apport de ces acides gras sur la composition du microbiote et sur la santé

L'alimentation et notamment les fibres alimentaires représentent une source d'énergie essentielle pour le microbiote. D'ailleurs, ce sont les bactéries anaérobies qui activent leur machinerie contenant des mécanismes, des voies métaboliques et des enzymes permettant de métaboliser les fibres afin d'obtenir de nombreux nutriments²⁵¹. Les AG provenant de l'alimentation sont principalement présents sous forme de TG. Ils proviennent des graisses animales ou végétales notamment pour les acides gras à chaîne moyenne ou longue (**Figure 8A**). Pour les AGCC, ils sont

présents à la fois dans les aliments fermentés mais sont principalement issus de la fermentation des fibres par le microbiote intestinal (**Figure 8B**)²³⁶.

En parallèle, des études révèlent qu'une accumulation de graisses dans le corps, liée à une prédisposition génétique et à un manque d'activité physique, peut aussi être influencée/aggravée par un ratio déséquilibré en AG^{240,252,253}. Bien que les AG alimentaires présentent un effet sur la composition du microbiote intestinal, les mécanismes impliqués restent cependant à préciser^{254–256}.

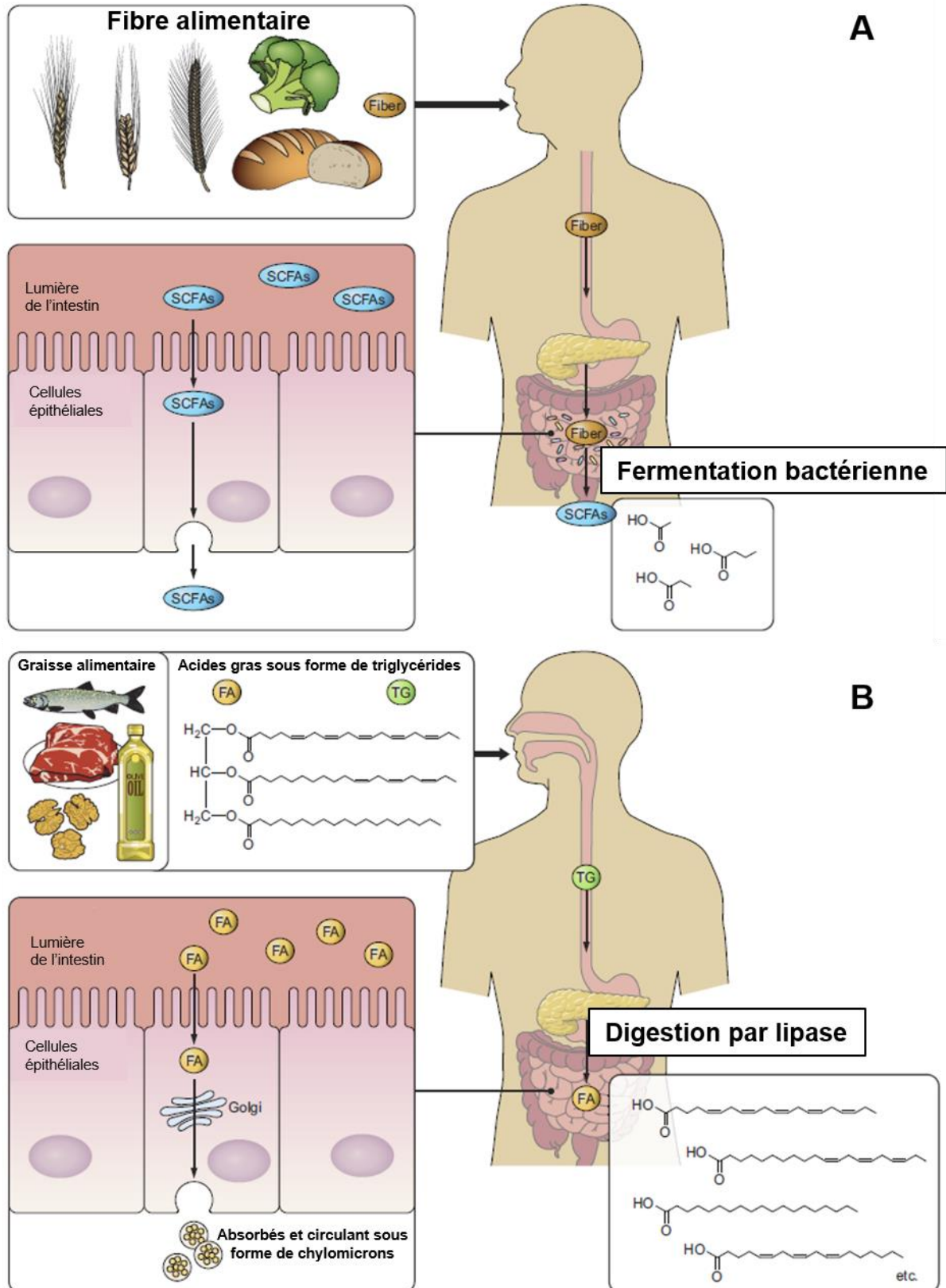


Figure 8 : Illustration de l'apport alimentaire en acide gras chez l'Homme. (A) Obtention des acides gras à chaîne courte (SCFA ; AGCC) *via* la fermentation des fibres alimentaires par diverses bactéries intestinales. (B) Absorption des triglycérides (TG) et des acides gras (FA ; AG) des graisses animales ou végétales. Ces derniers subissent une digestion par lipase permettant d'obtenir des acides gras « libres » avant de circuler sous la forme de chylomicrons et d'influencer l'homéostasie de l'organisme, figure adaptée d'après Kimura I *et al.*, 2020²³⁶.

4. Les acides gras à chaîne courte

Les AGCC sont des composés dont la chaîne alkyle est inférieure à 6 carbones (**Figure 9**). On retrouve donc les acides acétique (C2 :0), propionique (C3 :0), butyrique (C4 :0) et valérique (C5 :0)²⁵⁷. Ces AGCC sont produits par fermentation des fibres alimentaires et représente l'une des activités la plus importante du microbiote intestinal^{258,259}. Parmi ces derniers, les plus abondants sont le butyrate, l'acétate et le propionate^{240,260}. En termes de localisation, les acides acétique, propionique et butyrique ou encore l'acétate et le propionate sont principalement retrouvés dans l'intestin. Dans le cas du butyrate, il est quant à lui retrouvé essentiellement au sein du côlon et du cæcum^{164,261}. Après leur production, ces derniers sont absorbés par les cellules épithéliales de l'intestin ou du côlon de différentes manières (diffusion non ionique, transport médié ou par échange)²⁶². Ces molécules sont alors dirigées dans la veine mésentérique supérieure ou inférieure, selon leur localisation au sein du tractus digestif, avant de passer dans la veine porte puis dans le foie²⁶³. Ils peuvent également passer par une autre voie impliquant la veine cave inférieure pour jouer un rôle clé dans la circulation²⁰⁵. Ces derniers détiennent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme, du système immunitaire, influencent le système nerveux autonome et la sécrétion d'hormones intestinales ou exercent encore des effets anti-prolifératifs sur les cellules cancéreuses^{238,251,257,261,264}.

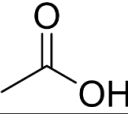
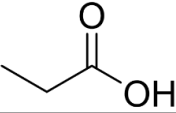
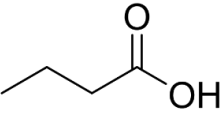
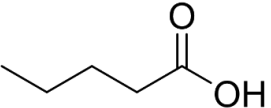
Acides gras	Structures
Acide acétique	
Acide propionique	
Acide butyrique	
Acide valérique	

Figure 9 : Principaux acides gras saturés à chaîne courte, figure adaptée d'après Ueyama J *et al.*, 2020²⁶⁵.

Ces AGCC sont essentiellement reconnus par des récepteurs couplés aux protéines G. Parmi les récepteurs impliqués dans leur reconnaissance, on retrouve le récepteur GRP41/FFAR3 (G-protein coupled receptor 41/free fatty acid receptor 3), le récepteur GRP43/FFAR2 (G-protein coupled receptor 43/free fatty acid receptor 2) ou encore le récepteur « GRP109A ». Ces derniers se situent dans les cellules épithéliales intestinales, dans certaines cellules du système immunitaire ou encore dans les adipocytes²⁵⁷.

Certaines études sur des modèles murins de colites chimio-induites montrent la présence d'un lien entre ces métabolites bactériens et le développement des MICI ou du CCR. En effet, comme évoqué précédemment, la fermentation des fibres alimentaires par certaines bactéries donne lieu à des AGCC cruciaux pour l'homéostasie du côlon et de sa muqueuse. Ainsi, ces derniers sont capables d'influencer la barrière épithéliale et l'inflammation intestinale^{57,101}. D'autre part, il a été montré qu'au cours d'une cancérogenèse colique, une variation au sein de la diversité de ces métabolites bactériens est observée. Ainsi, cette variation est corrélée à une augmentation de certains métabolites délétères comme les composés azotés au détriment des métabolites protecteurs comme le butyrate^{101,160,266,267}.

Cependant, l'un des composés le mieux décrit dans la littérature reste l'acide butyrique. Il est connu pour exercer des effets bénéfiques et protecteurs au niveau colique en maintenant l'intégrité des muqueuses, en renforçant la fonction de la barrière intestinale, en inhibant les processus de carcinogenèse et en exerçant des propriétés anti-inflammatoires. Ces propriétés sont médiées par des effets sur l'immunité, la modulation épigénétique et l'expression de certains gènes comme ceux codant les mucines^{57,121}. Le butyrate joue aussi un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale et protège contre les colites. Les effets anti-inflammatoires du butyrate s'effectuent en régulant à la hausse la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, par une production accrue des cellules T reg ainsi que par un approvisionnement en énergie des cellules épithéliales^{121,268}. D'autres données expérimentales obtenues sur un modèle de CCR associé à une colite chimio-induite par DSS chez le rat, démontrent que l'augmentation de la butyrogenèse est liée à une expression accrue du récepteur GRP43/FFAR2. L'expression accrue de ce récepteur amène alors à une inhibition de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), du facteur NF- κ B ainsi que de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β ou le TNF α , conduisant à une réduction de l'inflammation^{57,269}. D'autres propriétés biologiques ont été rapportées pour le butyrate telles qu'une activité inhibitrice sur l'histone désacétylase, lui permettant d'induire la différenciation des cellules T reg *via* une acétylation accrue de la protéine FOXP3^{270,271}. Dans un modèle murin de colite dépendant des cellules T (induite par un transfert adoptif de cellules CD4(+) CD45RB(hi) chez des souris Rag1(-/-)), l'ajout du butyrate joue un rôle bénéfique dans l'atténuation de la colite tout en mettant en évidence une augmentation des cellules T reg²⁷². Des données cliniques montrent aussi une réduction du butyrate ainsi que d'autres AGCC dans les extraits fécaux des patients atteints de MC ou de RCH²⁷³⁻²⁷⁵. Il est intéressant de souligner que ces résultats sont en cohérence avec la diminution de certaines bactéries productrices de butyrate, comme *F. prausnitzii*, observée lors de la dysbiose des patients atteints de MICI^{217,276}. Ces données suggèrent alors une corrélation entre l'inflammation, la composition du microbiote intestinal et le métabolisme lipidique, cet effet peut s'exercer à la fois au niveau local mais également au niveau systémique^{277,278}.

Des propriétés anti-inflammatoires et des effets antimicrobiens comparables à ceux du butyrate ont été également rapportés pour les acides lactique, acétique et propionique^{138,279}.

5. Les acides gras à chaîne moyenne

Les acides gras à chaîne moyenne (AGCM) sont des composés dont la chaîne alkyle est constituée de 6 à 12 carbones²⁴⁰. Parmi ces derniers, les plus répandus sont l'acide caproïque (C6 :0) ; caprylique (C8 :0) ; caprique (C10 :0) et laurique (C12 :0) (**Figure 10**)²⁸⁰. Sur le plan de la nutrition, ils se retrouvent essentiellement présents dans le lait animal, la noix de coco ou encore dans l'huile de palme²⁸¹⁻²⁸³. En termes de reconnaissance, ces AGCM sont essentiellement reconnus par le récepteur GRP40/FFAR1²³⁶.

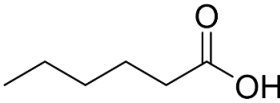
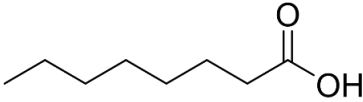
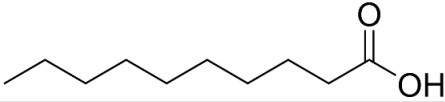
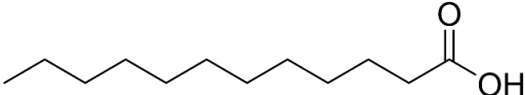
Acides gras	Structures
Acide caproïque	
Acide caprylique	
Acide caprique	
Acide laurique	

Figure 10 : Principaux acides gras à chaîne moyenne, figure adaptée d'après Jackman JA *et al.*, 2020²⁸⁰.

Ces AGCM sont capables d'intervenir dans la régulation de la synthèse protéique, d'agir sur les rôles de l'insuline, d'induire notamment la satiété, d'augmenter l'activité des enzymes des muqueuses intestinales ou encore d'exercer des effets immunomodulateurs^{240,280,284}. De plus, diverses études *in vitro* soulignent des propriétés immuno-modulatrices de ces AGCM²⁸⁵⁻²⁸⁷. Des activités antimicrobienne, antivirale et antifongique leur ont également été attribuées^{280,288,289}.

En termes de nutrition clinique, les AGCM ont été introduits dans les années 1950. Leurs propriétés en termes d'absorption rapide et de solubilité en font des molécules de choix pour le traitement diététique des syndromes de malabsorption^{290,291}. En effet, après hydrolyse, ils sont absorbés au sein du système gastro-intestinal avant d'être transportés, par la veine porte, directement dans le foie où ils sont rapidement métabolisés *via* une β -oxydation²⁹¹. Au niveau expérimental, il a été montré chez des porcelets sevrés que l'introduction d'une alimentation riche en AGCM modifie significativement la biodiversité du microbiote intestinal ainsi que la composition des métabolites bactériens qui en dérivent²⁹². Une autre étude expérimentale chez le porc met en évidence des propriétés anti-inflammatoires de l'acide caprique passant par une diminution de la production de TNF α et d'IL-6, tout en stimulant la barrière épithéliale²⁹³. C'est également le cas dans une étude où l'acide caprylique exerce un effet bénéfique sur la barrière épithéliale intestinale en renforçant l'expression et la sécrétion de certains peptides antimicrobiens tels que les β -défensines tout en réduisant la translocation bactérienne²⁹⁴. En parallèle, une autre étude expérimentale impliquant des souris *C57BL/6* montre qu'un régime riche en AGCM diminue le ratio *Firmicutes* sur *Bacteroidetes* contribuant à une perte de poids avec un effet protecteur contre l'obésité. De plus, les souris bénéficiant de ce régime montrent aussi une augmentation importante en AGCC dans leurs selles²⁹⁵. En revanche, une diminution de ce ratio ainsi que le maintien des *Bifidobacterium spp.* et des *Lactobacillus spp.* sont corrélés à la production d'AGCC^{240,296–298}. D'autres données montrent justement que les AGCC, comme l'acétate ou le lactate, sont majoritairement produits par des bactéries comme les *Bifidobacterium spp.* ou les *Lactobacillus spp.*, avec des effets préventifs sur l'obésité, le diabète ou les MICI^{299–302}.

En dépit de l'accumulation de ces données expérimentales montrant les effets bénéfiques des AGCM, peu d'études cliniques mentionnent leurs effets bénéfiques sur la modulation du microbiote intestinal ou sur les troubles métaboliques (l'obésité ou les MICI).

6. Les acides gras à chaîne longue

Les acides gras à chaîne longue (AGCL) sont des composés dont la chaîne alkyle est supérieure à 13 carbones²⁴⁰. En revanche, ces derniers sont absorbés différemment par rapport aux AGCC ou AGCM. En effet, leur absorption est réalisée au niveau des villosités intestinales où ils sont réassemblés en TG. Ensuite, ces derniers sont entourés de cholestérol et de protéines formant des apolipoprotéines nommées « chylomicrons ». Puis, leur transport s'effectue dans un canal lymphatique *via* les chylomicrons (**Figure 8B**). Ils passent alors du canal thoracique à la circulation systémique²³⁶. Les AGCL peuvent être divisés en plusieurs sous-catégories : les saturés (pas de double liaison) ou les insaturés comprenant les mono-insaturés (1 double liaison) et les poly-insaturés (≥ 2 doubles liaisons)³⁰³. Parmi les récepteurs impliqués dans leur reconnaissance, on retrouve les récepteurs GRP40/FFAR1 et GRP120/FFAR4²³⁶.

A. Les acides gras saturés

Parmi ces derniers, les plus répandus notamment dans l'alimentation sont les acides myristique (C14 :0), palmitique (16 :0) et stéarique (C18 :0) (**Figure 11**)²⁴⁰. Les AGCL saturés rentrent dans la composition du lait animal, de la noix de coco, de l'huile d'olive ou encore de l'huile de palme^{237,282,283}. De surcroît, le régime dit « occidentalisé », constitué essentiellement d'aliments transformés et de viande, est riche en AGCL saturés. Or, cette alimentation provoque un surplus d'apport en graisse créant un déséquilibre du métabolisme aboutissant à la prise de poids et à des maladies inflammatoires³⁰⁴. Par exemple, il a été mis en évidence que l'acide palmitique peut favoriser l'inflammation³⁰⁵.

Les études expérimentales portant sur un apport riche en AGCL saturés mettent en évidence un effet notable sur le microbiote intestinal avec notamment une augmentation du ratio *Firmicutes* sur *Bacteroidetes*. Dans les modèles murins, il a été possible de montrer que ce régime alimentaire est corrélé à une augmentation du développement de l'obésité, de la prise de poids ainsi qu'un effet pro-inflammatoire au niveau intestinal^{306,307}.

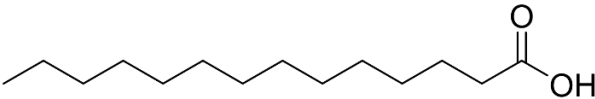
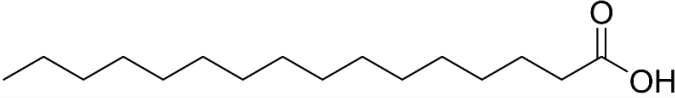
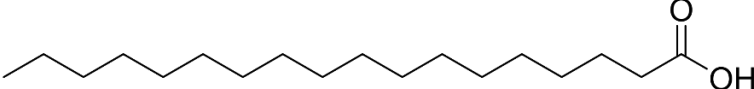
Acides gras	Structures
Acide myristique	
Acide palmitique	
Acide stéarique	

Figure 11 : Principaux acides gras saturés à chaîne longue, figure adaptée d'après Tvrzicka E et al., 2011²³⁷ et d'après Rioux V, Pédrone F, Legrand P, 2010³⁰⁸.

B. Les acides gras monoinsaturés

Dans des conditions physiologiques saines, les AGCL saturés peuvent subir une désaturation qui se déroule dans le réticulum endoplasmique. Cette désaturation, réalisée par une acide gras désaturase, donne lieu à une double liaison entre les atomes de carbone. Ainsi, l'acide palmitique peut être transformé en acide palmitoléique (C16 :1) par désaturation. Il peut aussi être transformé en acide stéarique par élongation suivi d'une désaturation pour donner l'acide oléique (C18 :1) (**Figures 12 et 13**)²⁴⁰. Les AGCL monoinsaturés peuvent donc être synthétisés *de novo* chez l'Homme²³¹. Ces derniers ont de nombreuses activités comme la capacité de réduire l'inflammation, le stress oxydatif, servir de médiateurs dans la différenciation cellulaire ou encore d'améliorer l'homéostasie du glucose^{309,310}.

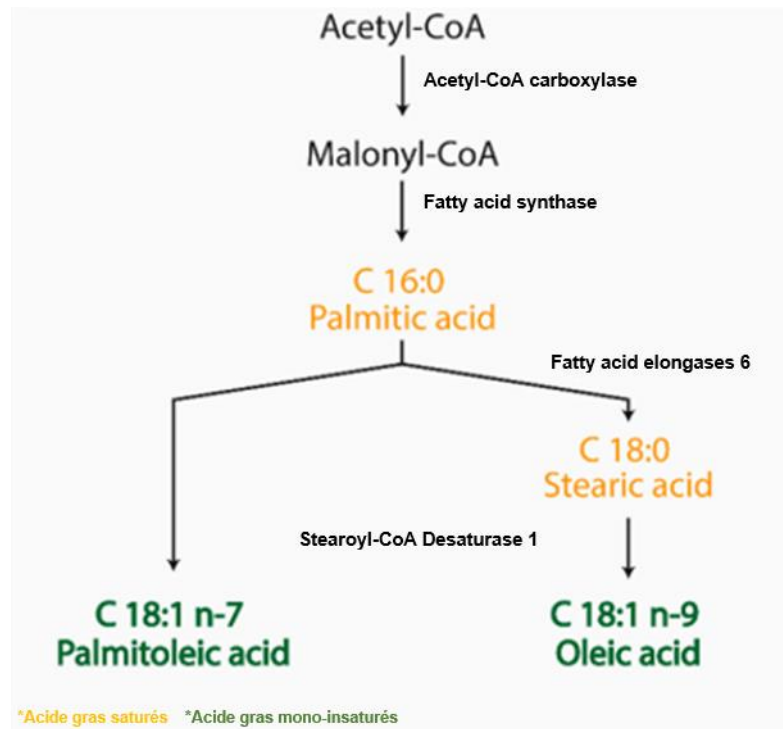


Figure 12 : Illustration de la biosynthèse des acides gras monoinsaturés à chaîne longue, figure adaptée d'après Piccinin E *et al.*, 2019³⁰⁹.

Acides gras	Structures
Acide palmitoléique	<chem>CCCCC/C=C\CCCCCCCC(=O)O</chem>
Acide oléique	<chem>CCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC(=O)O</chem>

Figure 13 : Principaux acides gras monoinsaturés à chaîne longue, figure adaptée d'après Tvrzicka E *et al.*, 2011²³⁷ et d'après Sansone A *et al.*, 2016³¹¹.

Parmi les AGCL monoinsaturés, l'acide oléique semble être le plus abondant au sein de notre apport alimentaire ainsi que dans la muqueuse colique³¹². Il représente entre 50 et 80% des AG totaux issus de l'huile d'olive qui est la principale source de lipides dans le régime méditerranéen³⁰⁹. Cette molécule peut aussi être synthétisée de manière endogène par l'organisme. L'enzyme impliquée dans sa production est la stéaroyl-CoA désaturase 1³⁰⁹. L'acide oléique montre un rôle bénéfique dans de nombreuses maladies comme les maladies coronariennes ou encore le cancer³⁰⁹. Il possède également une forte activité immunomodulatrice. En effet, une étude démontre que l'acide oléique est capable d'inhiber la prolifération

des cellules T ainsi que la production de certaines cytokines comme l'IL-2 et l'IFN γ ³¹³. D'autres données mettent aussi en évidence que l'acide oléique permet d'augmenter l'activité fongicide des macrophages murins sur *C. albicans*³¹⁴. De même, une étude de Padovese R & Curi R, montre que cette molécule augmente également l'activité fongicide et la phagocytose des neutrophiles sur *C. albicans*³¹⁵.

Une étude expérimentale s'est intéressée à l'impact de l'ajout d'acide oléique dans un *modèle in vitro* d'inflammation intestinale. Dans cette étude, il a été montré que l'ajout de l'acide oléique permet de diminuer l'expression d'ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire 1) dont l'expression est fortement accrue lors des réactions inflammatoires³¹². Une autre étude expérimentale impliquant l'acide stéarique démontre un effet inverse de celui-ci en augmentant l'expression d'ICAM-1 ainsi que l'activation du NF- κ B dont les effets sont réversibles lors de l'ajout de l'acide oléique³¹⁶. D'un point de vue clinique, il est intéressant de noter que chez les patients atteints de MICI, une diminution des proportions d'acide oléique et d'acide palmitoléique est observée au niveau colique³¹⁷.

C. Les acides gras polyinsaturés

L'organisme humain peut également produire des AGCL polyinsaturés, sauf pour deux d'entre eux. En effet, comme précisé auparavant, notre organisme ne possède pas toutes les désaturases nécessaires à la biosynthèse de l'ensemble des AG. C'est notamment le cas pour celles permettant d'insérer une double liaison en position 3 ou en position 6²³¹. Ces deux AGCL polyinsaturés sont donc des molécules essentielles, qui jouent un rôle clé pour la santé de l'Homme³¹⁸. Il faut également souligner que l'on parle d'AG essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés *de novo* par l'organisme et passe principalement par un apport alimentaire²³⁶.

Parmi ces AGCL polyinsaturés, deux grandes familles sont représentées : celle dont le précurseur est l'acide α -linoléique et celle dont le précurseur est l'acide linoléique³¹⁹. Dans le cas de l'acide α -linoléique, les doubles liaisons sont séparées par 3 atomes de carbone de l'extrémité méthyle, d'où la famille des oméga-3. Alors que dans le cas de l'acide linoléique, les doubles liaisons sont séparées par 6

atomes de carbone de l'extrémité méthyle, d'où la famille des oméga-6²³⁶. Ces AG essentiels subissent alors diverses réactions de désaturation et d'élongation mettant en jeu de nombreuses étapes enzymatiques. Parmi les principaux AG issus de ces deux familles, on retrouve l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), lorsque le précurseur est l'acide α -linoléique (n-3), alors que dans le cas de l'acide linoléique (n-6), ces étapes donnent naissance à l'acide arachidonique (**Figure 14**)³²⁰. Il est important de souligner que l'EPA et le DHA sont faiblement synthétisés et nécessitent aussi un apport exogène par l'alimentation.

Par la suite, ces molécules seront soumises à l'action de trois classes d'enzymes : la cyclooxygénase qui produit les prostaglandines et thromboxanes ; la lipooxygénase qui produit les leucotriènes et la lipoxine ; l'époxydase qui produit l'acide époxyeicosatriénoïque³²¹. L'ensemble de ces réactions enzymatiques donne naissance à des médiateurs inflammatoires et des molécules de signalisation. Parmi ces médiateurs, on trouve principalement les eicosanoïdes comme les leucotriènes, les prostaglandines ou les thromboxanes. On retrouve aussi des molécules anti-inflammatoires comme les résolvines, les protectines ou encore les marésines (**Figure 12**)³²².

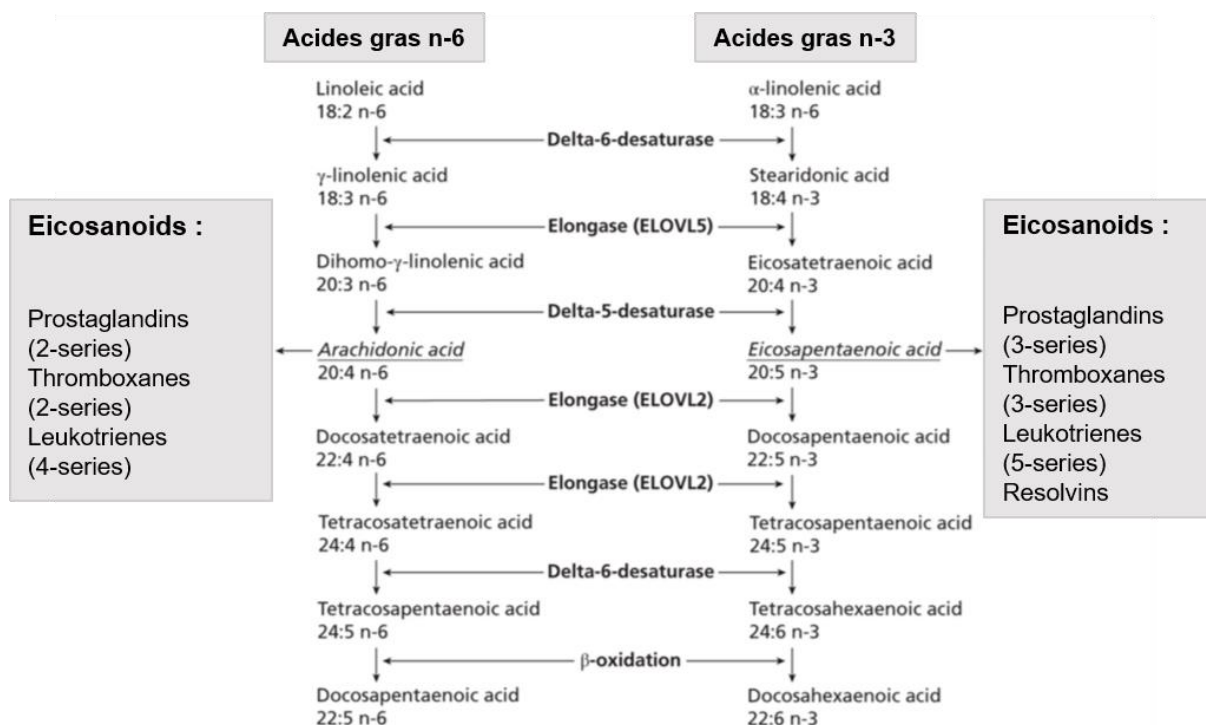


Figure 14 : Métabolismes des acides gras polyinsaturés n-3 et n-6, figure adaptée d'après Harwood J *et al.*, 2019³²².

Ainsi, il est important de souligner que l'acide linoléique est le précurseur de puissants médiateurs pro-inflammatoires des eicosanoïdes comme la prostaglandine 2 ou le leucotriène B4²³⁶. Ces derniers sont alors impliqués dans les processus inflammatoires puisqu'ils ont une action chimiotactique, favorisent l'agrégation plaquettaire et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 β ou encore l'IL-6³²¹. A l'inverse, l'acide α -linoléique est le précurseur de molécules comme la prostaglandine 3 ou le leucotriène B5, ainsi que d'autres petites molécules récemment identifiées et impliquées dans la résolution de l'inflammation comme les résolvines, les protectines ou encore les marésines^{236,323}. Ces molécules ont alors un rôle antagoniste des médiateurs pro-inflammatoires en diminuant la durée de l'inflammation, en stimulant la cicatrisation des lésions et en augmentant la libération de cytokines anti-inflammatoires³²¹. Au-delà des molécules impliquées dans la modulation de l'inflammation comme les marésines ou résolvines issues des n-3, il a été montré que les n-3 peuvent directement modifier l'activité de certains facteurs de transcription comme diminuer l'activation de NF- κ B, qui a des propriétés pro-inflammatoires, ou augmenter la transcription de PPAR γ (Peroxisome

proliferator-activated receptor), qui a des propriétés anti-inflammatoires^{324,325}. Ils peuvent aussi moduler certains récepteurs membranaires comme TLR4³²¹.

Les recherches pour définir une corrélation entre ces molécules et les MICI ont débuté depuis les années 1980/1990. Une étude sur un modèle murin montre qu'une administration d'oméga-3 permet de réduire l'infiltration des cellules immunitaires et d'améliorer la dysbiose *via* une augmentation importante des *Lactobacilles* et des *Bifidobactéries*³²⁶. Ces résultats sont corroborés par une étude clinique qui révèle qu'un apport journalier des EPA (4g/jour), pendant 12 semaines à des patients atteints de RCH, permet une amélioration des symptômes liés à une baisse de la production en leucotriène B4³²⁷.

D'un point de vue épidémiologique, il a été montré un lien entre la consommation des AGCL polyinsaturés et le développement de l'inflammation intestinale^{53,328,329}. Ces données sont en cohérence avec l'augmentation de l'incidence des MICI dans les populations à régime alimentaire « occidentalisé ». Ce régime caractérisé par une abondance des AGCL saturés est réputé pour avoir un ratio n-6 sur n-3 élevé^{53,303,322,329}. Ces observations sont d'autant plus originales qu'il a été montré récemment qu'il existe une relation entre le polymorphisme génétique de *CYP4F3* (gène de la leukotriene-B(4) omega-hydroxylase 2) et une altération de la proportion des AGCL polyinsaturés n-6/n-3 prédisposant au développement de l'inflammation intestinale associée à la MC. Le gène *CYP4F3* est exprimé dans les cellules immunitaires de l'intestin et représente un modulateur clé du processus inflammatoire de par sa capacité à inactiver les leucotriènes B4³³⁰.

D. Les acides gras « trans »

Les AGCL « trans » sont des isomères stériques des AGCL insaturés « cis ». Des études épidémiologiques ont montré que la consommation importante de ces AG est un facteur de risque pour le développement de plusieurs processus pathologiques dont les MICI^{241,243,331}.

Les mécanismes par lesquels ces AG affectent l'inflammation intestinale commencent juste à être explorés. Les travaux récents de Higashimura Y *et al.* montrent que l'élaïdate, un isomère trans de l'oléate, augmente la production d'IL-1 β ainsi que l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse. Cette même étude révèle que l'administration de l'élaïdate aux souris souffrant de colite TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique) induite augmente drastiquement les dommages et la production de l'IL-1 β colique³³¹.

Ainsi, malgré une meilleure compréhension des interactions établies entre l'hôte, le microbiote intestinal et ses dérivés métaboliques, il reste beaucoup de zones d'ombre autour de l'implication des métabolites lipidiques dans le déclenchement des processus inflammatoires ainsi que la régulation de l'équilibre pro- et anti-inflammatoire au niveau intestinal. Il reste également à définir la relation entre la biosynthèse de certains de ces métabolites et la régulation des communautés microbiennes qui assurent l'homéostasie intestinale^{56,238,332,333}.

Partie 4 : *Candida spp*

1. Généralités

Les études expérimentales et cliniques de ces deux dernières décennies suggèrent que le microbiote intestinal contribue à la santé métabolique de l'Homme et influence le risque de multiples maladies¹⁵⁵. Elles ont permis de préciser la composition du microbiote intestinal aussi bien par les méthodes conventionnelles de culture mais également par les approches métagénomiques. Ce microbiote est constitué de bactéries, des archées, des bactériophages, des virus et des champignons³³⁴. Parmi les micromycètes composant le microbiote intestinal, nous retrouvons notamment les espèces du genre *Candida spp*. Ce sont des champignons microscopiques levuriformes unicellulaires qui appartiennent au phylum des Ascomycota, de l'ordre des Saccharomycetales et de la classe des Saccharomycetes³³⁵⁻³³⁷. Ces levures se reproduisent par bourgeonnement et sont généralement retrouvées sous une forme de blastoconidie dont le diamètre se situe entre 2 et 8 μm ³³⁸.

Les espèces du genre *Candida* colonisent naturellement la peau, les muqueuses génitales et gastro-intestinales de l'Homme. D'ailleurs, la présence de ces espèces se retrouvent chez environ 30 à 70% des individus en bonne santé³³⁹. A l'état commensal chez le sujet sain, ces espèces ne sont pas associées à des dommages tissulaires. Ces levures sont des opportunistes et peuvent devenir des pathogènes sous certaines conditions physiopathologiques comme une altération du microbiote intestinal, de la muqueuse digestive ou d'un déficit immunitaire inné ou acquis³³⁹. Ces conditions permettent la prolifération des levures et leur translocation à travers la barrière épithéliale intestinale¹⁰⁵.

L'incidence des infections causées par les levures *Candida* a considérablement augmenté depuis le début des années 2000, en lien principalement avec la progression du nombre accru de patients immunodéprimés et du vieillissement de la population. Il faut également souligner que cette incidence croissante est mondiale avec des taux de mortalité allant de 10 à 70 % selon les populations concernées^{340,341}. Malheureusement, l'importance et la gravité des

candidoses nosocomiales ont été lourdement sous estimées jusque dans les années 1990 où des études épidémiologiques de grande ampleur ont finalement mis en évidence que les espèces du genre *Candida* arrivaient au 4^{ème} rang des agents infectieux responsables de septicémies^{12,342}. Elles arrivent également au 1^{er} rang en termes de mortalité avec un taux élevé pouvant atteindre 50%. De surcroît, ces levures pathogènes sont à l'origine d'un surcoût médico-économique non négligeable^{12,343-345}.

2. Physiopathologie des candidoses

Chez l'Homme, les espèces du genre *Candida*, surtout *C. albicans*, colonisent principalement la muqueuse du tractus digestif et des voies génitales. Ces levures peuvent être responsables de deux formes cliniques bien distinctes :

i) Les infections superficielles avec notamment les candidoses vaginales qui touchent au moins une fois au cours de leur vie 75% des femmes et dont 50% d'entre elles connaissent au moins un second épisode infectieux. Cette entité englobe aussi les candidoses cutanées, unguéales et les candidoses oro-pharyngées. Ces dernières touchent 90% des patients atteints par le virus de l'immunodéficience humaine au cours du stade SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise)^{12,346}.

ii) Les candidoses invasives (CI), qui sont moins fréquentes que les infections superficielles mais bien plus graves. D'autant plus que la translocation puis la dissémination de ces levures à travers la circulation sanguine peut affecter de nombreux organes comme le rein, la rate ou encore le foie et devenir mortelle, on parle de candidose disséminée. Ces infections représentent alors l'une des principales causes de mortalité au sein des soins intensifs. Les CI nécessitent alors un suivi des patients et un diagnostic précis le plus précocement possible afin qu'un traitement approprié soit mis en place selon l'état du patient et la sensibilité aux antifongiques du pathogène responsable de l'infection^{347,348}.

Des facteurs de risque communs sont connus pour être impliqués dans le développement de ces infections plus ou moins profondes. Parmi ces facteurs, on retrouve les séjours prolongés en réanimation, les actes médico-chirurgicaux, les sondes urinaires, les cathéters veineux centraux, les polytraumatismes,

l'immunosuppression sévère, la neutropénie ou encore les chimiothérapies anticancéreuses^{12,339,349}. A elles seules, *C. albicans*, *C. glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* et *Candida krusei* sont responsables de plus de 90 % des épisodes de CI, même si plus de 150 espèces ont été identifiées en pathologie humaine (**Figure 15**)³⁵⁰. *C. albicans* et *C. glabrata* restent majoritaires dans la plupart des études publiées à travers les 5 continents et seraient responsables de plus de 400 000 décès annuellement à travers le monde. Ces deux espèces représentent d'excellents modèles pour étudier la physiopathologie des CI^{337,341,351}. Il est à noter que l'arsenal thérapeutique disponible pour la prise en charge des patients atteints de CI demeure encore limité et que les pratiques médicales ont fait évoluer l'écologie locale en faveur des espèces *non-albicans*. Cette évolution est également marquée par l'émergence de souches résistantes aux azolés (*C. glabrata*), aux échinocandines (*Candida parapsilosis*) voire même à tous les antifongiques comme c'est le cas de *Candida auris*^{348,352}.

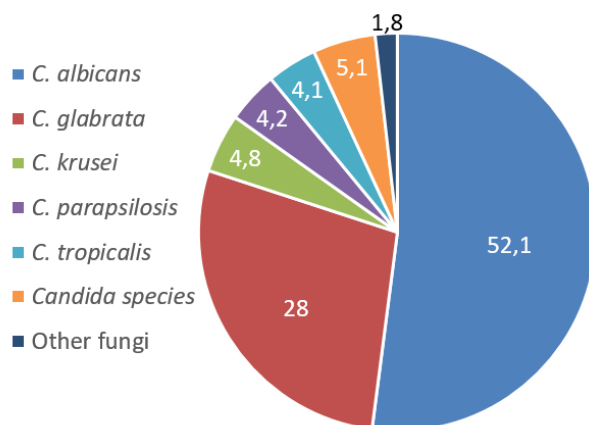


Figure 15 : Répartition des espèces de levures retrouvées au sein d'isolats cliniques. *C. albicans* représente près de la moitié des espèces fongiques retrouvées (52.1%), suivie de *C. glabrata* (28%), de *Candida krusei* (4.8%), de *Candida parapsilosis* (4.2%) et de *Candida tropicalis* (4.1%). Les autres espèces fongiques ne représentent qu'environ 6.9% des espèces retrouvées, figure adaptée d'après Arendrup MC *et al.*, 2013³⁵³.

3. Les facteurs de virulence

Les levures du genre *Candida* présentent un large panel de facteurs de virulence. De par leur prévalence en pathologie humaine, les modèles les plus étudiés sont ceux de *C. albicans* et de *C. glabrata*³³⁷. Ces deux levures présentent des facteurs de virulence communs mais elles demeurent différentes sur plan phylogénétique et phénotypique^{341,351,354}.

A. Les facteurs de virulence de *C. albicans*

Dans le cas de *C. albicans*, nous retrouvons de nombreux facteurs de virulence tels que le dimorphisme permettant de passer d'une forme de blastoconidie à une forme hyphale qui est beaucoup plus invasive, la formation d'un biofilm, le fitness lui permettant une adaptation rapide à son environnement, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques ou encore l'expression de protéines spécifiques nommées adhésines et invasines (**Figure 16**).

Plus précisément, *C. albicans* peut sécréter des adhésines assurant l'interaction de *C. albicans* avec les cellules hôtes. Les plus étudiées parmi ces dernières sont les protéines Als (Agglutinin like sequences), qui est une famille d'adhésines constituée de 8 membres, dont notamment l'Als3 qui est la plus importante pour l'adhésion. On retrouve également la famille de Hwp1 (Hyphal wall protein 1), une autre adhésine importante, permettant de favoriser la colonisation et l'invasion³⁴⁹. En effet, ces protéines vont permettre aux levures d'adhérer aux cellules épithéliales *via* des liaisons covalentes ou non³⁵⁵ en interagissant avec des protéines de l'hôte comme la E-cadherine ou la N-cadherine^{106,356-358}. Il a également été démontré que ces deux adhésines (Als3 et Hwp1) peuvent contribuer à la formation de biofilm³⁵⁹. En parallèle, *C. albicans* peut utiliser d'autres protéines de surface cellulaire permettant les interactions avec l'hôte comme les invasines. Parmi celles-ci, les plus étudiées sont Als3 ou encore Ssa1, un membre de la famille des protéines dites « heat shock protein 70 », qui sont capables de se lier aux E-cadherines de l'hôte et d'induire l'endocytose³⁶⁰⁻³⁶². En parallèle, *C. albicans* peut adhérer et envahir la barrière épithéliale grâce à une activité protéolytique passant par des protéines de la famille des SAPs (secreted aspartyl proteinases), des phospholipases ou encore des lipases. Ce sont des enzymes hydrolytiques capables de digérer des molécules ou des médiateurs de l'immunité afin de résister aux défenses de l'hôte ou encore de déformer les membranes cellulaires permettant de faciliter l'adhésion et l'invasion tissulaire^{363,364}. Ces enzymes peuvent aussi dégrader les E-cadherines des jonctions serrées permettant à la levure de circuler à travers celles-ci^{365,366}.

Ce large panel de facteurs de virulence permet donc à *C. albicans* d'utiliser différentes stratégies pour coloniser puis envahir les cellules hôtes comme l'endocytose induite ou encore la pénétration active. Ainsi, dans le cas de l'endocytose, la levure exprime des protéines de surface cellulaire permettant les interactions avec l'hôte comme les adhésines et les invasines. A l'inverse, la pénétration active nécessite que *C. albicans* soit sous forme hyphale, bien que les facteurs de virulence et les mécanismes mis en œuvre par la levure soient encore l'objet de recherches actives³⁴⁹. Pour beaucoup d'experts, le passage sous forme hyphale semble être essentiel pour traverser l'épithélium intestinal ainsi que pour réaliser l'invasion tissulaire. En revanche, la forme blastoconidie serait nécessaire pour la dissémination¹⁰⁶. Ainsi, la transition du commensalisme vers la pathogénicité peut être divisée en 3 étapes majeures : l'adhésion à la muqueuse et la prolifération fongique, l'invasion des tissus sous-jacents et enfin la dissémination systémique par la voie hématogène. Néanmoins, il n'est pas encore bien défini si la levure initie ces diverses étapes de manière continue ou s'il s'agit d'un processus régulé³³⁹.

Par ailleurs, *C. albicans* est capable de s'adapter aux conditions de stress extrême imposées par l'environnement tissulaire, les médiateurs de l'immunité innée et adaptative et les cellules phagocytaires productrices de ROS ou des espèces réactives de l'azote, contribuant à sa virulence. En réponse, *C. albicans* est capable de sécréter des molécules de détoxification telles que des superoxydes dismutases Sod1 et Sod5 ou encore la catalase Cta1³⁴⁹.

B. Les facteurs de virulence de *C. glabrata*

Dans le cas de *C. glabrata*, il s'agit d'une levure monomorphe dont le génome est haploïde³⁵¹. La plupart des mécanismes d'invasion tissulaire de ce pathogène ne sont pas définis même s'il est communément supposé que cette espèce utilise principalement l'endocytose des cellules hôtes (**Figure 16**)^{351,367}. D'ailleurs, les principaux facteurs de virulence de *C. albicans* tels que la formation d'hyphes ou encore l'activité protéinase sécrétée, connus pour être impliqués dans sa pathogénicité, ne sont pas présents chez *C. glabrata*. A l'inverse, certains facteurs de virulence de *C. glabrata* ne se retrouvent pas chez *C. albicans*, c'est le cas

notamment de la régulation par la chromatine des gènes codant des adhésines de la famille des EpA (epithelial adhesin). Néanmoins, leurs stratégies d'adaptation et d'opportunisme restent assez similaires et partagées. Effectivement, ces deux espèces montrent des similitudes notamment en termes de plasticité phénotypique avec notamment une large amplitude d'adhésines ou encore dans la structure de leurs populations³⁶⁸.

L'un des facteurs de virulence chez *C. glabrata* est sa capacité à pouvoir adhérer à différents types de cellules hôtes, aux microorganismes ainsi qu'aux surfaces abiotiques comme le matériel médical (cathéters centraux ou sondes urinaires)^{369,370}. Pour cela, *C. glabrata* fait appel à un large panel de protéines de la paroi cellulaire qui sont toutes ancrées par l'intermédiaire du glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les adhésines dont la plus grande famille est celle des EpA sont impliquées dans les interactions avec l'hôte ou encore dans la formation de biofilms^{371,372}. C'est Epa1 qui est la principale adhésine impliquée dans l'adhérence aux cellules de l'hôte telles que les cellules épithéliales, endothéliales et immunitaires³⁶⁹. Cette levure possède aussi d'autres protéines impliquées dans l'adhérence telles que Awp, Aed ou encore Pwp^{373,374}. D'autres sous-familles d'adhésines permettent aussi à *C. glabrata* d'adhérer sur *C. albicans* afin de pouvoir coloniser l'épithélium et former un biofilm. D'ailleurs, une étude montre que les gènes *EPA8*, *EPA19*, *AWP2* et *AWP7* codent des protéines de la paroi cellulaire de *C. glabrata* qui sont impliquées dans l'adhésion aux hyphes de *C. albicans*³⁷⁵. Enfin, elle exprime des protéines impliquées dans le remodelage de la paroi cellulaire comme celles de la famille des protéases aspartiques appelées yapsines, permettant d'échapper aux défenses immunitaires³⁵¹.

En parallèle, cette levure possède aussi une très vaste plasticité génomique. En effet, le nombre et la séquence des gènes, notamment ceux impliqués dans les adhésines, varient selon la souche observée³⁶⁹. Ainsi, selon les souches analysées, on retrouve jusqu'à 25 gènes codant des EpA^{370,376,377}.

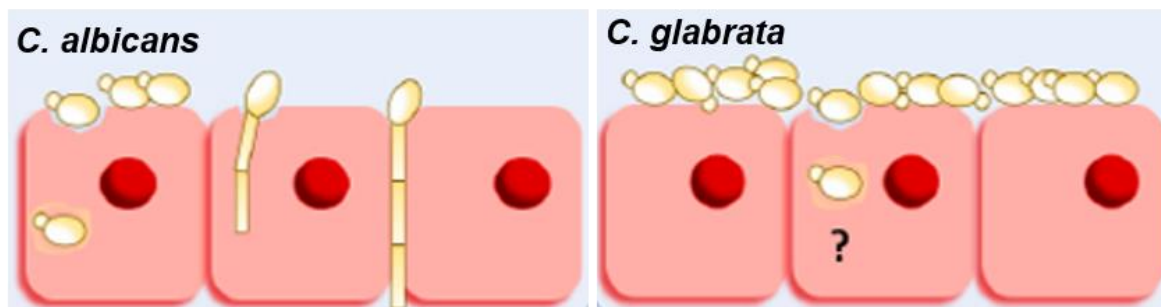


Figure 16 : Illustration des stratégies d'invasion de *C. albicans* et de *C. glabrata*. *C. albicans* présentent deux mécanismes distincts d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales : l'endocytose induite ou la pénétration active sous sa forme hyphale associée à une sécrétion d'enzymes lytiques (inter ou intra-cellulaire). Dans le cas de *C. glabrata*, seule l'endocytose induite est utilisée comme stratégie d'invasion des cellules de l'hôte même si les mécanismes restent encore à élucider, figure adaptée d'après Galocha M *et al.*, 2019³⁵¹.

4. Immunité de l'hôte face à *Candida*

La première ligne de défense contre les espèces à *Candida* est constituée par les cellules épithéliales des muqueuses qui représentent tout d'abord une barrière physique face aux microorganismes³⁷⁸.

Ces cellules possèdent des récepteurs de reconnaissance, leur permettant de réagir face à ces pathogènes opportunistes en produisant par exemple une variété de cytokines qui déclenchent le recrutement de diverses cellules phagocytaires. Ces récepteurs de reconnaissances se nomment « Pattern recognition receptors » (PRRs) et sont localisés à la surface des cellules épithéliales. Ils permettent d'interagir avec certaines structures microbiennes, nommées « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs), situées dans la paroi de *Candida*. Parmi ces PAMPs, nous retrouvons les mannanes, les β -1,3-glucanes ou encore la chitine³⁷⁹⁻³⁸¹.

Les cellules épithéliales sont également capables de distinguer les formes commensales des formes opportunistes de *Candida*. C'est notamment le cas avec *C. albicans* où la forme hyphale active une voie MAPK différente au sein de ces cellules épithéliales, entraînant l'activation du facteur de transcription c-Fos et de la phosphatase MKP1, amenant à la libération des médiateurs pro-inflammatoires comme des cytokines et des chimiokines³⁸². Ces médiateurs permettent de déclencher le recrutement de diverses cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les macrophages ou encore les cellules dendritiques³⁵¹. Il faut d'ailleurs

souligner qu'il existe un dialogue permanent entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires. Eyerich S *et al.*, ont montré que les lymphocytes T helper possèdent un effet protecteur contre l'infection en augmentant l'intégrité des cellules épithéliales *via* une production accrue d'IL-22 et de TNF α . Cette production d'IL-22 va à son tour induire la production de défensines par les cellules épithéliales, susceptibles d'éliminer ces pathogènes³⁸³.

Ces mêmes cellules épithéliales sont capables de sécréter des peptides antimicrobiens comme les β -défensines ou encore le LL-37 (un dérivé de la cathélicidine) dont il a été montré la production accrue par les cellules épithéliales en présence des neutrophiles et de *Candida*^{384–386}.

A. Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné permet à la fois une réponse précoce face aux infections par *Candida* mais il stimule aussi les réponses médiées par le système immunitaire adaptatif³⁸⁷. On retrouve alors les cellules phagocytaires du système immunitaire inné représentées par les cellules dendritiques, les macrophages ainsi que par les neutrophiles³⁵¹. Les phagocytes sont considérés comme le type cellulaire le plus efficace contre l'infection par *Candida*³⁸⁸. Néanmoins, ce sont les neutrophiles qui jouent un rôle déterminant dans la défense de l'hôte face à *Candida* au sein de la muqueuse mais également dans les candidoses disséminées^{388,389}. Les cytokines impliquées dans le recrutement de ces neutrophiles sont principalement l'IL-6, l'IL-8, le TNF α ainsi que l'IL-17^{390–393}. Il est important de souligner que l'ensemble des cellules phagocytaires possèdent des PRRs de surface, comprenant des intégrines, des lectines et des récepteurs TLRs, permettant la reconnaissance des pathogènes³⁹⁴. Ces PRRs ont une spécificité moléculaire ainsi la dectine-1, une lectine de type C, permet la reconnaissance des β -1,3-glucanes qui déclenche alors la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles^{395–397}. D'ailleurs, des études montrent le rôle important de cette lectine dans la défense de l'hôte contre les infections à *Candida* en participant au développement de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire Th1 et Th17 ou encore en étant impliquée dans la reconnaissance de *Candida* par les cellules myéloïdes^{398,399}. Des études expérimentales faisant intervenir des souris déficientes en dectine-1 montrent

justement une plus grande susceptibilité de ces souris aux infections par *Candida*^{115,400}. Dans cette même étude, il a été rapporté qu'une forme plus sévère de colite ulcéreuse était associée à un polymorphisme du gène de la dectine-1 (CLEC7A). Au total, cette étude conforte l'hypothèse qu'un défaut de l'immunité à contrôler la flore fongique intestinale peut amener à une colite expérimentale plus sévère probablement en lien avec un déficit en dectine-1¹¹⁵.

Les phagocytes ont la capacité d'endocyter les levures du genre *Candida*. Dans le cas précis des neutrophiles, il existe deux stratégies de lutte contre *Candida* : extracellulaire par le biais des NETs (Neutrophil extracellular traps) ou intracellulaire par le biais de l'endocytose³⁸⁸. D'un point de vue extracellulaire, les neutrophiles peuvent libérer leur ADN (acide désoxyribonucléique) dans l'espace générant un maillage de fibres chromatiniennes accompagné de peptides et d'enzymes antimicrobiens dérivés des granules comme la calprotectine (peptides antimicrobiens) ou encore la cathepsine G, l'élastase et la myéloperoxydase^{401,402}. D'un point de vue intracellulaire, ces phagocytes peuvent libérer des peptides antimicrobiens, des enzymes hydrolytiques ou encore des ROS. Pour cela, une fois le pathogène endocyté, il est transporté vers les phagolysosomes par assemblage avec des lysosomes^{388,403}. En parallèle, le rôle du facteur de croissance GM-CSF (Granulocyte-macrophages colony stimulating factor) a été également rapporté dans une étude *in vitro* où des neutrophiles humains stimulés par ce facteur a pour conséquence d'augmenter la phagocytose et la destruction intracellulaire de *C. albicans*⁴⁰⁴. Ces données ont été confirmées dans un modèle expérimental, incluant des rats présentant une neutropénie induite par cyclophosphamide, dans lequel le GM-CSF était capable de stimuler la clairance de *Candida* par les neutrophiles^{405,406}. Les neutrophiles sont donc extrêmement importants et essentiels puisqu'ils participent activement à la lutte contre *Candida*³⁸⁷.

Une étude expérimentale montre que des souris déficientes en macrophages éliminent significativement moins vite les levures *Candida* que des souris sauvages démontrant l'importance des macrophages dans la lutte contre *Candida*⁴⁰⁷. Cette lutte faisant intervenir les macrophages passe par la reconnaissance des levures sous forme de blastoconidie ou hyphale qui entraîne l'induction d'IL-23 et d'IL-6 amenant à l'induction d'une réponse Th17 déterminante pour l'élimination du

pathogène^{408,409}. Il a également été montré que *Candida* provoque une induction d'IL-1 β *via* l'inflammasome NLRP3 au sein de ces macrophages⁴⁰⁸. Une autre étude a montré que la dectine-1 serait également impliquée dans la production de l'IL-1 β ⁴¹⁰. D'ailleurs, il a été montré que des souris déficientes en dectine-1 spécifique des macrophages (macrophage-specific Dectin-1 deficient (Cre Tg)) avaient un défaut dans le contrôle de l'infection fongique à *Candida*. Dans cette même étude, il a également été rapporté que la modulation de l'expression de la dectine-1 par l'IL-13 passe par la voie de signalisation de PPAR γ ⁴¹¹.

Les cellules dendritiques sont capables d'internaliser, de dégrader et de présenter les antigènes fongiques aux cellules T auxiliaires naïves³⁵¹. Ces cellules se trouvent dans les tissus et à la surface des muqueuses afin de surveiller et d'agir contre les microorganismes pathogènes. Dans le cas de *Candida*, leur internalisation s'effectue *via* la reconnaissance par DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) ou encore le MR. Cette reconnaissance permet à ces cellules immunitaires de présenter *Candida* aux lymphocytes T CD4+ et d'induire leur différenciation^{388,412,413}. Cette différenciation dépendra alors de la morphologie de *Candida* puisque les cellules dendritiques sont capables de dissocier la forme hyphale de la forme blastoconidie. De fait, la forme hyphale permet une différenciation vers un profil Th2, alors qu'une forme blastoconidie induit une différenciation vers un profil Th1⁴¹⁴.

Les cellules natural killer (NK) semblent aussi participer aux défenses de l'hôte face aux CI. En effet, une déplétion en cellules NK chez des souris provoque une susceptibilité et une fragilité accrues face aux infections à *Candida*⁴¹⁵. Ces cellules semblent agir sur le pathogène directement grâce à des effets cytotoxiques ou indirectement par l'intermédiaire des cytokines^{416,417}.

Le système du complément joue aussi un rôle clé dans la défense de l'hôte contre *Candida* en facilitant la phagocytose par opsonisation et en générant diverses anaphylatoxines comme C3a, C4a ou encore C5a qui présentent des effets pléiotropes³⁸⁷. Les espèces de *Candida* peuvent activer ce dernier par l'intermédiaire de trois voies : la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines^{388,418,419}. L'une des conséquences de ces diverses voies est le dépôt du complément sur la

surface des pathogènes, suivie d'une C3-convertase permettant de cliver le complément C3 en une anaphylatoxine C3a et en un fragment C3b⁴²⁰. Ainsi, les levures opsonisées, par l'intermédiaire du récepteur CR3 et de la protéine C3b, permet d'être plus facilement phagocytées^{420,421}. D'ailleurs, une étude sur un modèle murin déficient pour le complément C3 révèle une susceptibilité accrue aux infections systémiques à *Candida*⁴²². Il en est de même pour la protéine C5a qui aurait un rôle déterminant dans la production accrue d'IL-6 et d'IL-1 β lors de l'interaction *Candida*-PBMC (peripheral blood mononuclear cell)⁴²³. Enfin, une autre étude a également démontré que des souris déficientes pour le complément C5 étaient plus sensibles à l'infection systémique par *C. albicans* avec notamment une charge fongique plus importante⁴²⁴.

B. Le système immunitaire adaptatif

a. Le système immunitaire adaptatif à réponse cellulaire

Les lymphocytes T sont également importants pour la défense de l'hôte face aux infections fongiques puisque les sujets présentant un déficit en cellules T montrent une susceptibilité accrue aux agents pathogènes fongiques^{425,426}. Des données expérimentales suggèrent que la réponse Th1 (pro-inflammatoire) améliore la survie chez des souris infectées par *Candida*, alors que la réponse Th2 (anti-inflammatoire) est associée à une situation délétère⁴²⁷⁻⁴²⁹. En effet, l'étude de Mencacci A *et al.*, faisant intervenir des anticorps spécifiques des récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-10, montre justement une amélioration significative de la résistance des souris aux infections à *Candida*⁴²⁸. En revanche, les réponses Th1 et Th17 semblent protectrices. Des données expérimentales, impliquant un modèle murin de candidose oro-pharyngée, démontrent que des souris présentant un défaut de réponse de type Th1 (IL-12p35(-/-)) ou de type Th17 (IL-23p19(-/-) ou IL17RA(-/-)) étaient plus susceptibles aux infections à *Candida*⁴³⁰. De plus, une étude montre que les patients atteints de candidose cutanéomuqueuse chronique affichent des réponses Th1 et Th17 délétères⁴³¹. En parallèle, Hernández-Santos N & Gaffen SL ont rapporté que la sécrétion d'IL-17, par les cellules Th17, permet à la fois d'induire la production et la sécrétion de défensine par les cellules épithéliales tout en permettant le recrutement des neutrophiles dans les muqueuses, ce qui améliorent l'issue de l'infection⁴³². Dans le cas des cytokines associées au profil pro-inflammatoire (Th1), ces dernières

auraient un rôle dans l'activation des cellules B, permettant également la sécrétion d'anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes fongiques³⁸⁷.

b. Le système immunitaire adaptatif à réponse humorale

La réponse humorale impliquant les lymphocytes B et les anticorps dirigés contre *Candida* revêt un intérêt particulier notamment en relation avec les tentatives de développement d'une vaccination protectrice. Ces recherches sont d'autant plus importantes que l'arsenal antifongique est limité et l'émergence de nouvelles souches/espèces résistantes aux antifongiques représentent une préoccupation majeure des autorités sanitaires. L'implication des lymphocytes B dans la protection contre les infections par *Candida* est assez controversée^{387,433-435}. Néanmoins, des études expérimentales montrent que l'administration chez des rats de cellules B provenant d'autres rats immunisés montrent une charge fongique diminuée par rapport aux contrôles et engendre une protection face aux candidoses vulvo-vaginales^{436,437}.

En parallèle, des anticorps, qui sont des molécules effectrices de la réponse immunitaire adaptative, peuvent limiter la charge fongique et favoriser l'élimination du pathogène en neutralisant certaines toxines, en prévenant l'adhésion de *Candida* aux cellules, en inhibant la formation du biofilm ou encore en favorisant l'opsonisation, la phagocytose et la cytotoxicité cellulaire^{387,438}. Il a été mis en évidence que les IgA participaient à l'inhibition de l'adhérence de *Candida* aux cellules épithéliales⁴³⁹. De même, une étude expérimentale met en évidence que des anticorps dirigés contre la mannoprotéine de 65 kDa (MP65) ou contre l'aspartylprotéinase sécrétoire (SAP-2) de *C. albicans*, inhibent l'adhérence de *C. albicans* sur l'épithélium vaginal de la rate tout en protégeant ces animaux de la candidose⁴⁴⁰. Enfin, des effets protecteurs pour des anticorps dirigés contre des motifs oligomannosidiques de la surface de la levure (AcM B6.1) ont été rapportés dans un modèle murin d'infection systémique à *Candida*⁴⁴¹. Ces mêmes motifs oligomannosidiques couplés à des protéines de *Candida* permettent de générer des anticorps protecteurs contre l'infection à *Candida*⁴⁴².

5. Mécanismes d'évasion de *Candida* face aux défenses de l'hôte

En réponse aux défenses de l'hôte, *Candida* dispose de plusieurs mécanismes d'échappement. *Candida* peut sécréter des protéines susceptibles d'influencer le pH environnemental permettant de contrecarrer les médiateurs de l'immunité. A titre d'exemple, *C. albicans* est capable d'utiliser des protéases dont la protéase fongique Pra1 (pH-regulated antigen 1), permettant de bloquer le complément et ainsi perturber l'immunité de l'hôte^{443,444}. Elles peuvent aussi mobiliser les nutriments issus de l'hôte comme source de carbone. Il s'agit notamment de certains acides aminés que *Candida* métabolise pour neutraliser un environnement acide comme celui qui règne dans les phagosomes de macrophages. Ce processus de neutralisation fait alors appel à un élément clé qui est le facteur de transcription Stp2⁴⁴⁵. Ces pathogènes pourraient aussi moduler la réponse des macrophages et l'orienter vers un profil M2 (anti-inflammatoire), au détriment du profil M1 (pro-inflammatoire)⁴⁴⁶. Elles peuvent aussi être à l'origine d'une pyroptose des macrophages, définie comme une mort cellulaire programmée médiée par l'inflammasome dépendant de la Caspase-1, associée à des dommages membranaires induits par les hyphes de *Candida*⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹. De plus, il a été récemment démontré que *C. albicans* est capable d'utiliser une toxine protéique dénommée candidalysine comme inducteur central de l'activation de la Caspase-1, de la maturation et de la sécrétion d'IL-1 β , induisant la mort de ces cellules phagocytaires^{450,451}.

C. albicans peut se présenter sous deux morphotypes (la blastoconidie et la forme hyphale). Ce dimorphisme lui permet de déjouer certains mécanismes de reconnaissance mis en œuvre par l'hôte. Ainsi, il a été démontré que l'expression des PRRs serait conditionnée par le morphotype de *C. albicans*. La forme hyphale stimulerait préférentiellement l'expression du TLR2 et de la dectine-2 alors que la forme blastoconidienne induirait l'expression de TLR4 et de la dectine-1. Dans cette même étude, l'expression des cytokines diffère selon la forme de la levure. En effet, la levure sous sa forme hyphale augmente l'expression d'IL-10 alors que sous sa forme blastoconidie, elle augmente l'expression de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-12⁴⁵². En parallèle, une autre étude sur des cellules dendritiques révèle que la forme hyphale serait capable d'entraîner une réponse anti-inflammatoire en induisant

préférentiellement la production d'IL-4 au détriment de l'IL-12⁴¹⁴. L'ensemble de ces données mettent l'accent sur le rôle du dimorphisme dans l'orientation des réponses de l'hôte.

D'autre part, il a été démontré que les β -1-3 glucanes peuvent être reconnus par la dectine-1 et permettre l'activation du complexe RIPK1/RIPK3 (receptor-interacting protein kinase) conduisant à la nécroptose, qui est une mort cellulaire programmée contribuant à la défense de l'hôte contre les infections à *Candida*³⁹⁵. Ces données sont en accord avec l'absence de β -1,3-glucane dans les cicatrices de bourgeonnement de *C. albicans* sous forme hyphale réduisant alors sa reconnaissance par la dectine-1⁴⁵³. En parallèle, une étude récente montre que sous conditions anoxiques, *C. albicans* est capable de masquer ces β -glucanes permettant de restreindre la reconnaissance des neutrophiles. En effet, les auteurs de cette étude ont démontré que sous conditions anoxiques et en présence de *C. albicans*, les neutrophiles libèrent bien plus de lactate. Ce lactate serait alors le déclencheur d'un remodelage pariétal de *C. albicans* se traduisant par une augmentation en mannane et en chitine qui masqueraient les β -glucanes. Par ce mécanisme, *C. albicans* peut alors diminuer la phagocytose, la production de ROS et la libération de NETs⁴⁵⁴. D'autres espèces du genre *Candida* sont également capables de masquer certains de leurs PAMPs dont les β -glucanes en présence de lactate, permettant de réduire leur reconnaissance par les PRRs correspondants⁴⁵⁵.

En parallèle, d'autres études portant sur *C. glabrata* dépourvue de forme hyphale ont permis de montrer que cette levure était capable d'échapper à l'activité phagocytaire des macrophages. Après endocytose, les cellules fongiques peuvent proliférer à l'intérieur des cellules en dépit du stress oxydatif. Cette prolifération conduit à la lyse cellulaire et empêche la maturation du phagosome en inhibant la formation du phagolysosome et la détoxification des espèces oxydantes⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁸.

L'ensemble de ces données met en évidence les différences de mécanismes d'échappement utilisés par *C. albicans* et *C. glabrata* ainsi que leur capacité d'adaptation à des environnements cellulaires hostiles (**Figure 17**).

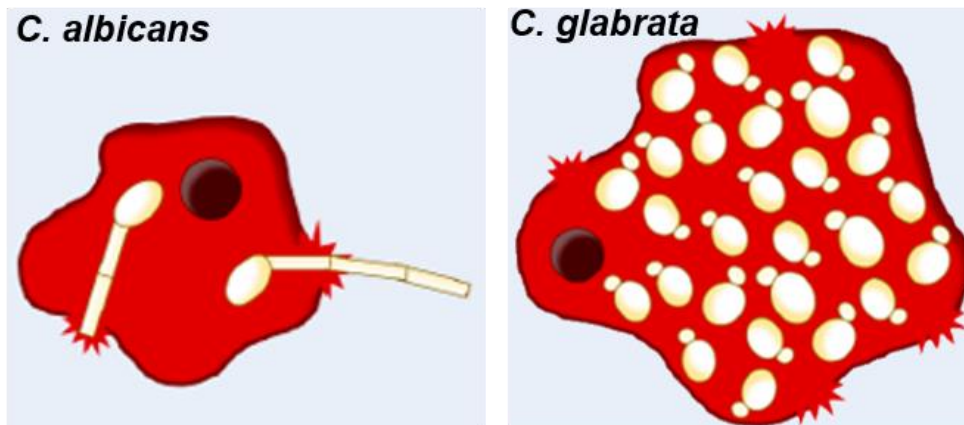


Figure 17 : Illustration des mécanismes d'échappement de *C. albicans* et *C. glabrata* face aux défenses de l'hôte. *C. albicans* possède une capacité d'évasion active vis-à-vis des macrophages de l'hôte notamment par sa forme hyphale ou encore grâce à la candidalysine. Par contre, *C. glabrata* s'adapte au stress en détoxifiant les espèces oxydatives et en inhibant la maturation des phagolysosomes, figure adaptée d'après Galocha M *et al.*, 2019³⁵¹.

6. La paroi fongique : composition et fonction

La paroi constitue le compartiment cellulaire externe de la cellule fongique. Cette paroi permet d'assurer la rigidité et de protéger le contenu cellulaire des variations de pH et des pressions osmotiques. Il s'agit d'une structure macromoléculaire complexe qui régit les interactions et les relations entre la cellule et son environnement. Cette paroi est une structure dynamique permettant à la cellule, *via* la modulation de sa composition, de s'adapter à son environnement^{12,459}. Au sein de cette structure, on identifie principalement des polysaccharides fibrillaires associés à des protéines et des lipides (**Figure 18**). Ainsi, au sein de la paroi de *Candida*, il a été rapporté une couche externe de manno-protéines pariétales liées au squelette glucidique et de phosphopeptidomannanes (PPM) associés à des protéines *via* des liaisons covalentes. Le squelette fibrillaire est quant à lui constitué de β -(1,3)-glucane, un polysaccharide présent dans la plupart des parois cellulaires fongiques, additionné de ramifications latérales formées par du β -(1,6)-glucane. Cet ensemble se rattache alors à la chitine qui forme un réseau de microfibrilles fixé de manière covalente aux β -(1,3)-glucanes. Le tout protégeant la cellule fongique contre les agressions mécaniques et chimiques^{381,460}. Certains de ces composants sont doués de propriétés immunogéniques capables de stimuler la réponse immunitaire de l'hôte^{12,459}.

De fait, ces composants de la paroi jouent un rôle important dans l'interaction hôte-pathogène. Ils constituent à ce titre les principaux PAMPs susceptibles de stimuler l'expression de PRRs spécifiques et d'activer les cellules de l'immunité innée³⁸¹. Ces divers composés de la paroi dont le mannane ou le β -glucane peuvent être relargués dans la circulation sanguine en tant que marqueur d'infection mais également comme immunomodulateurs potentiels pour les réponses immunes⁴⁵⁹.

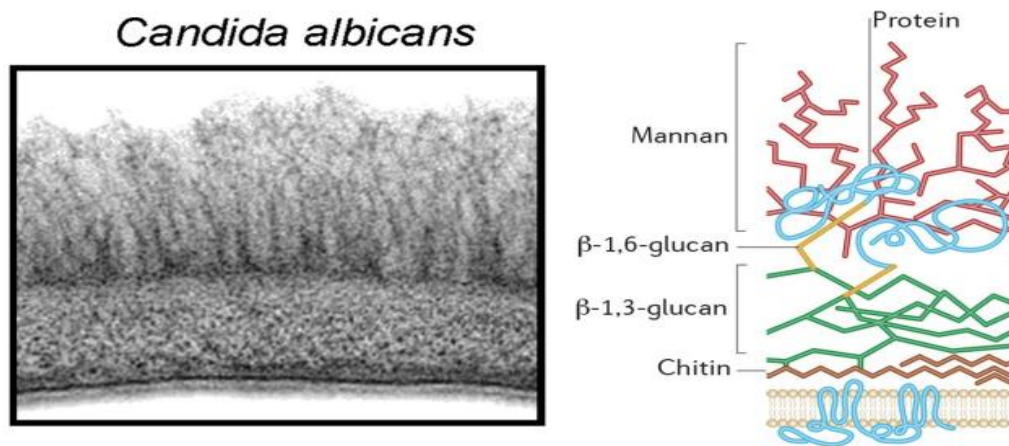


Figure 18 : Organisation structurale de la paroi cellulaire de *C. albicans*. Le panneau de gauche montre une section de la paroi cellulaire de *C. albicans* obtenue par microscopie électronique à transmission. Le dessin à droite représente les principaux composants de la paroi cellulaire, avec de l'extérieur vers l'intérieur : des protéines hautement mannosylées principalement attachées *via* des liaisons covalentes aux β -1,3 glucanes, ainsi qu'aux ramifications latérales constituées des β -1,6 glucanes, et enfin de la chitine, figure adaptée d'après Gow NAR, Latge JP, Munro CA, 2017³⁸¹.

A. Le mannane

Les glycoprotéines représentent 40% du poids sec de la paroi fongique chez les levures. La quasi-totalité de ces protéines sont associées à des carbohydrates donnant naissance à des glycoprotéines O- ou N- glycosylées⁴⁵⁹. Dans le cas de *Candida*, cette couche externe est majoritairement constituée de mannoprotéines pariétales et de PPM.

Diverses mannoprotéines sont retrouvées à la surface de *Candida*. Elles sont reliées au squelette glucidique par des liaisons non covalentes ou par des liaisons covalentes. Les protéines pariétales peuvent être glycosylées ou pas et pour certaines d'entre elles, être reliées aux β -1,3 glucanes ou aux β -1,6 glucanes. Le mannane quant à lui est associé à la paroi par l'intermédiaire de liaisons non

covalentes. Il s'agit d'un polymère constitué de mannose, qui est N- ou O- glycosylé, relié à un squelette peptidique. Dans la fraction N-glycosylée du mannane, les résidus de mannose sont liés à la protéine *via* une asparagine alors que dans le cas de la fraction O-glycosylée, ils sont associés aux protéines *via* une sérine ou une thréonine¹². Chez *C. albicans*, ce mannane est composé d'un core de résidus α -1,6 mannosides ainsi que de chaînes latérales contenant des résidus α -1,2 ; α -1,3 et β -1,2 mannosides⁴⁶¹.

Les résidus de β -1,2 oligomannosides (β -Man) se retrouvent également sur des lipides portant le nom de phospholipomannanes (PLM), qui sont des structures glycolipidiques composées d'une chaîne lipidique reliée, par des ponts phosphodiesters, à une partie glucosidique¹². Il est important de souligner que ces résidus β -Man sont essentiellement retrouvés au sein des espèces les plus pathogènes de *Candida* comme *C. albicans* ou *C. glabrata* et sont représentés comme des facteurs de virulence^{114,462}. Ces derniers sont synthétisés par des enzymes nommées β -mannosyltransférases. Plus précisément, ce sont les enzymes Bmt1 à 4 qui permettent la β -1,2-mannosylation du PPM alors que Bmt5 et 6 sont responsables de la β -1,2-mannosylation du PLM^{463,464}. Des études japonaises ont montré que la composition du mannane de *C. glabrata* serait plus proche de celle retrouvée chez *S. cerevisiae* que celle retrouvée chez *C. albicans* à une seule exception, *C. glabrata* est capable de synthétiser des résidus β -Man^{371,465}.

Les protéines retrouvées au sein de cet édifice possèdent des propriétés d'adhésines, un rôle dans la protection contre les agents chimiques et les actions mécaniques et servent également dans la transmission des signaux intracellulaires et le remodelage de la paroi⁴⁶⁶.

B. Le β -glucane

Le squelette fibrillaire est majoritairement constitué de β -glucane, un polysaccharide présent dans la plupart des parois fongiques à l'exception des mucorales. Il s'agit du composant le plus important de la paroi et représente 50% à 60% du poids sec de celle-ci. Plus précisément, ils se retrouvent principalement sous la forme de β -1,3 glucane, additionné de ramifications latérales formées par du β -1,6

glucane⁴⁵⁹. Leur biosynthèse est sous le contrôle d'un complexe enzymatique localisé au niveau membranaire nommé glucane synthase. Ces enzymes sont codées par plusieurs gènes (*FKS1* ; *FKS2*) selon les espèces *Candida*^{381,467,468}.

C. La chitine

Il s'agit d'un polysaccharide naturel de β -(1,4)-N-acétyl-D-glucosamine identifié pour la première fois en 1884 (**Figure 19**). Ce polysaccharide est le 2nd biopolymère le plus abondant après la cellulose et se trouve dans de nombreux organismes vivants. Parmi ces organismes, nous retrouvons les champignons où la chitine est le composant le plus ancestral de la paroi^{460,469,470}. Cette chitine représente alors entre 2 et 10% du poids sec de la paroi fongique⁴⁵⁹. Effectivement, dans le cas de *C. albicans*, la chitine peut être trois à quatre fois plus abondante dans la forme hyphale que dans la forme blastoconidie⁴⁷¹. Sa biosynthèse est sous le contrôle de plusieurs familles de chitine synthases localisées principalement au niveau membranaire. Cette biosynthèse nécessite de l'UDP-N-acétylglucosamine comme substrat avant d'être extrudée dans la paroi^{381,472}. Les travaux de Munro CA *et al.*, ont montré que dans le cas de *C. albicans*, seul le gène *CHS1* (codant pour la chitine synthase) semble essentiel pour *C. albicans* puisqu'il est impliqué dans la formation du septum, l'intégrité cellulaire et la viabilité de la levure⁴⁷³.

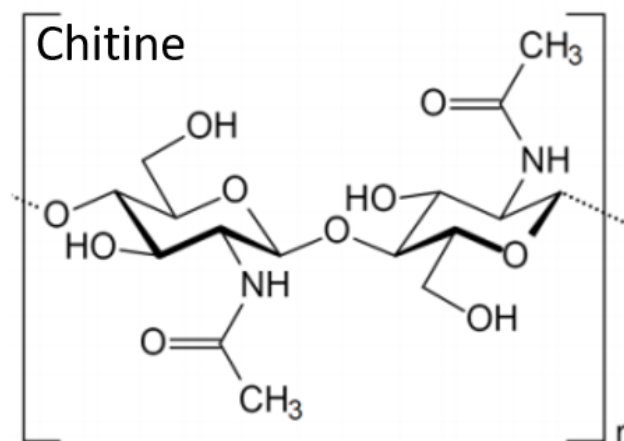


Figure 19 : Structure chimique de la chitine. Figure adaptée d'après Younes I & Rinaudo M, 2015⁴⁷⁰.

7. Développement des vaccins et d'immunothérapies à partir des composants de la paroi fongique

Actuellement, il existe de nombreux vaccins contre diverses maladies virales ou bactériennes mortelles mais il n'existe pas encore de vaccin efficace pour la prévention des infections fongiques. Comme cela avait été mentionné précédemment, les polysaccharides de paroi (mannane, β -glucane et chitine) sont majoritairement immunogéniques et hautement conservés dans le règne des champignons. A ce titre, ils constituent des cibles privilégiées pour le développement de nouvelles stratégies vaccinales^{381,474-477}.

Parmi ces immunisations, certaines se sont révélées efficaces dans des modèles murins de mycoses systémiques. Il s'agit notamment de vaccins réalisés à partir de protéines pariétales recombinantes telles que Als1p ou Als3p^{478,479}, la protéine Hyr1 (Hyphally regulated 1, une mannoprotéine à ancrage GPI)⁴⁸⁰, la protéine Sap2⁴⁸¹, les fractions de β -1,2 mannosides du mannane⁴⁴¹ ou encore le mannane entier⁴⁸².

Des vaccins basés sur l'utilisation des β -glucanes ont également vu le jour. Ces études mettent en évidence les propriétés antifongiques directes des anticorps anti- β -1,3-glucanes sur la viabilité de *C. albicans*. Dans les modèles murins de candidose vaginale, la production de ces anticorps au niveau sérique et muqueux est associée à un effet protecteur contre l'infection à *Candida*^{483,484}. Les travaux de Huang H *et al.*, ont montré secondairement que l'immunisation par les β -1,3-glucanes induirait une réponse pro-inflammatoire de type Th1 et Th17 associée à une forte réponse anticorps d'isotype G⁴⁸⁵. Il faut également souligner que la taille des chaînes de β -glucane joue un rôle clé dans l'immunogénicité du vaccin⁴⁸⁶. L'ensemble de ces données fournissent un aperçu sur les propriétés immunomodulatrices des anticorps anti-polysaccharides pariétaux et leurs utilisation potentiel pour le développement de nouveau vaccin.

Le chitosan, un autre dérivé de la paroi fongique a été récemment utilisé avec succès dans la préparation d'un adjuvant vaccinal. En effet, une étude a démontré la valeur ajoutée du chitosan dans la production d'anticorps sériques lors

d'immunisation par le virus grippal atténué⁴⁸⁷. Une seconde étude sur un modèle murin a démontré l'efficacité accrue d'un vaccin contre *H. pylori* lorsque le chitosan a été utilisé comme adjuvant à la place de la toxine cholérique⁴⁸⁸. L'utilisation des polysaccharides fongiques comme cible ou adjuvant vaccinal apparaît donc prometteuse d'autant plus que ces polymères présentent une biocompatibilité, une faible toxicité et des effets immunomodulateurs les rendant d'excellents adjuvants dans le développement de nano-vaccins⁴⁸⁹.

D'autre part, le développement de l'utilisation des immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (IVIg) a considérablement modifiée la prise en charge de certaines maladies inflammatoires. Les IVIg sont composés de plusieurs lots d'IgG obtenues de donneurs sains puis poolées. Il s'agit d'IgG polyvalentes reconnaissant un large panel d'épitopes y compris des anticorps anti-polysaccharides bactériens ou fongiques. L'utilisation de ces IgG polyvalentes dans un modèle murin de colite chimio-induite nous a permis récemment de montrer leur capacité à réduire la sévérité de l'inflammation intestinale⁴⁹⁰.

Objectifs de la thèse

Depuis quelques années, notre équipe étudie le rôle des composants pariétaux de *Candida* dans la régulation de l'inflammation intestinale. Les recherches portent également sur les mécanismes qui régulent les processus inflammatoires et le rôle particulier de certains microorganismes du microbiote intestinal dans le maintien ou l'exacerbation de l'inflammation intestinale. Parmi les composants pariétaux, nous avons évalué l'effet de la chitine fongique dans un modèle murin de colite DSS-induite en présence de *C. glabrata*. Nos travaux précédents ont permis de montrer que la chitine, administrée pendant 5 jours en traitement curatif par voie orale, était capable d'atténuer l'inflammation intestinale et de réduire la prolifération de *C. glabrata*. Par ailleurs, les souris ayant reçu de la chitine présentaient une biodiversité du microbiote intestinal cultivable proche de celui retrouvé chez les souris contrôles (sans inflammation). Ce traitement par chitine avait aussi pour conséquence de modifier le microbiote intestinal murin en faveur des bactéries anaérobies (*B. thetaiotaomicron* et *L. johnsonii*). Celles-ci participent au même titre que la chitine à l'atténuation de l'inflammation intestinale et à l'élimination de *C. glabrata*¹⁵. Par la suite, nous avons pu démontrer que ces bactéries possèdent des propriétés antifongiques notamment *via* des enzymes hydrolytiques dirigées contre la paroi fongique permettant alors l'inhibition de la croissance fongique. L'administration orale de ces deux bactéries (*B. thetaiotaomicron* et *L. johnsonii*) obtenues sur des milieux de culture spécifiques (MRS et BBE, respectivement) a permis de réduire le développement de l'inflammation intestinale, et de réduire la prolifération des populations pathobiontes d'*E. coli*, d'*E. faecalis* et de *C. glabrata* dans un modèle murin de colite DSS-induite¹⁹. Néanmoins, les mécanismes qui régissent cette interaction *Candida*-bactéries ainsi que les métabolites mis en jeu restent encore à élucider.

La première partie de ce projet de thèse consiste donc à détecter et caractériser les métabolites issus de l'interaction établie entre *B. thetaiotaomicron*, *L. johnsonii* et des cellules épithéliales intestinales coliques issues de souris. Nous avons alors pu mettre en évidence des variations significatives dans la teneur en AG après exposition aux deux bactéries. Il s'agit principalement de l'acide oléique et de

l'acide palmitique. Les propriétés antifongiques directes de ces AG sur *C. albicans* et *C. glabrata* en termes de viabilité, d'adhérence, de croissance fongique ou encore de production de biofilm ont été évaluées. A la suite de ces résultats, nous avons développé un modèle cellulaire en vue d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de ces AG. Dans un modèle murin de colite DSS-induite, nous avons également évalué les effets de ces AG sur l'inflammation intestinale, sur la biodiversité du microbiote cultivable et sur la colonisation par *C. glabrata*. Cette partie de la thèse a fait l'objet d'un article accepté pour publication dans *Microorganisms* et dont les résultats sont présentés dans la partie 1.

Le second volet de cette thèse, concerne l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de la chitine, un composant majeur de la paroi fongique. Nos travaux précédents ont pu mettre en évidence les effets bénéfiques de l'administration orale de la chitine à des souris présentant une colite chimio-induite¹⁵. Ces données permettent d'améliorer nos connaissances sur le rôle de la chitine dans la modulation de l'inflammation intestinale, sur les variations du microbiote intestinal et sur la colonisation fongique. Les mécanismes par lesquels la chitine exerce ses effets protecteurs sont partiellement connus, il reste notamment à caractériser les cellules et les médiateurs immunologiques impliqués dans cette protection. Cette seconde partie de la thèse explore les effets de la chitine administrée de manière curative par voie intra-péritonéale à des souris *C57BL/6* en vue d'évaluer ses propriétés immunomodulatrices, ses effets sur la colonisation par *Candida* et son impact sur les variations du microbiote intestinal cultivable. Une seconde série d'investigations a consisté en l'évaluation des effets de la chitine administrée de manière préventive par voie sous-cutanée à des souris *C57BL/6* ayant une colite chimio-induite. L'objectif étant de déterminer si ces mêmes souris prétraitées à la chitine seraient protégées contre une colonisation digestive par *C. glabrata*, et si cette protection fait intervenir des anticorps anti-chitine.

Matériels et méthodes

1. Souches fongiques et conditions de culture

Les souches fongiques utilisées sont *C. glabrata* sauvage (ATCC ; Cg), *C. albicans* SC5314 (Ca) et *C. albicans* CEC749 Gluc (souche bioluminescente ; Enjalbert B *et al.*, 2009⁴⁹¹). La culture fongique est réalisée dans le milieu YPD liquide (extrait de levure 1%, peptone 1%, dextrose 1%) ou le milieu Sabouraud (Sabouraud Dextrose Broth ; S3306-500G ; Sigma-Aldrich), sous agitation rotative pendant 18 heures à 37°C. La culture obtenue est alors centrifugée à 2500 rpm pendant 5 minutes et lavée à deux reprises dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline ; Gibco ; 14200-067).

2. Lignées cellulaires Caco-2 et THP-1

Deux types de lignées cellulaires sont utilisées :

Les cellules Caco-2, une lignée cellulaire épithéliale humaine d'origine intestinale, isolée à partir d'un adénocarcinome colique. La culture est réalisée dans le milieu Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) additionné de 20% de sérum de veau foetal (SVF) et de 1% d'antibiotique (penicillin Streptomycin ; 15140-122 100mL ; Gibco).

Les cellules THP-1 (Human macrophage-like cell line), une lignée cellulaire humaine de type macrophage. La culture est réalisée dans le milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) additionné de 10% de SVF et de 1% d'antibiotique. L'utilisation du Phorbol (Phorbol-12-myristate13-acetate ; Sigma ; P1585) à une concentration de 200 ng/mL permet de différencier les cellules en macrophages.

3. Extraction et purification des ARNm

Les ARNm (acide ribonucléique) sont extraits d'après le protocole NucleoSpin RNA® (Macherey-Nagel). Brièvement, ce protocole prévoit que chaque échantillon conservé est lysé directement dans un tube eppendorf grâce à du tampon RA1. Le lysat est incorporé dans une colonne possédant une membrane de silice. Le contenu est alors transvasé et de l'éthanol à 70% est ajouté. La colonne est insérée dans un nouveau tube avec ajout de Membrane Desalting Buffer (MDB). La DNase est

ajoutée pendant 15 minutes, permettant la digestion de l'ADN. Puis des étapes de lavage sont réalisées en présence des tampons RAW2 et RA3. Enfin, l'ARNm est élué avec de l'H₂O RNase Free et la quantité d'ARNm (en µg/µL) de chaque échantillon est mesurée par l'intermédiaire d'un spectrophotomètre (Nanodrop 1000, Thermo scientific).

4. Synthèse d'ADN complémentaire par RT-PCR

La synthèse d'ADNc (Acide désoxyribonucléique complémentaire) est réalisée d'après le protocole de High capacity DNAc Reverse Transcription (RT), Master Mix (Applied Biosystems). Pour ce faire, le mix contient 2 µL de 10X RT buffer ; 2 µL de 10X RT Random Primers ; 0,8 µL de 25X dNTP Mix ; 1 µL de reverse transcriptase et 4.2 µL d'H₂O RNase Free, afin d'obtenir un volume total de 10 µL/échantillon. A ce mix est ajouté l'ARNm pour chaque échantillon à une quantité de 1000 ng. L'ensemble constitue un volume final de 25 µL et est déposé sur une plaque. Celle-ci est ensuite placée dans un appareil permettant l'obtention d'ADNc par l'intermédiaire de plusieurs cycles (10 minutes à 25°C ; 2 heures à 37°C ; et 5 minutes à 85°C). Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C. Pour vérifier l'absence d'ADN, un contrôle négatif est réalisé.

5. q-PCR

La PCR (Polymerase chain reaction) a été réalisée sur une microplaque de 96 puits (MicroAmp Fast Optical 96 well, réf : 4346906, Applied Biosystems) spécifique à l'utilisation de l'appareil StepOne. Un mix est réalisé avec par échantillon 0.25 µL d'amorces sens et anti-sens (**Tableau 1 en annexe**) ; 6 µL de Sybr Green (Applied Biosystems) ; 3 µL d'H₂O RNase Free et 2,5 µL d'ADNc (dilué au 1/5^{ème}), soit un volume total de 12 µL/puits. Une fois les dépôts réalisés, la plaque est insérée dans l'appareil StepOne et le programme est lancé (programme de l'appareil : 95°C pendant 20 secondes ; 40 cycles à 95°C pendant 3 secondes et 60°C pendant 30 secondes ; 95° pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minutes et 95°C pendant 15 secondes).

6. Étude des propriétés anti-inflammatoires des acides gras

A. Détection des métabolites bactériens (*ex-vivo*) : GC-MS

Des côlons de souris *C57BL/6* sont prélevés et un lavage au PBS est réalisé, suivi d'un bain au RPMI additionné de 10% de SVF et de 1% d'antibiotique (pénicilline G et streptomycine à 0,1 mg/mL). Une co-incubation est réalisée pendant 12h avec différentes conditions : côlon ; côlon + *C. glabrata* (10^7 cellules) ; côlon + *B. thetaiotaomicron* + *L. johnsonii* (*BtLj*; 10^7 cellules) ; côlon + *BtLj* + *C. glabrata* (10^7 cellules). Après incubation, les côlons ainsi que 1 mL de chaque surnageant sont récupérés. Pour chaque échantillon, une extraction *via* du $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2 :1) est réalisée pour les surnageants. Puis, une centrifugation est réalisée (1500 rpm ; 10 minutes ; 4°C) et la phase organique de chloroforme est récupérée, puis évaporée au Speedvac afin de concentrer l'échantillon. Pour faciliter l'identification, les AGs (FA) ont été dérivés par transestérification pour donner des esters méthyliques d'acide gras (EMAG ; FAME). Ainsi, 100 μL de chloroforme est ajouté dans le tube contenant l'échantillon sec. Puis, 1,5 mL de MeOH/HCl (0.5N) est ajouté, suivi d'un bain sec à 80°C pendant 18h. Une fois les tubes refroidis, 3 extractions successives sont réalisées *via* de l'heptane avant l'analyse par GC/MS (ThermoFisher). Suite à cette analyse, deux métabolites ont été principalement mis en évidence : l'acide oléique et l'acide palmitique.

B. Mise au point d'un modèle Caco-2 mimant une barrière épithéliale intestinale traitée au DSS

a. MTT Assay

Les cellules Caco-2 sont traitées à différentes concentrations de DSS (dextran sulfate de sodium ; 0,5% ; 1% et 1,5%) pendant 24h à 37°C sous 5% de CO_2 . Ce traitement permet de mimer partiellement l'effet du DSS sur la cellule épithéliale colique dans le modèle murin. 10^5 cellules/puits sont insérées dans une plaque 96 puits (Microplaque ELISA, 96 puits, PS, Fd F/st, transparent ; Greiner Bio-one ; 655101). Après incubation, 10 μL de réactif MTT (MTT cellular viability B ; KF03001B ; Bocket) est ajouté pendant 4 heures. 100 μL de détergeant MTT est ajouté afin de solubiliser les cristaux pendant 1 nuit à 37°C. Une lecture est alors réalisée à 570 nm au spectrophotomètre. En parallèle, un blanc est réalisé *via* l'ajout de milieu seul et un contrôle négatif est effectué en présence de DMSO à 20 % (Dimethyl sulfoxide, 276855-100ML, Sigma-Aldrich).

b. Microscopie optique

Les cellules Caco-2 sont également traitées à diverses concentrations de DSS pendant 24h à 37°C sous CO₂. 10⁵ cellules/puits sont insérées dans une plaque 12 puits (Tissue culture test plate 12 ; TPP ; 92012) et une observation microscopique de chaque condition est effectuée après 2h et 24h d'incubation (en présence ou non de DSS) au microscope à contraste de phase (Leica ; DMi8-LASX). De même, un contrôle négatif est effectué en présence de DMSO à 20 %.

c. Expression des gènes de certaines cytokines pro-inflammatoires des cellules Caco-2 traitées avec diverses concentrations en DSS

Les cellules Caco-2 sont également traitées à diverses concentrations de DSS pendant 24h à 37°C sous CO₂. Après deux lavages au PBS, les cellules sont récupérées dans du tampon RA1 afin de réaliser une extraction d'ARNm, une RT-PCR et une q-PCR comme indiqué dans les sections 3, 4 et 5 (les séquences des amorces sont listées dans le **tableau 1 en annexe**).

d. Expression des gènes de certaines cytokines pro-inflammatoires des cellules Caco-2 traitées à 1.5% de DSS et ce, en présence ou non des acides gras

Une suspension de 10⁶ cellules Caco-2 est mise en présence de DMEM contenant 1,5% de DSS pendant 24h afin d'induire des lésions épithéliales ainsi que l'augmentation de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-8 et CCL2). En parallèle, l'acide oléique (OA, Oleic acid ; TCI ; O0180 ; 112-80-1) et l'acide palmitique (PA, Palmitic acid ; TCI ; P0002-25G ; 57-10-3) sont ajoutés à diverses concentrations allant de 5 μ g à 50 μ g/mL. Un contrôle contenant simplement des cellules Caco-2 est réalisé afin de standardiser et comparer les autres conditions par rapport à celui-ci. Par la suite, deux lavages au PBS sont réalisés avant de récupérer les cellules dans du tampon RA1 pour effectuer une extraction d'ARNm suivie d'une RT-PCR puis d'une q-PCR comme indiqué dans les sections 3, 4, et 5 (les séquences des amorces sont listées dans le tableau 1 en annexe).

e. Migration des macrophages à travers une barrière épithéliale Caco-2 traitée à diverses concentrations en DSS

Une suspension de 10^6 cellules Caco-2 est déposée dans des inserts (HTS Transwell – 96 well ; Corning ; 3387) en présence de DMEM pendant 24h (**Figure 20 étape 1**). Diverses concentrations en DSS (0,5% ; 1% et 1,5%) sont ajoutées pendant 24h ou 48h (**Figure 20 étape 2**). En parallèle, des cellules THP-1 sont différenciées en macrophages *via* du phorbol à 200 ng/mL pendant 72h puis un lavage est réalisé et les cellules sont maintenues dans du RPMI pendant 24h. Les macrophages sont ensuite décollés *via* de la trypsine et sont marqués à la calcéine (eBioscience™ Calcein M Viability Dye ; 65-0853-78 ; Invitrogen) avant d'être déposés à 10^5 macrophages/ insert. Les *C. albicans* sont quant à eux déposés à 10^5 cellules/puits dans une plaque noire 96 puits et dans laquelle les inserts, contenant les cellules Caco-2 et les macrophages, sont déposés par la suite (**Figure 20 étape 3**). Après une nuit, les inserts contenant les *C. albicans* et les macrophages qui ont migrés à travers la barrière épithéliale de cellules Caco-2 sont retirés. Une lecture de la plaque noire est réalisée au FLUOstar Omega (BMG Labtech) (**Figure 20 étape 4**). Un contrôle (CTL) contenant les macrophages + Caco-2 + *C. albicans* permet de mettre en évidence une migration active des macrophages en présence d'une barrière épithéliale fonctionnelle ; un contrôle négatif (CTL -) contenant les macrophages + Caco-2 mais sans *C. albicans* permet de mettre en évidence la migration passive des macrophages à travers une barrière épithéliale fonctionnelle ; un contrôle positif (CTL +) contenant les macrophages + *C. albicans* mais sans cellules Caco-2 permet de mettre en évidence une migration active à travers une barrière épithéliale défectueuse.

f. Migration des macrophages à travers une barrière épithéliale Caco-2 traitée 24h avec 1.5% de DSS et les acides gras

Une migration est réalisée dans les mêmes conditions que celles du point 6.B.e. Cependant, ici les Caco-2 subissent à la fois un traitement avec 1,5% de DSS pendant 24h mais aussi un traitement avec les acides gras oléique et/ou palmitique à une concentration de 25 µg/mL.

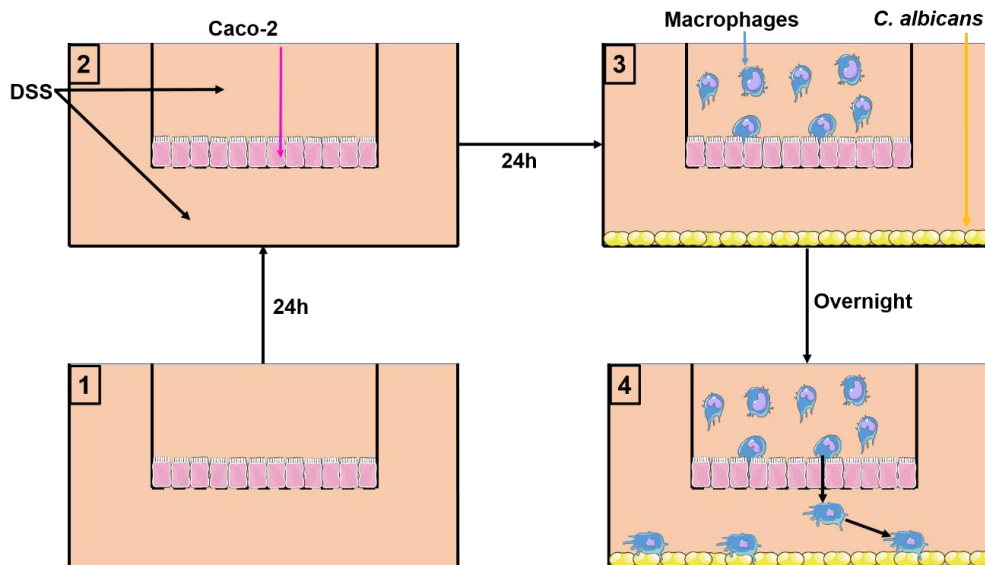


Figure 20 : Schéma de la migration des macrophages à travers une barrière épithéliale Caco-2 traitée au DSS vers *C. albicans*. 1. Ajout des cellules Caco-2 dans l'insert pendant 24h. 2. Ajout du DSS à diverses concentrations pendant 24h ou 48h. 3. Ajout des macrophages marqués à la calceine dans les inserts contenant des cellules Caco-2 et ajout, en parallèle, des *C. albicans* dans le puit sous-jacent pendant toute la nuit. 4. Lavage et lecture de la fluorescence émise par FLUOstar Omega (BMG Labtech).

C. Expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires et de certains récepteurs des macrophages dérivés de la lignée cellulaire THP-1

Une suspension de 10^6 cellules THP-1 est différenciée en macrophages *via* l'ajout de phorbol à 200 ng/mL pendant 72h. Puis, les macrophages sont incubés pendant 24h dans du milieu RPMI. Les macrophages sont incubés pendant 6h avec du LPS à une concentration de 250 ng/mL (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111 : B4 ; Sigma ; L2630-25MG) et les AG à une concentration de 25 µg/mL. Un contrôle contenant simplement des macrophages est réalisé afin de standardiser et comparer les autres conditions par rapport à celui-ci. Par la suite, les cellules sont récupérées dans du tampon RA1 pour effectuer une extraction d'ARNm suivie d'une RT-PCR et d'une q-PCR comme indiqué dans les sections 3, 4, et 5 (les séquences des amorces sont listées dans le **tableau 1 en annexe**).

D. ELISA des cytokines pro-inflammatoires des macrophages

Une suspension de 10^6 cellules THP-1 est différenciée en macrophages *via* l'ajout de phorbol à 200 ng/mL pendant 72h. Les macrophages sont incubés pendant 24h dans du milieu RPMI. Ces derniers sont incubés pendant 16h avec du LPS à une concentration de 250 ng/ml et les AG à une concentration de 25 µg/mL. Après 16h, les surnageants sont récupérés. Les taux de TNFα (Invitrogen™ Kit ELISA TNF

alpha humain Novex™ ; réf : 10737663 ; Fisher scientific), d'IL-6 (ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6 ; 430504 ; BioLegend) et d'IL-1β (ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-1β ; 437004 ; BioLegend) contenus dans le surnageant des cellules ont été mesurés par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) selon la méthode expérimentale fournie par le fabricant du réactif. Les concentrations en TNFα, IL-6 ou IL-1β ont ensuite été déterminées sur la base des courbes standard fournies par les kits et les résultats ont été exprimés en « Fold Release » en normalisant selon le contrôle positif (macrophage + LPS).

7. Étude des propriétés antifongiques des acides gras

A. Adhérence de *C. glabrata* ATCC 2001 sur une lignée cellulaire Caco-2

L'effet direct de l'acide oléique et de l'acide palmitique sur la capacité d'adhérence de *C. glabrata* aux cellules Caco-2 a été étudié. Les cellules Caco-2 sontensemencées à $5 \cdot 10^5$ cellules dans un volume de 150 μL au sein d'une plaque noire 96-puits (96-well Flat bottom Chimney style non-binding microplates ; Greiner bio-one ; 655900). La plaque est incubée à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Une fois les cellules Caco-2 confluentes, *C. glabrata* est ajouté en présence des AG à une concentration de 25 μg/mL. Pour ce faire, les *C. glabrata* sont préalablement marqués à la calcéine (Calcein AM ; Invitrogen ; 65-0853-78) avant d'être incubés à 10^5 cellules dans un volume final de 150 μL. Après 2h d'incubation et un lavage au PBS, la fluorescence émise est mesurée par FLUOstar Omega (BMG Labtech).

B. Viabilité de *C. albicans* CEC749 *Gluc* en présence des acides gras

C. albicans CEC749 *Gluc* est déposé dans une plaque de 96 puits noire (96-well Flat bottom Chimney style non-binding microplates ; Greiner bio-one ; 655900) à une quantité de 10^6 cellules/puits. Puis, l'acide oléique et/ou palmitique sont ajoutés à diverses concentrations : 10, 25, 50, 100 et 250 μg/mL. Enfin, de la coelenterazine est ajoutée à une concentration de 2 μM (Coelenterazine 1mg ; Cat no C238 ; ABP Biosciences). Après 0h, 1h et 2h d'incubation, la bioluminescence est mesurée par FLUOstar Omega (BMG Labtech).

C. Viabilité de *C. glabrata* en présence des acides gras

Une viabilité est réalisée sur *C. glabrata* à une quantité de 10^5 cellules dans 1mL de volume final en présence ou non des AG à 25 ou 250 $\mu\text{g/mL}$. Une cinétique est réalisée *via* une co-incubation à différents temps (0h, 1h et 2h) à 37°C. Des dilutions sont réalisées afin d'obtenir un dépôt de 100 levures par boîte de Pétri contenant du milieu Sabouraud. La lecture des boîtes de Pétri est réalisée après 24h de croissance à 37°C. En parallèle, une incubation des levures en présence de Caspofungine (50mg ; OHRE Pharma) à 100 $\mu\text{g/mL}$ sert de contrôle négatif.

D. Evolution du biofilm de *Candida spp* en présence des acides gras

C. albicans SC5314 ou *C. glabrata* ATCC 2001 sont déposés dans une plaque de 96 puits (Microplaque ELISA, 96 puits, PS, Fd F/st, transparent ; Greiner Bio-one ; 655101) à une D_0 de 0,5 (si $DO : 1 = 10^7$ *Candida* ; lecture à 620nm) dans un volume final de 200 μL de RPMI. En parallèle, les acides oléique et palmitique sont ajoutés à une concentration de 25 $\mu\text{g/mL}$. Après 1h30 d'incubation à 37°C, un lavage au PBS est effectué puis 200 μL de RPMI contenant les AG est ajouté de nouveau. Le biofilm est mesuré alors à 0h ; 8h et 24h d'incubation. Un lavage au PBS est effectué et la plaque est mise à sécher 2h à 37°C avant d'ajouter 110 μL de crystal violet (0,4% ; Fluka ; 61135), pendant 45 minutes, permettant de mettre en évidence le biofilm. Puis, 4 lavages avec 300 μL d'eau sont réalisés avant d'ajouter 200 μL d'éthanol. Après 15 minutes, 100 μL est récupéré dans une nouvelle plaque afin de réaliser la lecture du biofilm à 550 nm. Un contrôle contenant la caspofungine à 100 $\mu\text{g/mL}$ est réalisé.

8. Expérimentations animales réalisées au cours de l'étude

A. Animaux

Les animaux utilisés sont des souris *C57BL/6* femelles sauvages âgées de 3 à 4 mois, certifiées indemnes d'infection et provenant des laboratoires Charles River, France. Les souris sont hébergées dans l'animalerie conventionnelle de la Faculté de Médecine de Lille. La température de la salle étant maintenue à 21°C avec un accès libre à l'eau et à la nourriture et avec une exposition à la lumière de 12 heures par jour. Les expérimentations sont réalisées en accord avec les décrets relatifs à l'éthique de l'expérimentation animale (Décret 86/609/CE). Les expérimentations animales concernant les études sur les AG sont réalisées selon le protocole

« 00550.05 ». Dans le cas des expérimentations animales réalisées en présence de la chitine, elles sont effectuées selon le protocole « APAFIS#24465-2019070215212336v4 », approuvé par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale de la région Hauts-de-France.

B. Procédures générales

a. Procédures générales concernant le traitement avec les acides gras

Les animaux sont séparés en plusieurs groupes avec un accès libre à l'eau contenant du DSS à 1,5%. Les cages sont hermétiques et contiennent un filtre à air pour éviter les contaminations externes. Au total, 7 groupes sont réalisés : le groupe contrôle (CTL) représente le groupe sans gavage et inflammation. Les groupes contenant *C. glabrata* (Cg) ou les AG (FA ; fatty acid) représentent les groupes contrôles sans colite chimio-induite. Le groupe DSS (D) sert de groupe contrôle de l'inflammation. Le groupe en présence de *C. glabrata* et de DSS (DCg) sert de groupe contrôle de la colonisation sous inflammation. Les groupes en présence des AG et sous inflammation (DFA) ou sous colonisation en présence d'inflammation (DCgFA) sont les groupes d'intérêts. Lors des expérimentations, les animaux sont pesés et les selles sont récupérées tous les 2 jours et ce, après avoir évalué leur score clinique selon des critères prédéterminés. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale au 14^{ème} jour post-inoculation de *C. glabrata*.

1) Inoculation de *C. glabrata*, des acides gras et induction de la colite chimio-induite par DSS

Au début de l'expérimentation (jour 0 ; J0), les animaux des groupes contenant les levures reçoivent un gavage unique oral de 300 µL de PBS contenant 5.10^7 cellules de *C. glabrata*. Les animaux des groupes avec AG ont reçu pendant les 5 premiers jours, un gavage oral de 250 µL de PBS contenant les AG à 1mg/kg/souris. En parallèle, du DSS à une concentration de 1,5% est ajouté dans l'eau, pour les groupes subissant une inflammation chimio-induite, pour toute la durée de l'expérience afin d'induire une inflammation de la paroi intestinale murine conduisant à une colite.

b. Procédures générales concernant les traitements avec la chitine fongique

Les animaux sont séparés en plusieurs groupes avec un accès libre à l'eau contenant du DSS à 2%. Les cages sont hermétiques et contiennent un filtre à air pour éviter les contaminations externes. Au total, 8 groupes sont réalisés pour chacune des deux procédures : le groupe contrôle (CTL) représente le groupe sans gavage et inflammation. Les groupes contenant *C. glabrata* et/ou la chitine (Cg ; Ch ; CgCh) représentent les groupes contrôles sans colite chimio-induite. Le groupe DSS (D) sert de groupe contrôle de l'inflammation. Le groupe en présence de *C. glabrata* et de DSS (DCg) sert de groupe contrôle de la colonisation sous inflammation. Les groupes en présence de la chitine et sous inflammation (DCh) ou sous colonisation en présence d'inflammation (DCgCh) sont les groupes d'intérêts. Lors des expérimentations, les animaux sont pesés et les selles sont récupérées tous les 2 jours et ce, après avoir évalué leur score clinique selon des critères prédéterminés. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale au 14^{ème} jour post-inoculation de *C. glabrata*.

1) Extraction de la chitine

Les culots cellulaires de *C. glabrata* ont été lavés dans du tampon PBS. La chitine a été extraite des cellules fongiques comme décrit précédemment¹⁵. Ainsi, le culot cellulaire a été incubé dans 20 mL de KOH 10% et est autoclavé à 120 °C. Cette étape est répétée une deuxième fois. Après plusieurs lavages à l'eau milliQ, le surnageant a été éliminé et le culot a été oxydé en présence de 50% de peroxyde d'hydrogène et 50% d'acide acétique. Puis, un autoclave à 120 °C est de nouveau effectué. La fraction de chitine subit alors plusieurs lavages à l'eau milliQ. La nature et la pureté de la chitine ont été confirmées *via* une analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID Agilent). La concentration de chitine a été déterminée à l'aide d'un dosage de l'Acide BiCinchonique. La gamme standard pour le contrôle de la N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) était de 0,1-0,5 mg/mL.

2) Inoculation de *C. glabrata*, de la chitine et induction de la colite chimio-induite lors de la 1^{ère} procédure

Au cours de la 1^{ère} procédure, les animaux des groupes contenant les levures reçoivent un unique gavage oral de 250 µL de PBS contenant $5 \cdot 10^7$ cellules de *C.*

glabrata. Pour le traitement par la chitine, les animaux ont reçu des injections intrapéritonéales de 200 µL contenant de la chitine purifiée de *C. glabrata* à 3mg/souris/jour pendant 5 jours. En parallèle, du DSS à une concentration de 2% est ajouté dans l'eau, pour les groupes subissant une inflammation chimio-induite, pour toute la durée de l'expérience afin d'induire une inflammation de la paroi intestinale murine conduisant à une colite (**Figure 21**).

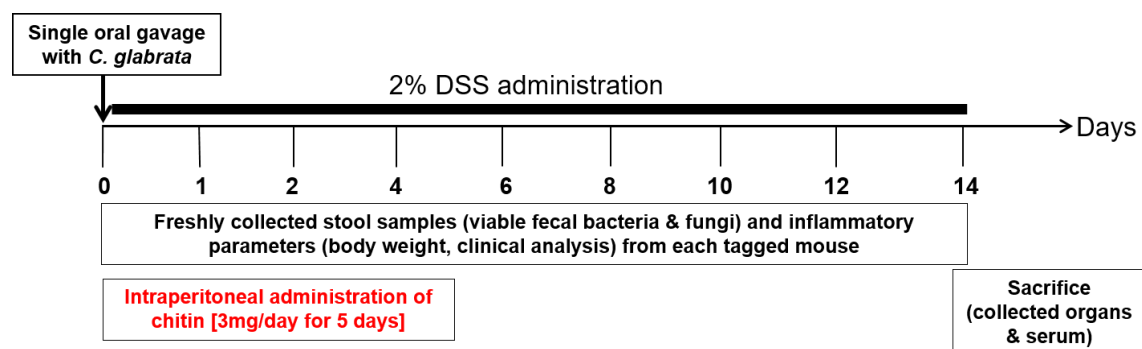


Figure 21 : Schéma du modèle expérimental de la première procédure.

3) Inoculation de *C. glabrata*, de la chitine et induction de la colite chimio-induite lors de la 2nde procédure

Au cours de la 2^{ème} procédure, les souris ont reçu trois injections de chitine. Ces injections ont été effectuées chez les souris trois semaines avant que celles-ci soient traitées avec du DSS et gavées avec du *C. glabrata*. Ainsi, pour le traitement avec de la chitine, les animaux ont reçu une injection sous-cutanée de 200 µL contenant de la chitine purifiée de *C. glabrata* additionnée d'un adjuvant de Freund (Freund's Adjuvant, Complete ; Sigma-aldrich ; F5881-10mL). De plus, les animaux des groupes contenant les levures du genre *Candida* ont reçu un unique gavage oral de 250 µL de PBS contenant 5.10^7 cellules de *C. glabrata* à J0. En parallèle, du DSS à une concentration de 2% est ajouté dans l'eau, pour les groupes subissant une inflammation chimio-induite, pour toute la durée de l'expérimentation (**Figure 22**).

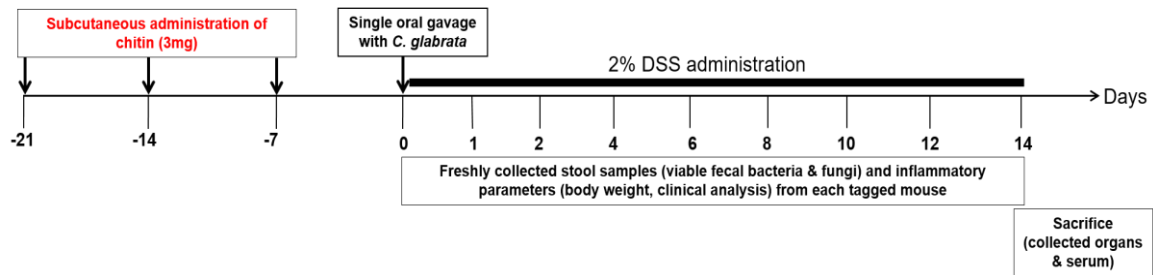


Figure 22 : Schéma du modèle expérimental de la seconde procédure.

4) Purification des IgG murines

A la fin de l'expérimentation, les souris sont sacrifiées et le sang de chaque souris est récupéré. Les sérums sont rassemblés par groupe après centrifugation du sang à 10 000 g pendant 5 minutes. Les anticorps (IgG) murins sont récupérés via un kit d'agarose Thermo Scientific™ Pierce Protéine G, qui est une résine polyvalente à hautes performances pour la purification des anticorps par affinité (Nab™ Protein G Sin Kit ; réf : 89979 ; Thermo scientific). Brièvement, le sérum est dilué à un volume de 1 : 1 en présence de Binding Buffer. L'échantillon est ensuite déposé sur la colonne. La colonne est lavée avec 15 mL de Binding buffer. Puis, l'élution des IgG est effectuée *via* 5 mL de tampon d'élution. Les IgG sont alors récupérées sous forme de fraction de 1 mL dans 5 eppendorfs contenant au préalable 100 µL de Neutralization buffer.

5) Détection et quantification des IgG murines

Un volume de 20 µL de chaque fraction d'IgG murin est dénaturée en présence de Laemmli 5x (95°C pendant 10 minutes) puis déposée sur un gel d'acrylamide à 10% pour une analyse par SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Un étalon de taille est également déposé afin d'obtenir une échelle de protéines précolorée (Échelle de protéines précolorée PageRuler™, 10 à 180 kDa, 26616, Thermo Scientific). Par la suite, une coloration au PageBlue est réalisée sur gel pendant 1h (PageBlue Protein Staining Solution, ; Thermo Scientific) suivi de plusieurs lavages à l'eau milliQ et d'une lecture à l'aide de l'appareil iBright (FL1500 Imaging system ; Thermo Scientific). En parallèle, un dépôt circulaire direct de 20 µL de chaque fraction d'IgG murine est effectué sur une membrane de nitrocellulose (Nitrocellulose blotting membrane ; Amersham™ Protran™ Premium 0,2 µm NC ; GE Healthcare Life science). La membrane est saturée en présence de PBS-BSA 3% (Bovine serum albumin ; Sigma-aldrich ;

A7906-100G) pendant 1h. Celle-ci est ensuite mise en présence d'un anticorps anti-IgG murin couplé à du FITC (Goat anti-mouse IgG-FITC, Human Adsorbed ; SouthernBiotech ; 1030-02) dilué au 1/4000^{ème} pendant 1 nuit à 4°C. La membrane subit trois lavages au PBS-tween 0,05% (TWEEN-20 ; Sigma-aldrich ; P2287-100ML). Puis une lecture est effectuée par l'intermédiaire de l'iBright FL1500. Par la suite, la concentration d'IgG murine (g/L) de chaque échantillon est mesurée par un spectrophotomètre (Nanodrop 1000, Thermo scientific).

6) Reconnaissance de la chitine par les IgG murines par test ELISA

Un dépôt de 50 µg/mL de chitine dans du tampon bicarbonate à 50 mM (carbonate-bicarbonate buffer ; réf : C3041-100CAP ; Sigma-aldrich) est réalisé en plaque 96 puits (Nucleon Delta Surface ; réf : 167008 ; Thermo scientific) pendant 1 nuit à 37°C. La plaque est saturée par l'ajout de 200 µL de PBS-BSA à 1,5% pendant 1h à température ambiante sous agitation (major science ; orbital shaker). Le surnageant est éjecté et 25 µg d'IgG est déposée pendant 1h30 à température ambiante sous agitation. La plaque subit deux lavages au PBS-Tween à 0,05% puis 200 µL d'anticorps secondaire est ajouté au 1/5000^{ème} (Goat anti-mouse IgG, Human-ads-HRP ; SoutherBiotech ; 1031-05) pendant 1h à température ambiante sous agitation. La plaque subit à nouveau des lavages au PBS-Tween à 0,05%. Enfin, 100 µL de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system ; réf : T8665-100ML ; Sigma-aldrich) est ajouté pendant 15 minutes suivi de 100 µL de solution stop (H2SO4 2N) juste avant de réaliser la lecture de la plaque à 450 nm au FLUOstar Omega (BMG Labtech).

7) Effet des anticorps murins sur la modulation de l'expression de récepteurs, médiateurs et cytokines exprimés par les macrophages

Une suspension de 10⁶ cellules THP-1 est différenciée en macrophages *via* l'ajout de phorbol à 200 ng/mL pendant 72h. Puis les macrophages sont incubés pendant 24h dans du milieu RPMI. Les macrophages sont ensuite mis en présence de LPS à une concentration de 250 ng/mL pendant 6h. En parallèle, les anticorps IgG murins sont ajoutés à une concentration de 500 µg/mL. Un contrôle contenant simplement des macrophages est réalisé afin de standardiser et comparer les autres conditions par rapport à celui-ci. Par la suite, les cellules sont récupérées dans du tampon RA1 pour effectuer une extraction d'ARNm suivie d'une RT-PCR et d'une q-

PCR comme indiqué dans les sections 3, 4, et 5 (les séquences des amorces sont listées dans le **tableau 1 en annexe**).

C. Recueil des données

La masse corporelle, le score clinique (cf. section 8.D.) et les selles de chaque animal ont été recueillis tous les deux jours. La présence de *C. glabrata* dans le tractus intestinal a été contrôlée tous les deux jours en mesurant le nombre d'unité formant colonie (UFC) dans les selles prélevées sur chaque animal. Les selles sont pesées, puis 1 mL de PBS est ajouté avant d'homogénéiser l'ensemble. Après différentes étapes de dilution au dixième, un volume de 100 µL est déposé dans des boîtes de Pétri sur le milieu de culture Sabouraud pour la culture fongique. En parallèle, nous avons suivi les bactéries anaérobies facultatives et aérobies cultivables les plus représentatives et qui peuvent subir des changements au cours de l'inflammation intestinale. Les cultures bactériennes sont réalisées sur du milieu de culture MacConkey (MCK, Sigma-aldrich), Bile Esculine Azide (BEA ; Sigma-aldrich) et de De Man, Rogosa et Sharpe (MRS agar ; Sigma-aldrich) pour observer les entérobactéries, les entérocoques et les lactobacilles, respectivement. Tous les milieux aérobies et anaérobies contiennent 20 mg/L de fluconazole (Fresenius Kabi) pour inhiber la croissance des cellules fongiques. Pour les bactéries anaérobies, la culture est réalisée dans des jarres contenant un générateur d'atmosphère anaérobie (AnaeroGenTM 2,5 L ; Sigma-Aldrich) à 37 °C. L'ensemble des boîtes de Pétri est incubé pendant 24 à 48 heures à 37°C afin de favoriser la croissance des bactéries ou des levures et le résultat est noté en nombre de UFC/mg de selles. Cette étude permet de suivre l'évolution de la présence de *C. glabrata* et de certaines populations bactériennes au niveau du tube digestif. Afin de déterminer le degré de colonisation du tractus digestif par *C. glabrata*, les souris ont été sacrifiées au 14^{ème} jour puis l'estomac, le cæcum et le côlon ont été récupérés. Ces différents segments ont ensuite été broyés (TURRAX, T10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA®) et des dilutions en série des homogénats ont été préparées et étalées sur le milieu Sabouraud. Le nombre de colonies a été noté après 24h d'incubation à 37 °C et exprimé en UFC de *C. glabrata*/mg de tissu (cf. section 8.G). Pour identifier les bactéries retrouvées dans les boîtes de Pétri, les colonies ont été mélangées avec 1,5 µL de solution de matrice (acide α-cyano 4-hydroxycinnamique ; Bruker Daltonics) dissoute dans 50 % d'acétonitrile, 47,5 % d'eau et 2,5 % d'acide

trifluoroacétique, et analysées par MALDI-TOF MS (Microflex-Bruker Daltonics). En parallèle, après sacrifice des souris, plusieurs segments du côlon ont été récupérés afin de réaliser les coupes histologiques nécessaires pour l'évaluation du score histologique (cf. section 8.E. et 8.F.) ainsi que l'analyse de l'expression des récepteurs, médiateurs et cytokines qui sont impliqués dans l'inflammation au niveau colique (section 8.H) (**Figure 23**).

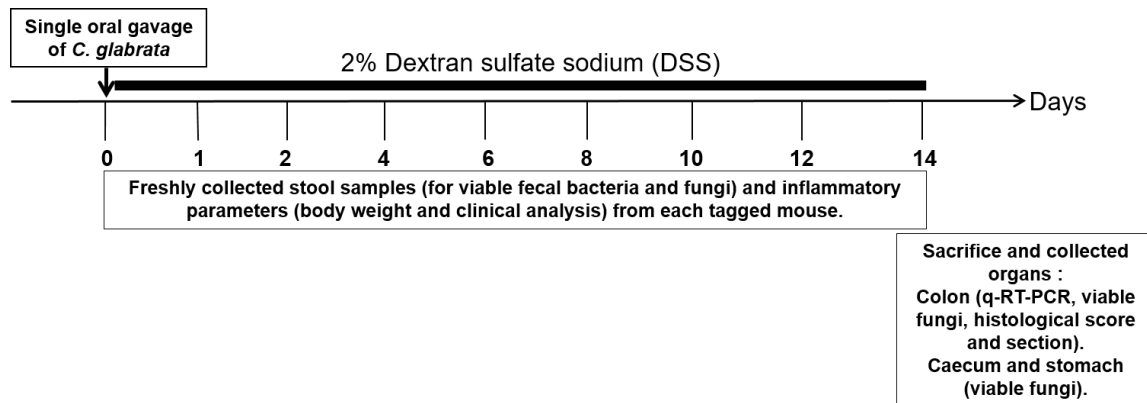


Figure 23 : Schéma du recueil des données concernant le modèle murin.

D. Détermination du score clinique

Le score clinique d'inflammation est un marqueur qui reflète l'intensité des lésions intestinales. Le score clinique de chaque souris a été évalué à chaque recueil de mesures. Par l'intermédiaire de la présence de sang dans les selles, au niveau péri-anal et de la consistance des selles. Des échelles numériques ont été établies de 0 à 4. Pour la présence de sang dans les selles : 0= pas de sang ; 2= présence de sang ; 4= présence abondante de sang dans les selles et au niveau de la marge anale. Pour la consistance des selles : 0= selles normales ; 2= selles molles ; 4= diarrhée. Pour le comportement des souris : 0= aspect général de l'animal normal ; 2= poils hérissés ou l'animal est prostré ; 4= poils hérissés + animal prostré ou en retrait. Les trois indicateurs sont additionnés afin de donner un score compris entre 0 (bonne santé) et 12 (inflammation maximale du côlon) reflétant alors la sévérité de l'inflammation.

E. Score histologique

A l'issue de l'expérience, les souris sont sacrifiées et une partie du côlon de chaque animal est récupérée puis conservée dans du formaldéhyde toute la nuit à

4°C. Les échantillons sont introduits au sein de cassettes histologiques et déshydratés par l'intermédiaire d'un automate (Milestone LOGOS One). Les cassettes sont récupérées afin de réaliser l'inclusion par l'intermédiaire d'un appareil (TES Valida, Medite). Cette inclusion consiste à fixer les échantillons dans de la paraffine liquide (chauffée à 60°C) qui se solidifie au contact d'une plaque froide. Une fois les échantillons fixés, des coupes peuvent être réalisées sur lame par l'intermédiaire d'un microtome (RM2245, Leica). Par la suite, le score histologique a été réalisé. En effet, lors d'une colite, des modifications au niveau colique résultent de l'inflammation intestinale et peuvent être objectivées. Ainsi, le score histologique de chaque souris a été évalué sur chaque coupe histologique par l'intermédiaire de la présence de lésion épithéliale, d'œdème et d'infiltrat leucocytaire. Une échelle numérique a été établie et dont les caractéristiques sont : 0= pas de lésion épithéliale et d'infiltrat leucocytaire ; 3= présence de lésions épithéliales, d'œdèmes ou d'infiltrats leucocytaires ; 6= présence de lésions épithéliales, d'œdèmes et d'infiltrats leucocytaires. Ainsi, l'ensemble de ces caractéristiques permettent de donner un score compris entre 0 (pas de changement) et 6 (infiltration cellulaire et dommage tissulaire) reflétant alors la sévérité de l'inflammation.

F. Coloration des coupes histologiques

Les lames réalisées subissent divers bains consécutifs : xylène (3 bains) ; éthanol (2 bains) ; eau milliQ (2 bains). Les lames sont soumises ensuite à un bain d'acide périodique à 2% (2 mg/100 mL) suivi d'un bain en présence de schiff's reagent. Puis, les lames sont insérées dans un bac d'eau milliQ contenant 2mL d'Hematoxylin Losung (Gill III). Par la suite, les lames font l'objet de divers bains pour déshydrater : eau milliQ (2 bains) ; éthanol (2 bains) ; xylène (3 bains). Une goutte d'eukitt quick handeming est ensuite déposée sur les échantillons de chaque lame. Après coloration, les coupes sont observées sur l'appareil Axio-scan (Z1, Zeiss).

G. Colonisation de *C. glabrata* au sein du tube digestif

A l'issue de l'expérimentation, les souris sont sacrifiées. Des segments du tube digestif, de chaque animal ayant subi un gavage ou non par des levures, sont récupérés. Il s'agit de trois parties distinctes du tube digestif (estomac, caecum et côlon). Les segments sont pesés puis 1mL de PBS est ajouté afin d'homogénéiser l'échantillon par broyat *via* un appareil TURRAX (T10 basic ULTRA-TURRAX®,

IKA®). Un volume de 100 µL est déposé dans des boîtes de Pétri sur le milieu de culture Sabouraud. Les milieux sont incubés pendant 24 heures à 37°C afin de favoriser la croissance des levures. Cette étude permet d'apprécier la colonisation du tube digestif par *C. glabrata*. Le résultat est noté en nombre de UFC/mg d'organes.

H. Purification des ARNm issus du côlon murin

A la fin de l'expérimentation, une partie du côlon murin de chaque souris est récupérée et conservée à -20°C. Par la suite, chaque côlon est récupéré et lysé dans du tampon RA1 afin d'effectuer une extraction d'ARNm suivie d'une RT-PCR et d'une q-PCR comme indiqué dans les sections 3, 4, et 5 (les séquences des amorces sont listées dans le **tableau 1 en annexe**).

9. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques est réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism® 9.0 (logiciel GraphPad, San Diego, CA, USA). Les valeurs de p inférieures ou égales à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives. Les données sont présentées sous forme de moyenne associée à la déviation standard ou de médiane associée à son intervalle interquartile. Les comparaisons statistiques sont réalisées par test non paramétrique de Mann-Whitney ou par ANOVA. Les données graphiques sont représentées sous forme de médiane ou de moyenne.

Partie 1 : Étude des propriétés antifongiques et anti-inflammatoires présentées par l'acide oléique et l'acide palmitique issus de l'interaction des bactéries « *B. thetaiotaomicron* » et « *L. johnsonii* » avec des cellules épithéliales de côlon murin.

Résultats

A) Caractérisation des acides gras et étude de leurs propriétés anti-inflammatoires

Dans un premier temps, nous avons réalisé la caractérisation et l'identification des AG provenant de l'interaction entre *B. thetaiotaomicron* et *L. johnsonii*, qui présentaient des propriétés bénéfiques lors de notre étude antérieure, et des cellules épithéliales intestinales de côlon murin. Après extraction et caractérisation de ces AG, nous avons déterminé si ces derniers présentent des propriétés anti-inflammatoires par l'intermédiaire de nos lignées cellulaires de cellules épithéliales intestinales et de macrophages tout en développant un nouveau modèle de migration cellulaire au sein du laboratoire.

1. Caractérisation et identification des acides gras provenant de l'interaction de *B. thetaiotaomicron* et *L. johnsonii* avec des cellules épithéliales de côlon murin

Dans le but d'analyser les métabolites lipidiques et plus précisément les AG issus de l'interaction entre *B. thetaiotaomicron* et *L. johnsonii* » avec les cellules épithéliales, nous avons prélevé et lavé des côlons de souris *C57BL/6* saines (n'ayant subi aucune manipulation). Les côlons sont ensuite incubés pendant 12h en présence ou non de *B. thetaiotaomicron* et *L. johnsonii* afin de récupérer les surnageants. A partir de ces derniers, une extraction par $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ est effectuée pour récupérer la phase chloroformique contenant les AG. Puis une dérivation est réalisée afin de caractériser les AG à l'aide d'un appareil de GC/MS en fonction de leur temps de rétention et de leur pattern de fragmentation (**Figure 24**). Ainsi, nous avons pu constater la présence de deux AG en proportion significative dans les surnageants contenant les bactéries : le premier sortant à un temps de rétention de 37,4 min correspondant à l'acide palmitique-méthyle estérifié et le deuxième sortant à 41,4 min correspondant à l'acide oléique-méthyle estérifié contrairement aux échantillons correspondant au milieu RPMI seul, au côlon seul ou au côlon + *C. glabrata* (**Fig 24A-E**). Par la suite, ces deux molécules ont été identifiées comme étant l'acide palmitique (C16) et l'acide oléique (C18 :1).

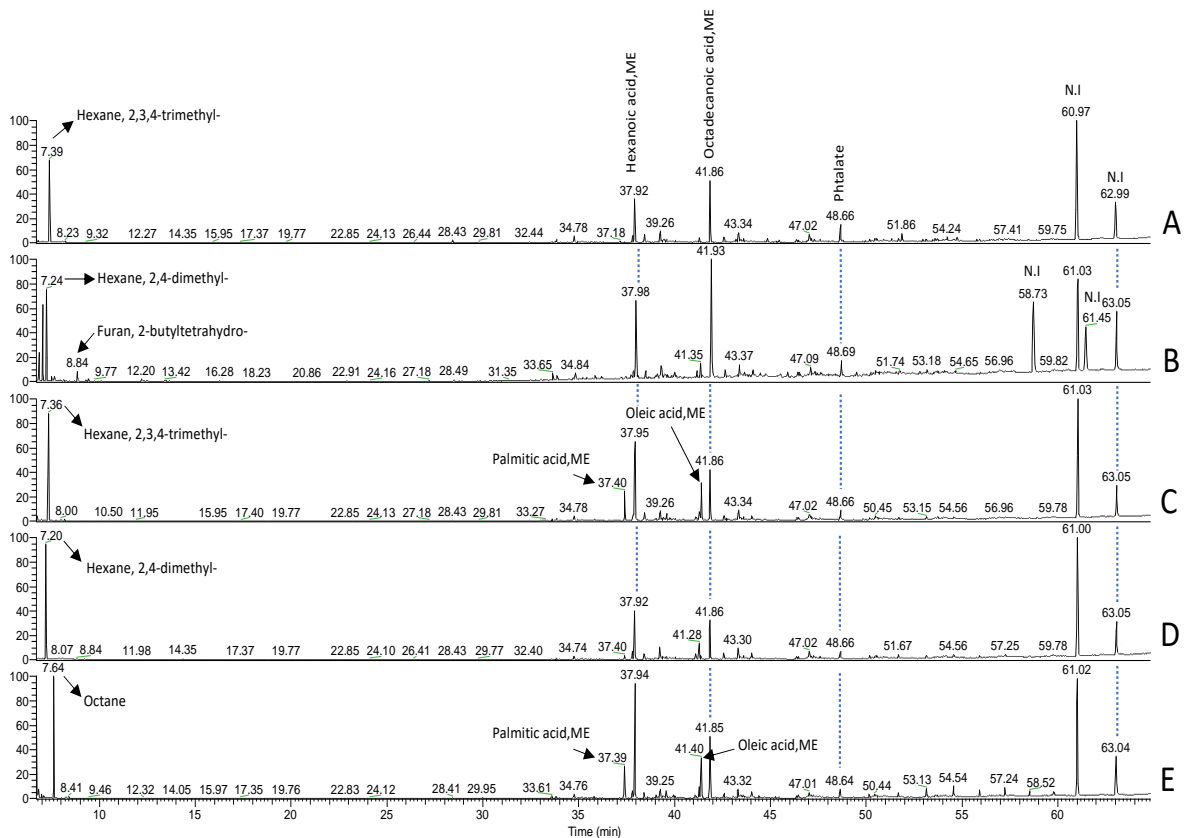


Figure 24 : Données représentatives de l'analyse obtenue par GC-MS. (A) Analyse du milieu RPMI seul. (B) Analyse d'un côlon de souris. (C) Analyse d'un côlon de souris avec *B. thetaiotaomicron* et *L. johnsonii*. (D) Analyse d'un côlon de souris avec *C. glabrata*. (E) Analyse d'un côlon de souris avec *B. thetaiotaomicron*, *L. johnsonii* et *C. glabrata*.

2. Effet du traitement par DSS sur la viabilité des cellules Caco-2

Ce modèle nous servira à évaluer les effets anti-inflammatoires supposés des AG. Pour cela, nous avons mesuré la viabilité de nos cellules Caco-2 en présence des diverses concentrations de DSS (0,5%, 1% et 1,5%) (**Figure 25**). Les données obtenues montrent que le DSS n'induit pas de mortalité en deçà de 1,5% contrairement aux cellules en présence de DMSO à 20% qui montrent une mortalité d'environ 90% (contrôle négatif).

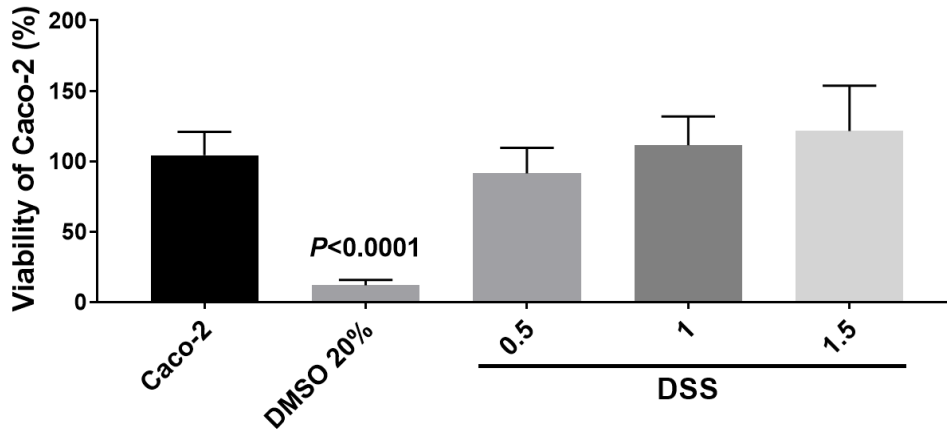


Figure 25 : Mesure par MTT de la viabilité des cellules Caco-2 traitées par DSS à diverses concentrations. Le DMSO à 20% sert de contrôle négatif. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

3. Observation au microscope des cellules Caco-2 traitées par DSS

Afin de confirmer les données précédemment obtenues sur la viabilité, nous avons observé au microscope conventionnel si des variations ou des changements morphologiques surviennent lors du traitement avec les diverses concentrations de DSS (0,5% ; 1% et 1,5%) (**Figure 26**). Après 2h d'incubation, nous montrons qu'il n'y a aucune différence visible entre les cellules Caco-2 traitées ou non (cellules contrôle) par DSS (**Fig. 26A-D**). Effectivement, toutes les observations microscopiques montrent que les cellules présentent la même morphologie tout en étant non confluentes. Néanmoins, en présence de DMSO à 20%, nous observons que les cellules sont non confluentes tout en présentant une proportion de lyse cellulaire (**Fig. 3E**). Après 24h, nous observons que la condition contrôle (**Fig. 26F**) montre des cellules totalement confluentes et adhérentes. Dans le cas des conditions en présence de DSS (**Fig. 26G-I**), nous observons que les cellules sont toujours adhérentes mais montrent une confluence moindre. Cela confirme que les cellules sont viables malgré l'ajout du traitement par DSS. A l'inverse, dans la condition où les Caco-2 sont en présence de DMSO à 20%, nous observons à la fois des débris cellulaires, une absence d'adhérence et de confluence des cellules (**Fig. 26J**).

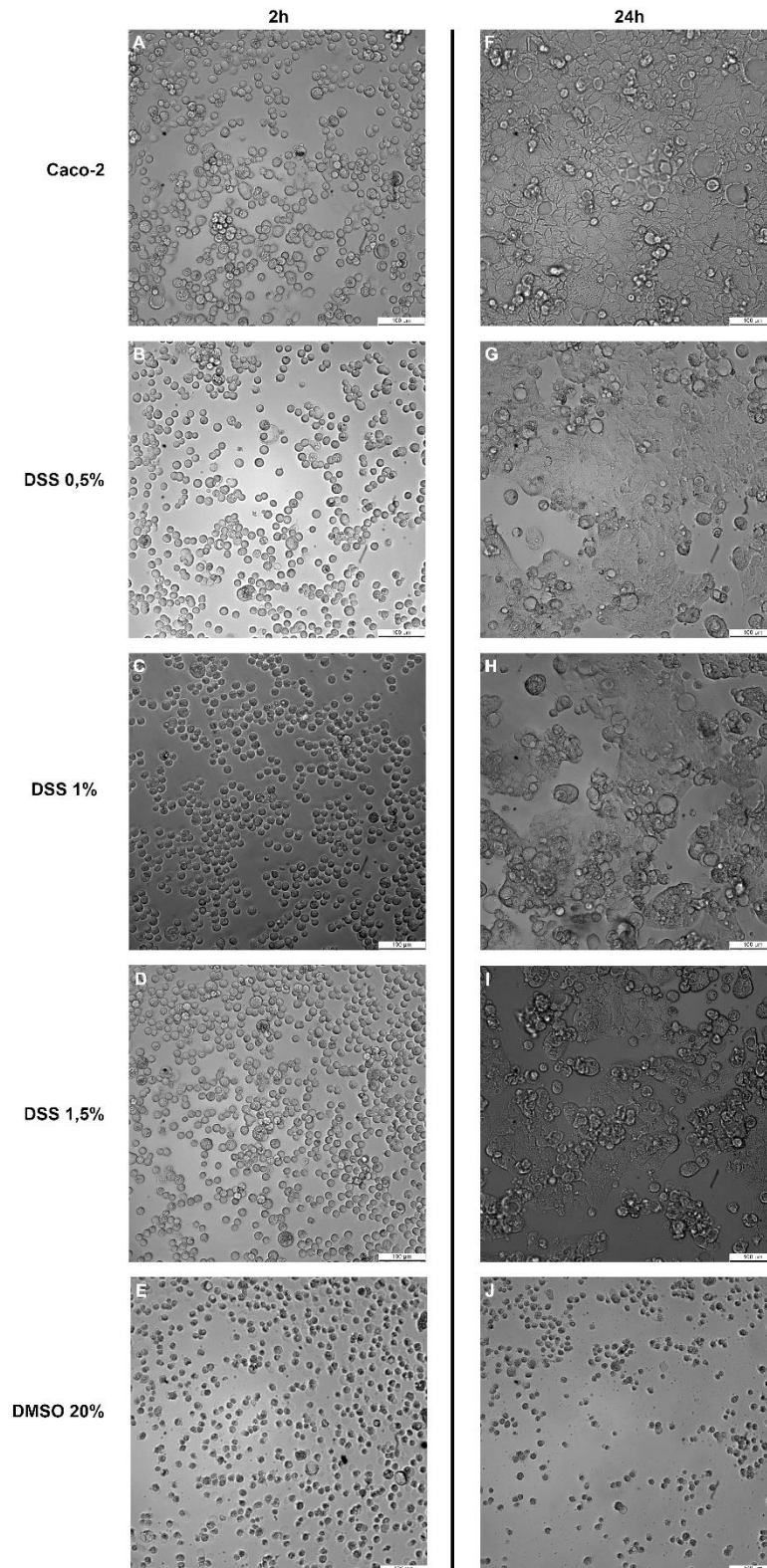


Figure 26 : Observation des cellules épithéliales Caco-2, traitées avec du DSS à différentes concentrations, après 2h et 24h par l'intermédiaire d'un microscope optique (Gx20). (A) Cellules Caco-2 seules après 2h ; (B) Cellules Caco-2 avec 0,5% de DSS après 2h ; (C) Cellules Caco-2 avec 1% de DSS après 2h ; (D) Cellules Caco-2 avec 1,5% de DSS après 2h ; (E) Cellules Caco-2 avec 20% de DMSO après 2h ; (F) Cellules Caco-2 seules après 24h ; (G) Cellules Caco-2 avec 0,5% de DSS après 24h ; (H) Cellules Caco-2 avec 1% de DSS après 24h ; (I) Cellules Caco-2 avec 1,5% de DSS après 24h ; (J) Cellules Caco-2 avec 20% de DMSO après 24h.

4. Modulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires exprimées par les cellules Caco-2 traitées avec du DSS

Nous avons aussi analysé l'effet des diverses concentrations de DSS (0,5% ; 1% et 1,5%) sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires exprimées par les cellules Caco-2 (**Figure 27**). Ainsi, nous avons observé les conséquences d'un traitement avec du DSS sur l'expression à la fois d'une cytokine de référence ayant un rôle très important dans l'inflammation intestinale : TNF α (**Fig. 27A**) mais aussi sur une chimiokine produite par les cellules épithéliales après la détection d'agents pathogènes, tout en étant également une cytokine pro-inflammatoire produite en cas de stimulation immunitaire : IL-8 (**Fig. 27B**). Il faut tout d'abord souligner que le contrôle, représenté par les cellules Caco-2 seules, reflète quant à lui un état basal de l'expression des cytokines. Nos résultats montrent alors une augmentation significative de l'expression de ces deux cytokines, qui est de plus en plus marquée lorsque nous sommes en présence d'une concentration en DSS de plus en plus importante par rapport à la condition contrôle. Par ailleurs, les résultats mettent en évidence que la concentration avec 1,5% de DSS permet d'obtenir une meilleure robustesse statistique de la variation de l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires exprimée par les cellules Caco-2 (IL-8 et TNF α) vis-à-vis du contrôle. Cela permet de confirmer que la concentration à 1,5 % offre les meilleures conditions pour mesurer les variations des cytokines pro-inflammatoires des cellules Caco-2 exposées au DSS.

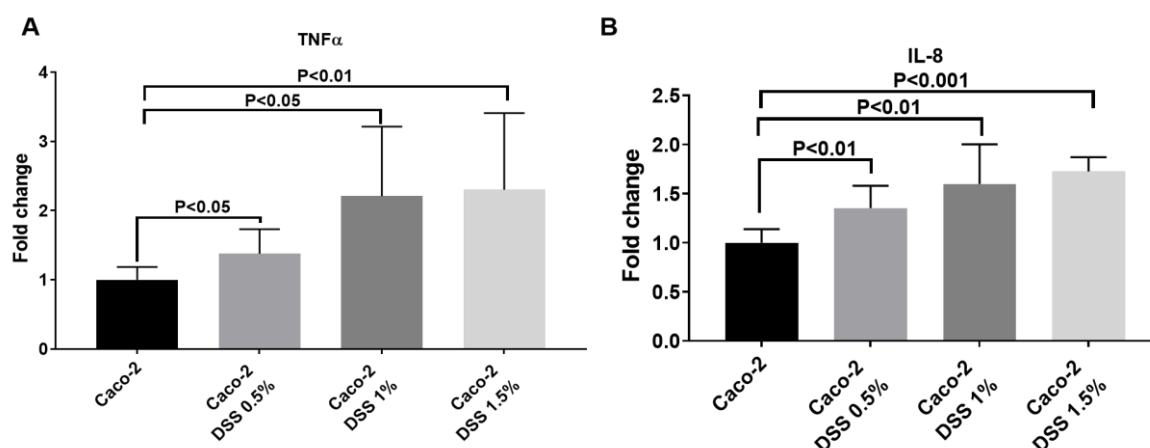


Figure 27 : Variation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires des cellules Caco-2 exposées au DSS. (A) Variation de l'expression du TNF α exprimée par les cellules Caco-2. (B) Variation de l'expression de l'IL-8 exprimée par les cellules Caco-2. Caco-2 : contrôle de l'expérience en absence de DSS. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

5. Mise au point du modèle permettant la migration des macrophages vers *C. albicans* à travers une barrière épithéliale traitée avec du DSS

Par la suite, nous avons analysé la migration des macrophages vers *C. albicans* à travers une barrière épithéliale exposée à différentes concentrations de DSS (0,5%, 1% et 1,5%). Cette migration permet de mettre en évidence l'influence du traitement sur l'intégrité de la barrière épithéliale (**Figure 28**). Ainsi, pour former une barrière intestinale intègre, nous devons laisser les cellules Caco-2 pendant 24h au repos afin qu'elles soient confluentes. Une fois confluentes, ces cellules sont traitées avec du DSS pendant 24h ou 48h. Puis, des macrophages marqués à la calcéïne sont ajoutés afin de détecter leur migration à travers la barrière épithéliale intègre (contrôle) ou altérée par le traitement. Dans ce contexte, nous avons utilisé un contrôle sans DSS (CTL) montrant un passage actif des macrophages vers *C. albicans* à travers une barrière épithéliale intègre et fonctionnelle. L'ensemble des conditions est normalisé par rapport à ce contrôle présentant des valeurs aux alentours de 100%. Un contrôle positif, en absence des cellules Caco-2 (CTL+) qui montre quant à lui un passage actif des macrophages vers *C. albicans* en absence d'une barrière épithéliale. Ce contrôle positif présente des valeurs autour de 350% (**Fig. 28A-B**). Nous remarquons qu'après 24h ou 48h de traitement, nous avons une augmentation significative de la migration des macrophages pour des concentrations de DSS de 1% et 1,5% par rapport au contrôle (CTL). De plus, les données montrent que la migration des macrophages à travers les cellules épithéliales augmente au fur et à mesure que la concentration en DSS augmente. Par ailleurs, nous observons que l'augmentation de la migration des macrophages en présence de DSS reste significativement inférieure à celle du contrôle positif (CTL+). Néanmoins, les résultats obtenus après 48h ont été délibérément écartés de l'analyse puisque dans ces conditions les macrophages auraient été en contact avec le DSS depuis 24h, ce qui fausse à priori l'interprétation des résultats de la migration macrophagique (**Fig. 28B**). En effet, nous ne pouvons pas savoir si la migration observée résulte uniquement de l'activité du DSS sur la barrière épithéliale ou si une stimulation directe des macrophages par le DSS est également à souligner. Ainsi, ces résultats suggèrent que la concentration de DSS à 1,5 % est la condition optimale pour analyser les effets anti-inflammatoires des AG.

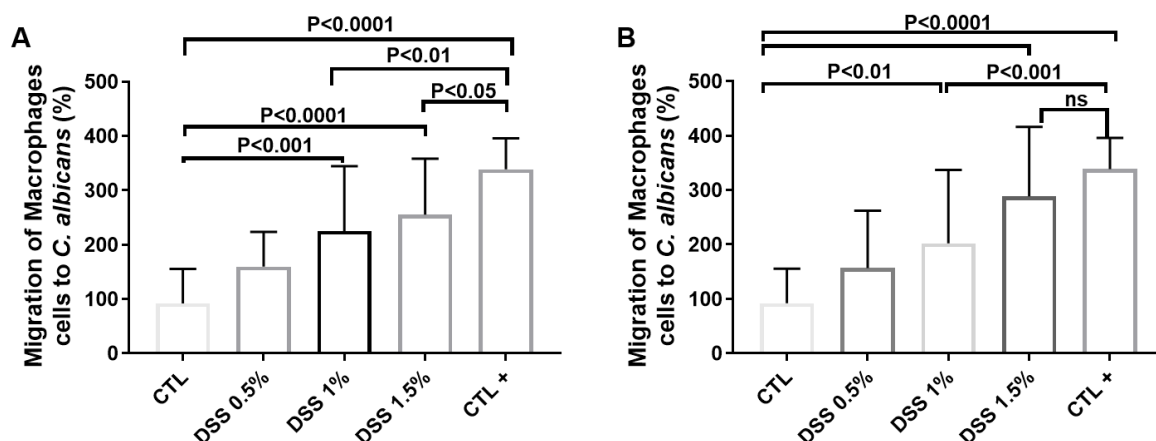


Figure 28 : Migration des macrophages, à travers une membrane semi-perméable de cellules épithéliales Caco-2 traitées par DSS, vers *C. albicans* contenu dans le compartiment inférieur (cf figure 20 de la section 6.B.e du matériels et méthodes). (A) Traitement des cellules Caco-2 pendant 24h avec différentes concentrations en DSS (0,5% ; 1% ; 1,5%). (B) Traitement des cellules Caco-2 pendant 48h avec les diverses concentrations en DSS. CTL : Migration en présence des cellules Caco-2 et *C. albicans*. CTL+ : Migration en absence des cellules Caco-2 et en présence de *C. albicans*. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

6. Effet des acides gras sur la modulation de l'expression des cytokines inflammatoires exprimées par les cellules Caco-2 exposées au DSS

L'effet des AG a été analysé sur les cellules Caco-2 exposées au DSS à 1,5 % en mesurant l'expression des cytokines TNF α , IL-8 et CCL2 en présence de plusieurs concentrations en AG, allant de 5 à 50 μ g/mL. Dans un premier temps, nous observons que l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires augmente significativement en présence du DSS (**Fig. 29A-C**). Les cellules traitées par DSS concomitamment à l'ajout de l'acide oléique, notamment à une concentration de 25 μ g/mL, permet de diminuer significativement l'expression de ces médiateurs pro-inflammatoires par rapport aux cellules traitées par DSS seul (**Fig. 29A-C**). Aucun effet n'a été retrouvé pour l'acide palmitique aux concentrations testées.

Pour aller plus loin, nous avons ensuite effectué la même expérience en présence des deux AG combinés à une concentration de 25 μ g/mL chacun. Nos résultats mettent alors en évidence qu'en absence de DSS, les cellules traitées avec les AG individuellement ou de façon combinée ne montrent pas de variation significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par rapport au contrôle (**Fig. 30A-C**). A l'inverse, les cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS (qui augmente significativement l'expression des médiateurs pro-inflammatoires) montrent que l'acide oléique seul (DOA) ou combiné à l'acide palmitique (DOA/PA) induit une

réduction significative des cytokines pro-inflammatoires par rapport au contrôle approprié (D) (Fig. 30A-C).

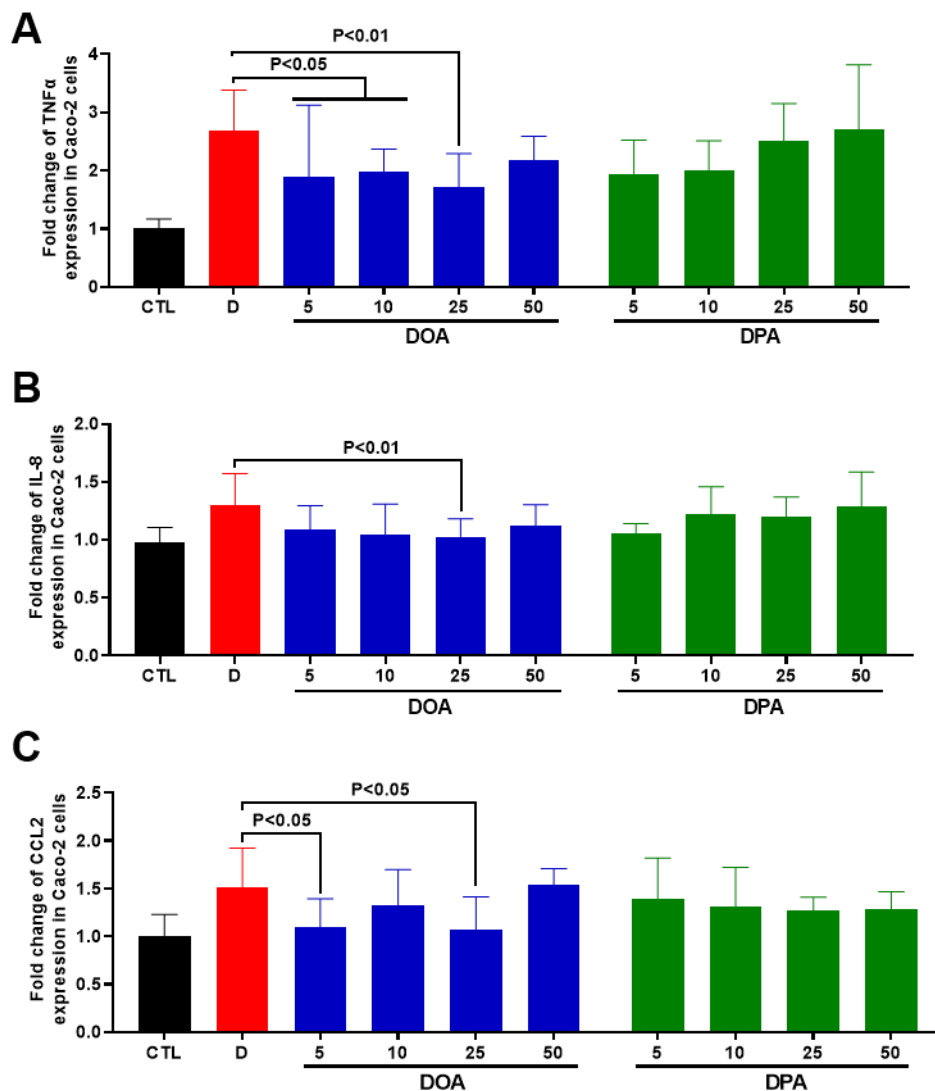


Figure 29 : Évaluation de la modulation de l'expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires par différentes concentrations en AG dans le modèle de cellules Caco-2 traitées au DSS. Niveaux d'expression relative des ARNm du TNFα (A), de l'IL-8 (B) et du CCL2 (C) dans les cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS. CTL correspond à un groupe témoin (cellules Caco-2 seules). D correspond aux cellules Caco-2 stimulées avec 1,5 % de DSS. DOA correspond aux cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS et traitées avec de l'acide oléique à une concentration de 5, 10, 25 ou 50 µg/mL. DPA correspond aux cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS et traitées avec de l'acide palmitique à une concentration de 5, 10, 25 ou 50 µg/mL. Les résultats ont été obtenus à partir de deux expériences indépendantes.

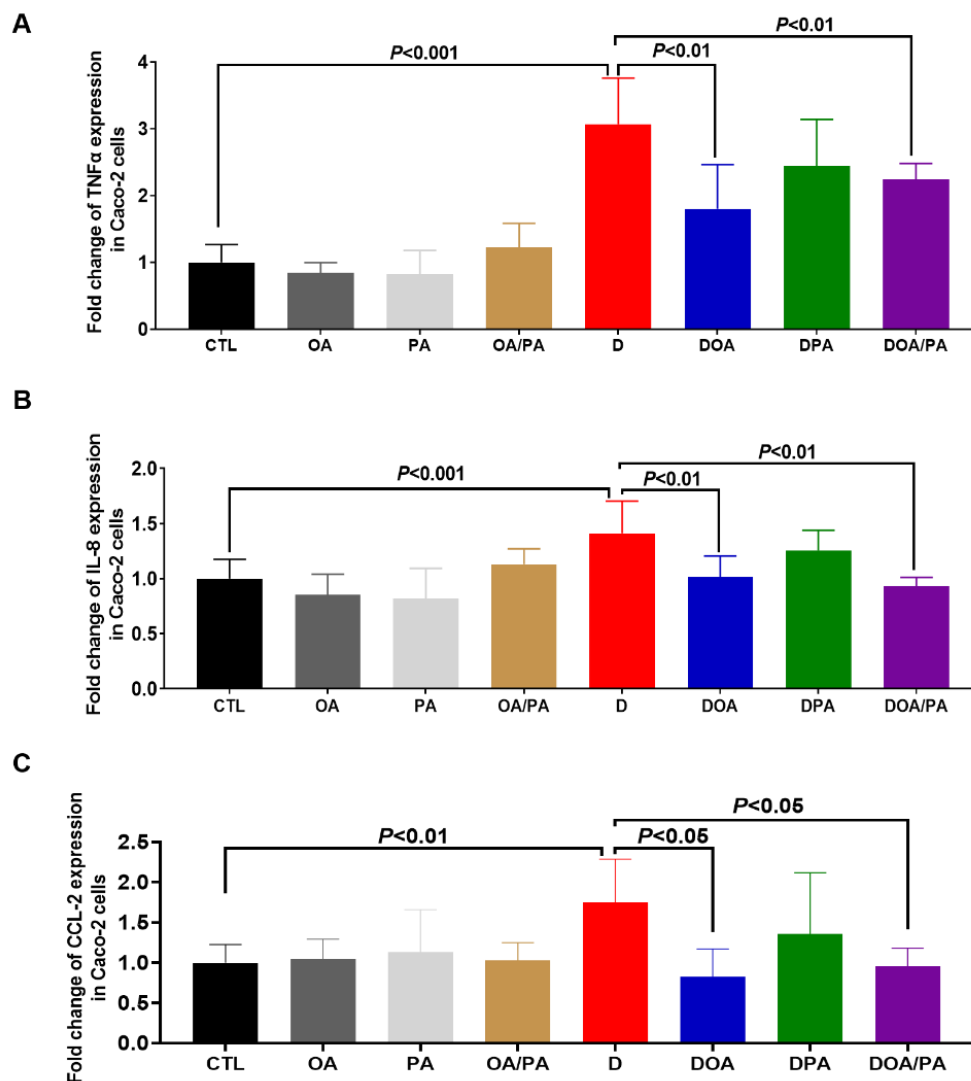


Figure 30 : Effet des acides gras utilisés individuellement ou de façon combinée sur la modulation de l'expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires dans les cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS. Niveaux d'expression relative des ARNm du TNF α (A), de l'IL-8 (B) et du CCL2 (C) dans les cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS. CTL correspond à un groupe témoin (cellules Caco-2 seules). OA correspond aux cellules Caco-2 traitées avec de l'acide oléique à 25 μ g/mL. PA correspond à des cellules Caco-2 traitées avec de l'acide palmitique à 25 μ g/mL. OA/PA correspond aux cellules Caco-2 traitées avec les deux AG à 25 μ g/mL. D correspond aux cellules Caco-2 stimulées avec 1,5 % de DSS. DOA correspond aux cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS et traitées avec de l'acide oléique à 25 μ g/mL. DPA correspond aux cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS et traitées avec de l'acide palmitique à 25 μ g/mL. DOA/PA correspond aux cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS et traitées avec les deux AG à 25 μ g/mL. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

7. Effet des acides gras sur la migration des macrophages vers *C. albicans* à travers une barrière épithéliale de cellules Caco-2 soumises à 1,5 % de DSS

Par la suite, l'effet des AG sur la migration des macrophages vers *C. albicans* à travers une barrière épithéliale Caco-2 saine ou exposée à 1,5 % de DSS a été analysé (**Figure 31**). Pour cela, les mêmes contrôles que ceux utilisés pendant la

mise au point de ce modèle ont été utilisés. Nos résultats montrent que les AG ne modifient pas la migration des macrophages vers *C. albicans* en présence d'une barrière épithéliale intègre (**Fig. 31**). En revanche, l'exposition des cellules au DSS permet bien une augmentation significative de la migration des macrophages par rapport au contrôle (CTL), tout en restant significativement inférieure à celle du contrôle positif (CTL+ ; absence de cellules Caco-2). Il faut alors souligner que dans ce contexte pro-inflammatoire, l'ajout de l'acide oléique (DOA) seul ou de l'acide palmitique (DPA) seul ne diminue pas la migration des macrophages, alors que la combinaison des deux AG (DOA/PA) permet de diminuer de manière significative la migration macrophagique par rapport aux cellules exposées à 1,5% de DSS.

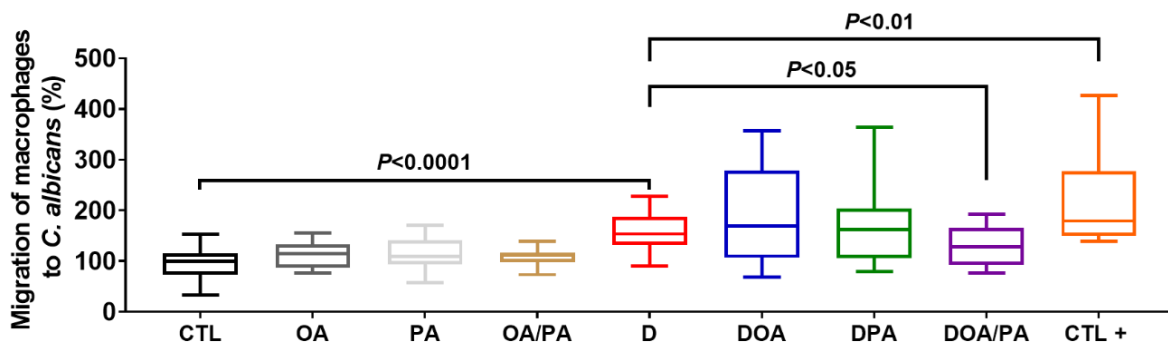


Figure 31 : Migration des macrophages vers *C. albicans* à travers des cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS et traitées avec les acides gras. CTL correspond à un contrôle (migration des macrophages à travers des cellules Caco-2 non traitées avec du DSS). OA correspond à la migration des macrophages à travers les cellules Caco-2 non exposées au DSS et traitées avec de l'acide oléique seul à 25 µg/mL. PA correspond à la migration des macrophages à travers les cellules Caco-2 non exposées au DSS et traitées avec de l'acide palmitique seul à 25 µg/mL. OA/PA correspond à la migration des macrophages à travers les cellules Caco-2 non exposées au DSS et traitées avec les deux AG à 25 µg/mL. D correspond à la migration des macrophages à travers les cellules Caco-2 exposées au DSS. DOA correspond à la migration des macrophages à travers les cellules Caco-2 exposées au DSS et traitées avec de l'acide oléique seul à 25 µg/mL. DPA correspond à la migration des macrophages à travers les cellules Caco-2 exposées au DSS et traitées avec de l'acide palmitique seul à 25 µg/mL. DOA/PA correspond à la migration des macrophages à travers les cellules Caco-2 exposées au DSS et traitées avec les deux AG à 25 µg/mL. CTL + représente un contrôle positif (migration des macrophages en absence de cellules Caco-2). Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

8. Effet des acides gras sur la modulation de l'expression des cytokines, des médiateurs et des récepteurs impliqués dans les voies de signalisation inflammatoire des macrophages

Le LPS, un composant de la paroi des bactéries à Gram négatif et agoniste de TLR4, est considéré comme un agent d'activation des macrophages. Dans ce travail, nous avons étudié l'effet des AG sur les macrophages stimulés par le LPS. Pour ce

faire, nous avons utilisé un traitement avec du LPS pendant 6h sur des macrophages (dérivés de cellules THP-1) pour induire une augmentation de l'expression du profil cytokinique, des médiateurs et des récepteurs impliqués dans les voies de signalisation inflammatoire afin d'étudier les propriétés pro- ou anti-inflammatoires des AG (**Figure 32 et 33**).

Dans un premier temps, nous observons que les récepteurs FFAR1 et FFAR2 augmentent de manière significative lorsque nous ajoutons de l'acide oléique seul (MΦOA) ou les deux AG combinés (MΦOA/PA) aux macrophages (**Fig. 32A-B**). De même, l'ajout de l'acide oléique seul (MΦOA) ou des deux AG combinés (MΦOA/PA) augmentent de manière significative l'expression de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), de TLR2, de l'AhR, de l'IL-8 et de l'IL-10 alors que les cytokines pro-inflammatoires et les autres récepteurs TLRs ne montrent aucune variation à l'exception de l'IL-12 qui diminue de manière significative au sein des macrophages traités avec les deux AG combinés (OA/PA) ou encore de l'IFN γ qui diminue en présence de l'acide oléique seul (MΦOA) (**Fig. 32 et Fig. 33**). En parallèle, l'ajout d'acide palmitique seul (MΦPA) permet l'augmentation significative de l'expression de FFAR2, de TLR2, de TNF α , de l'IL-1 β et de l'IL-8 au sein des macrophages (**Fig. 32B, 32F et Fig. 33A et 33C**).

Dans un second temps, nous observons une augmentation significative de l'expression des TLRs analysés (TLR2 ; TLR4 et TLR8), des cytokines/chimiokines (TNF α ; IFN γ ; IL-1 β ; IL-6 ; IL-10 ; IL-17 ; CCL2 et CCL5) ainsi que de l'expression de l'AhR, COX2, Myd88 et de NF- κ B lorsque nos macrophages sont traités avec du LPS (MΦLPS) par rapport au contrôle (macrophages seuls ; MΦ) (**Fig. 32 et Fig. 33**). Dans ces conditions, nous observons une diminution significative de l'expression des cytokines IL-12 et IL-18 (**Fig. 33G et 33I**). De plus, nous observons que les macrophages stimulés avec du LPS et traités avec l'acide oléique seul (MΦLPSOA), l'acide palmitique seul (MΦLPSPA) ou les deux AG combinés (MΦLPSOA/PA) montrent une augmentation significative de l'expression de FFAR3 alors que l'expression de FFAR2 augmente uniquement en présence de l'acide oléique seul (MΦLPSOA) (**Fig. 32B-C**). Tandis que l'expression de FFAR1 des macrophages stimulés par LPS ne semble pas être affectée par un traitement avec ces AG utilisés individuellement ou de façon combinée (MΦLPSOA ; MΦLPSPA ; MΦLPSOA/PA)

(Fig. 32A). De même, nous remarquons une augmentation significative de l'expression dans le cas de l'AhR pour les macrophages stimulés par LPS et traités avec l'acide oléique seul (MΦLPSOA) ou combiné avec l'acide palmitique (MΦLPSOA/PA) par rapport aux macrophages stimulés uniquement par LPS (MΦLPS) **(Fig. 32I)**. A l'inverse, les macrophages qui sont exposés au LPS et traités avec l'acide palmitique seul (MΦLPSPA) montrent une augmentation significative de l'expression de l'IFN γ , de l'IL-17 ainsi qu'une tendance similaire pour les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-8 **(Fig. 33A-B, 33E et 33H)**. En parallèle, les macrophages stimulés par LPS et traités avec les deux AG combinés (MΦLPSOA/PA) montrent une diminution significative de l'expression de COX-2, de TNF α , de l'IL-6, de l'IL-12 ainsi que des chimiokines CCL2 et CCL5 par rapport aux macrophages stimulés uniquement par LPS (MΦLPS) **(Fig. 32E et Fig. 33A, 33D, 33G et 33J-K)**.

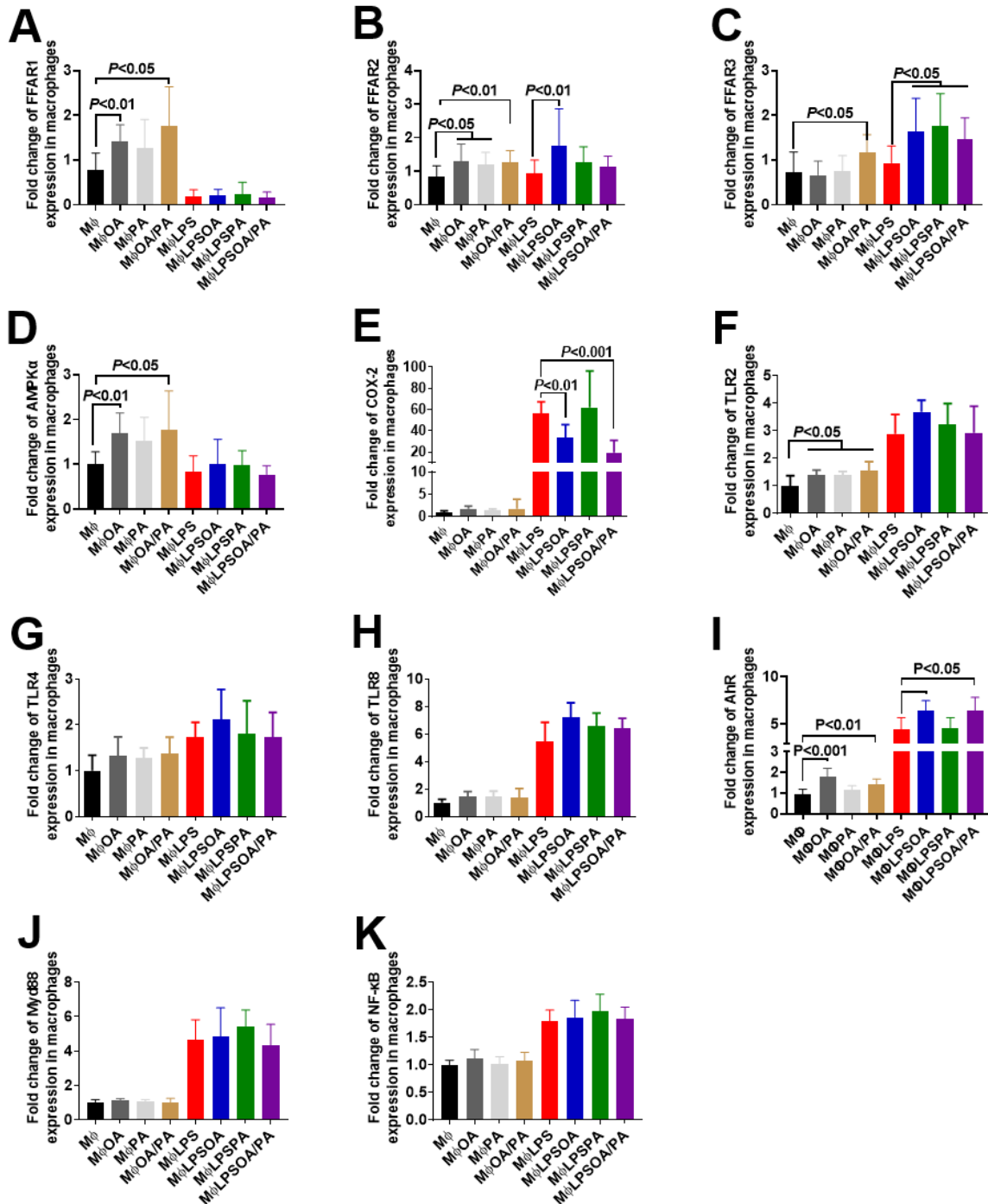


Figure 32 : Expression des récepteurs et médiateurs inflammatoires exprimés dans les macrophages exposés à du LPS et traités par les acides gras. (A-K) Niveaux d'expression relative des ARNm de FFAR1, FFAR2, FFAR3, AMPK α , COX-2, TLR2, TLR4, TLR8, AhR, Myd88, NF- κ B, respectivement dans les macrophages. M Φ représente un groupe contrôle (macrophages seuls) ; M Φ OA, M Φ PA et M Φ OA/PA correspondent à des macrophages traités avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux AG combinés à 25 μ g/mL, respectivement. M Φ LPS représente un contrôle positif (macrophages exposés au lipopolysaccharide). M Φ LPSOA, M Φ LPSPA et M Φ LPSOA/PA correspondent à des macrophages exposés au LPS et traités avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux AG combinés à 25 μ g/mL, respectivement. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

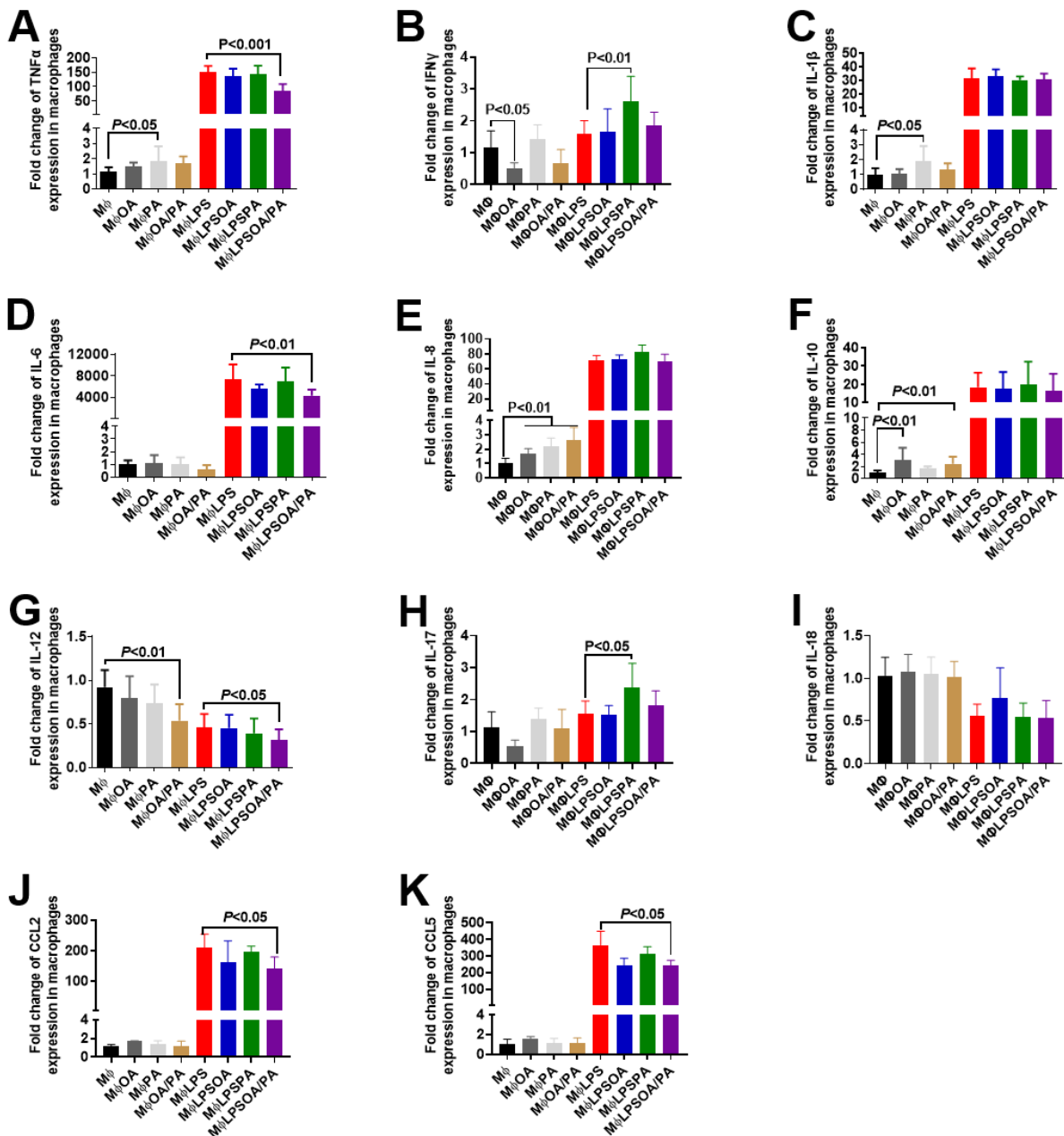


Figure 33 : Expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires exprimées dans les macrophages exposés à du LPS et traités par les acides gras. (A-K) Niveaux d'expression relative des ARNm de TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, CCL2 et CCL5, respectivement dans les macrophages. M Φ représente un groupe contrôle (macrophages seuls) ; M Φ OA, M Φ PA et M Φ OA/PA correspondent à des macrophages traités avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux AG combinés à 25 μ g/mL, respectivement. M Φ LPS représente un contrôle positif (macrophages exposés au lipopolysaccharide). M Φ LPSOA, M Φ LPSPA et M Φ LPSOA/PA correspondent à des macrophages exposés au LPS et traités avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux AG combinés à 25 μ g/mL, respectivement. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

9. Effet des acides gras sur les taux protéiques de TNF α , d'IL-6 et d'IL-1 β sécrétés par les macrophages

En relation avec les données précédentes, nous avons traité les macrophages dans les mêmes conditions que le chapitre précédent. Ces macrophages ont été

simultanément traités par LPS et AG et ce pendant 16h. La sécrétion protéique des cytokines pro-inflammatoires a été ensuite mesurée (**Figure 34**). Ainsi, nous observons une augmentation significative des taux protéiques sécrétés de TNF α , d'IL-6 et d'IL-1 β lorsque les macrophages ont été stimulés par du LPS (**Fig. 34A-C**). De plus, nous remarquons une diminution significative des taux protéiques de cytokines de TNF α et d'IL-6 sécrétés lorsque les macrophages exposés au LPS sont traités avec les AG combinés (M Φ LPSOA/PA) par rapport au contrôle positif (M Φ LPS) (**Fig. 34A-B**). A contrario, dans ces mêmes conditions, aucune modification dans la sécrétion de l'IL-1 β n'a été observée (**Fig. 34C**).

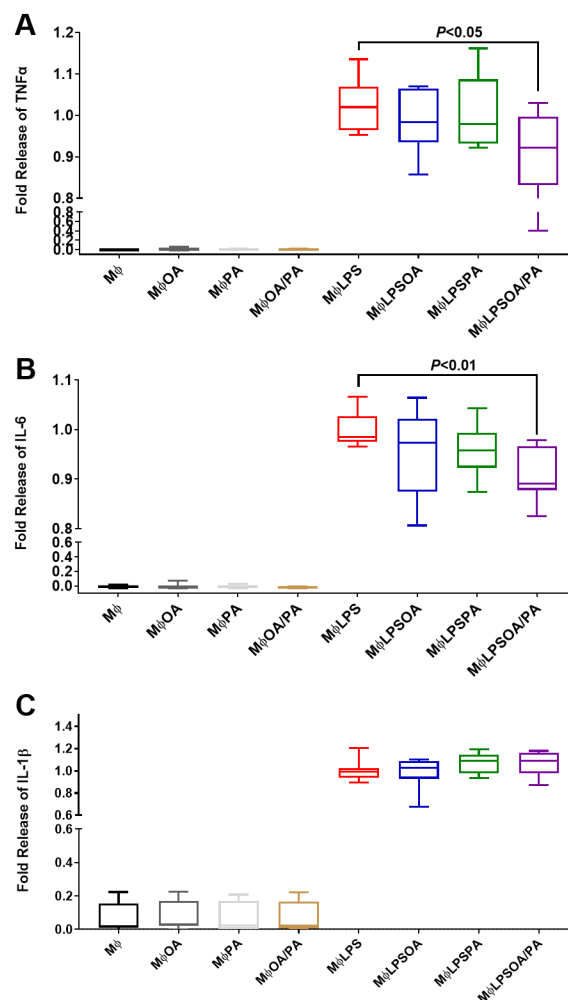


Figure 34 : Effet des acides gras sur les niveaux protéiques de TNF α , d'IL-6 et d'IL-1 β sécrétés par les macrophages exposés ou non à du LPS. (A) Libération de TNF α dans les macrophages. (B) Libération de l'IL-6 dans les macrophages. (C) Libération de l'IL-1 β dans les macrophages. M Φ représente un groupe témoin (macrophages seuls) ; M Φ OA, M Φ PA et M Φ OA/PA correspondent à des macrophages traités avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux AG combinés à 25 μ g/mL, respectivement. M Φ LPS représente un contrôle positif (macrophages exposés au lipopolysaccharide). M Φ LPSOA, M Φ LPSPA et M Φ LPSOA/PA correspondent à des macrophages exposés au LPS et traités avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux AG combinés à 25 μ g/mL, respectivement. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

10. Effet des acides gras sur l'interaction entre *C. glabrata* et les cellules épithéliales

En parallèle, nous avons exploré la possibilité que ces AG puissent avoir un effet sur la capacité d'adhérence de *C. glabrata* sur des cellules Caco-2 (**Figure 35**). Une co-incubation de 2h de *C. glabrata*-cellules Caco-2 d'une part, de *C. glabrata*-cellules Caco-2-AG d'autre part a été effectuée. Dans ce dernier cas, les cellules Caco-2 sont d'abord exposées aux AG (individuellement ou combinés) avant d'y ajouter *C. glabrata*. Nos résultats montrent que les AG (individuellement ou combinés) sont capables d'altérer la capacité d'adhérence de *C. glabrata* sur les cellules intestinales.

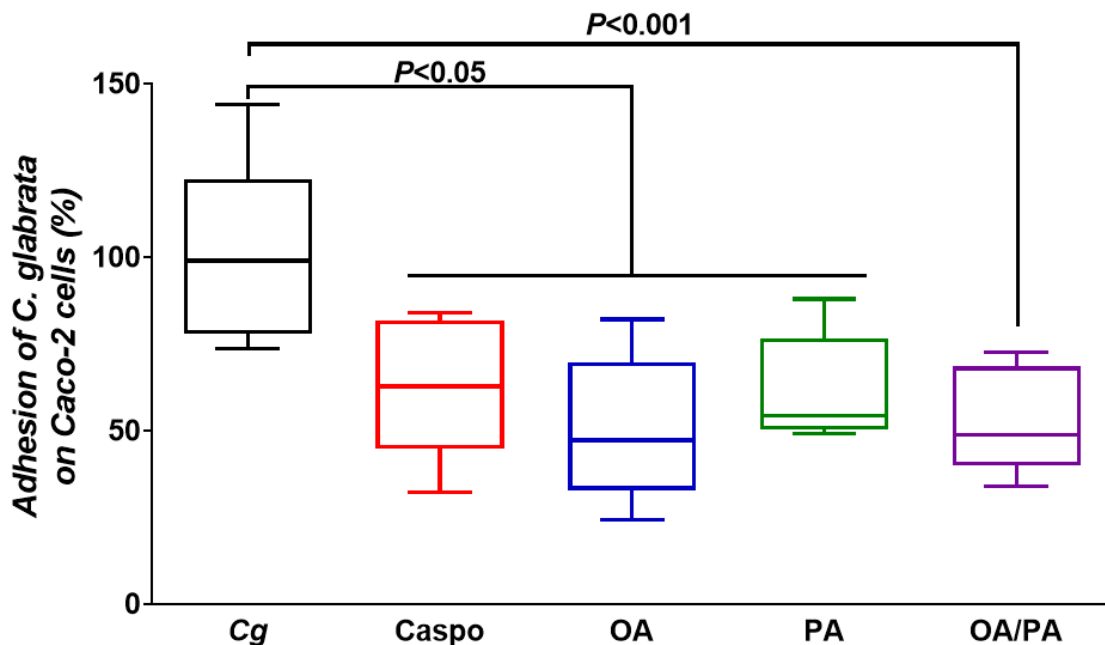


Figure 35 : Effet des acides gras sur la capacité d'adhérence de *C. glabrata* sur les cellules épithéliales Caco-2. Cg correspond à un contrôle (cellules Caco-2 exposées à *C. glabrata*). Caspo représente un contrôle standard (cellules Caco-2 challengées avec *C. glabrata* et traitées avec de la caspofungine). OA, PA et OA/PA correspondent à des cellules Caco-2 challengées par du *C. glabrata* et traitées avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux AG combinés à 25 µg/mL, respectivement. Les résultats ont été obtenus à partir de deux expériences indépendantes.

B) Détermination des propriétés antifongiques des acides gras

Après extraction, caractérisation et détermination des propriétés anti-inflammatoires des AG, nous avons également cherché à déterminer si les AG (OA et PA) possèdent des propriétés antifongiques sur *C. albicans* ou *C. glabrata*.

1. Rôle des acides gras sur la viabilité de *Candida spp.*

Il est clairement établi que *B. thetaiotaomicron* et *L. johnsonii* sont douées d'activités enzymatiques de type chitinase et mannosidase qui ont une activité lytique sur la paroi fongique, mais la question additionnelle que nous nous sommes posée était de savoir si les AG issus de l'interaction de ces bactéries avec des cellules épithéliales de côlon, ont également un effet sur la viabilité de *Candida* comparativement à l'effet inhibiteur exercé par la caspofungine. Pour répondre à cette question, nous avons testé la viabilité des *Candida* en présence d'un panel de concentrations allant de 10 à 250 µg/mL d'AG utilisé individuellement ou de façon combinée (**Figure 36A-F**). Ainsi, à T0 de la co-incubation entre les AG et *C. albicans*, nous n'observons aucune variation de la bioluminescence exprimée par les *C. albicans* traités avec les AG (OA ; PA ; OA/PA) pour les diverses concentrations effectuées (**Fig. 36A**). A 60 minutes de co-incubation (**Fig. 36B**), nous observons une diminution significative de la bioluminescence émise par *C. albicans* en présence des diverses concentrations en AG (OA ; PA ; OA/PA). Cependant, après 120 minutes de co-incubation (**Fig. 36C**), nous observons que cette diminution significative de la bioluminescence de *C. albicans*, n'est encore effective que dans le cas de l'acide oléique seul (OA) ou en présence des deux AG combinés (OA/PA) suggérant un effet plus marqué pour l'acide oléique seul (OA) ou combiné avec le PA.

Faute de disponibilité de *C. glabrata* bioluminescente, la viabilité fongique a été évaluée par culture sur boîte de Pétri. Les résultats obtenus après diverses co-incubations en présence des AG individuellement ou de façon combinée à une concentration allant de 25 à 250 µg/mL (**Fig. 36D-F**) montrent une diminution significative du nombre de UFC après 60 et 120 minutes de co-incubation (**Fig. 36E-F**).

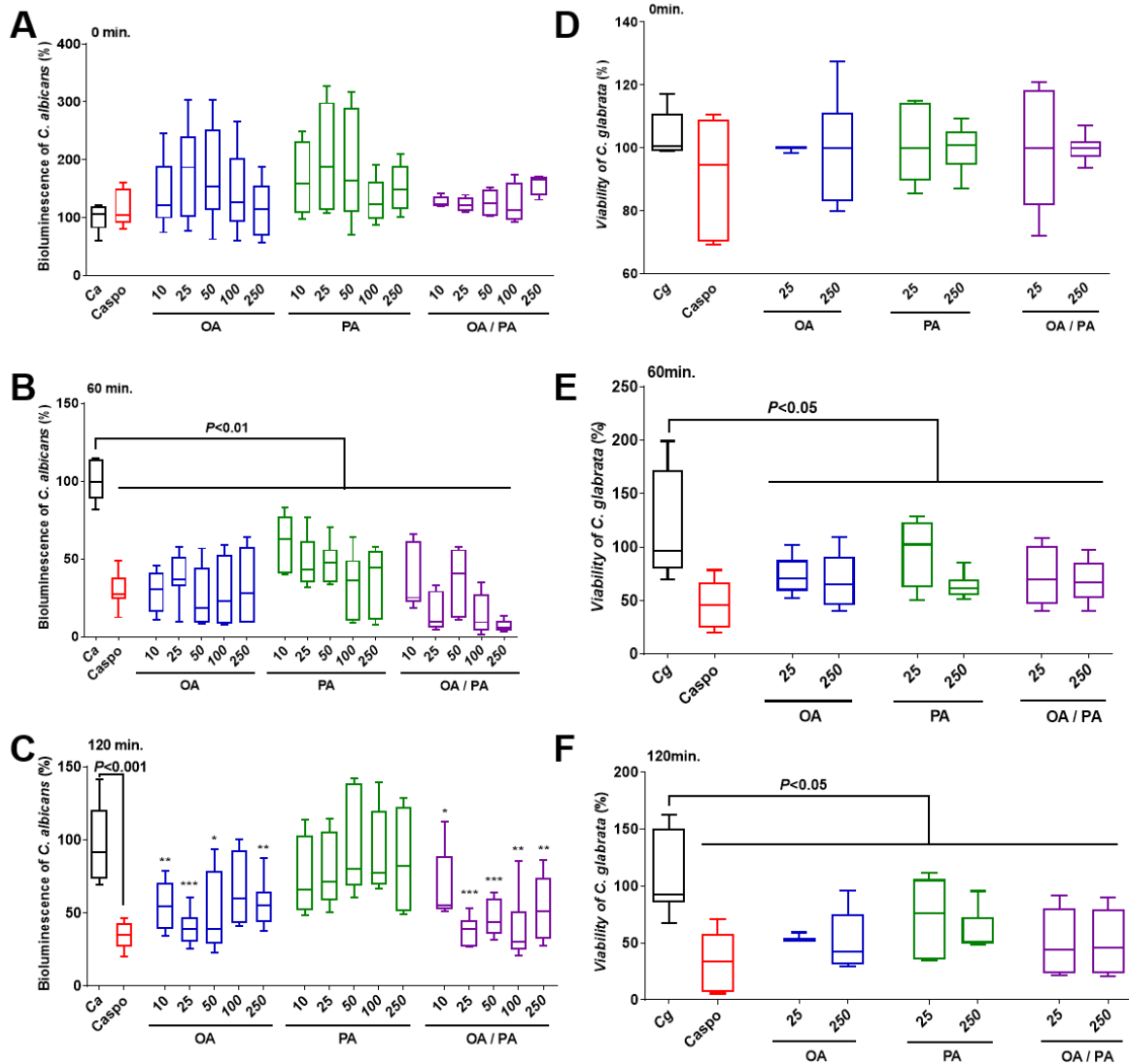


Figure 36 : Effet des acides gras sur la viabilité de *Candida* spp. (A-C) Bioluminescence de *C. albicans* traitée avec OA, PA, OA/PA à une concentration de 10, 25, 50, 100, 250 µg/mL après 0, 60 et 120 minutes de co-incubation. * $P < 0,05$ vs *C. albicans* ; ** $P < 0,01$ vs *C. albicans* ; *** $P < 0,001$ vs *C. albicans*. (D-F) Viabilité de *C. glabrata* en présence d'OA, PA ou OA/PA à une concentration de 25 ou 250 µg/mL après 0, 60 et 120 minutes, via un test sur plaque de culture. Cg représente un contrôle. Caspo représente un contrôle standard (*C. glabrata* traité par de la caspofungine). OA, PA et OA/PA correspondent à *C. glabrata* traités avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux acides gras combinés, respectivement. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

2. Rôle des acides gras sur le biofilm de *Candida* spp.

Nous avons également étudié l'effet des AG sur la formation du biofilm par deux principales espèces pathogènes : *C. albicans* et *C. glabrata*. Pour cela, nous avons utilisé les AG à une concentration de 25 µg/mL, concentration optimale pour apprécier les effets anti-inflammatoires comme défini précédemment (**Figure 37**). Dans le cas de *C. glabrata*, après 4h, 8h et 24h de co-incubation des cellules fongiques avec les AG (OA seul, PA seul ou les deux combinés). Nous observons

une diminution significative de la formation du biofilm lorsque *C. glabrata* est co-incubée avec les AG avec un effet optimal à 24h notamment pour l'acide oléique (**Fig. 37A-C**). Tandis que dans le cas de *C. albicans*, nous n'observons pas de diminution significative de la formation du biofilm après 4h de co-inubcation des levures avec les AG (OA ; PA ; OA/PA) (**Fig. 37D**), alors que cette diminution était significativement notable après 8h et 24h de co-incubation des levures avec l'acide oléique seul (OA), l'acide palmitique seul (PA) ou avec les deux AG combinés (OA/PA) (**Fig. 37E-F**).

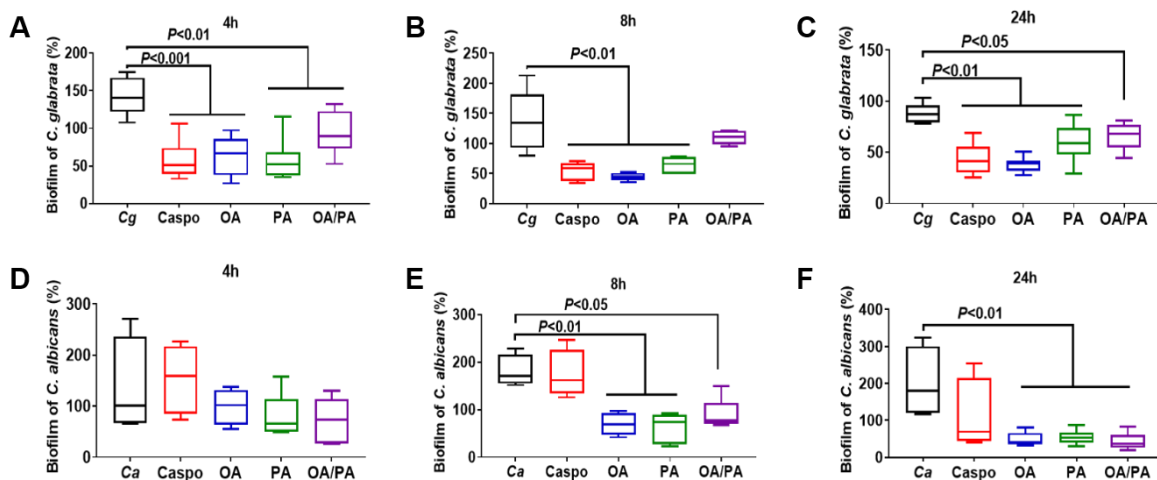


Figure 37 : Effet des acides gras sur la production des biofilms de *Candida spp.* (A-C) Co-culture de *C. glabrata* et des AG (OA, PA, OA/PA) après 4 h, 8 h et 24 h. (D-F) Co-culture de *C. albicans* et des AG (OA, PA, OA/PA) après 4, 8 et 24 h. Cg et Ca représentent les témoins (formation d'un biofilm en condition standard). Caspo représente un contrôle d'inhibition du biofilm (Co-culture de *C. glabrata* ou *C. albicans* avec de la Caspofungine). OA, PA et OA/PA correspondent à *C. glabrata* ou *C. albicans* stimulés avec de l'acide oléique seul, de l'acide palmitique seul ou les deux AG combinés, respectivement. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

C) Rôle des acides gras sur l'élimination de *C. glabrata* et sur la modulation de l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS

L'effet des AG sur l'élimination de *C. glabrata* ainsi que sur l'inflammation intestinale a été évalué au moyen d'un modèle murin de colite DSS-induite. Ainsi, nous avons constitué 7 groupes d'animaux :

- un groupe contrôle (CTL, eau),
- un groupe contrôle ayant reçu du *C. glabrata* par gavage (Cg),
- un groupe contrôle ayant reçu des AG (FA),
- un groupe avec une colite DSS-induite (D, contrôle de l'inflammation intestinale),
- un groupe avec une colite DSS-induite ayant reçu du *C. glabrata* par gavage (DCg),
- un groupe avec une colite DSS-induite ayant reçu des AG (DFA),
- un groupe avec une colite DSS-induite ayant reçu du *C. glabrata* par gavage et des AG (DCgFA).

1. Évaluation des effets des AG sur les paramètres inflammatoires à travers un modèle murin de colite chimio-induite par DSS

Tout d'abord, nous avons étudié l'effet des AG sur divers paramètres inflammatoires comme la variation de la masse corporelle, du score clinique ou encore du score histologique basé sur nos observations histologiques (**Figure 38**). Comme attendu, les groupes CTL, FA et Cg ne montrent aucun signe d'inflammation intestinale : la masse corporelle (**Fig. 38A**) et le score clinique (**Fig. 38B**) varient très peu au cours du temps et le score histologique est resté faible et constant (**Fig. 38C**). Par ailleurs, l'examen microscopique ne révèle ni infiltrats leucocytaires, ni œdèmes, ni lésions épithéliales (**Fig. 38D**). A l'inverse, les groupes d'animaux ayant reçu le DSS (D et DCg) montrent une diminution significative de la masse corporelle à partir du 12^{ème} jour (**Fig. 38A**). Cette diminution de l'ordre de 10 à 15% chez les animaux sous DSS (D et DCg) contraste avec celle retrouvée chez les animaux sous DSS et traités par les AG (DFA et DCgFA). Le score clinique quant à lui, diminue de manière significative pour les groupes sous DSS et traités avec les AG (DFA et DCgFA) par rapport aux groupes sous DSS (D et DCg) (**Fig. 38B**). De même, le score

histologique des groupes sous DSS et traités avec les AG (DFA et DCgFA) diminue significativement par rapport aux groupes sous DSS (D et DCg) (**Fig. 38C**). Ces données convergent vers nos observations histologiques montrant des infiltrats leucocytaires, des œdèmes et des lésions épithéliales bien plus prononcés dans les deux groupes sous DSS (D et DCg) par rapport à l'ensemble des autres groupes (**Fig. 38D**).

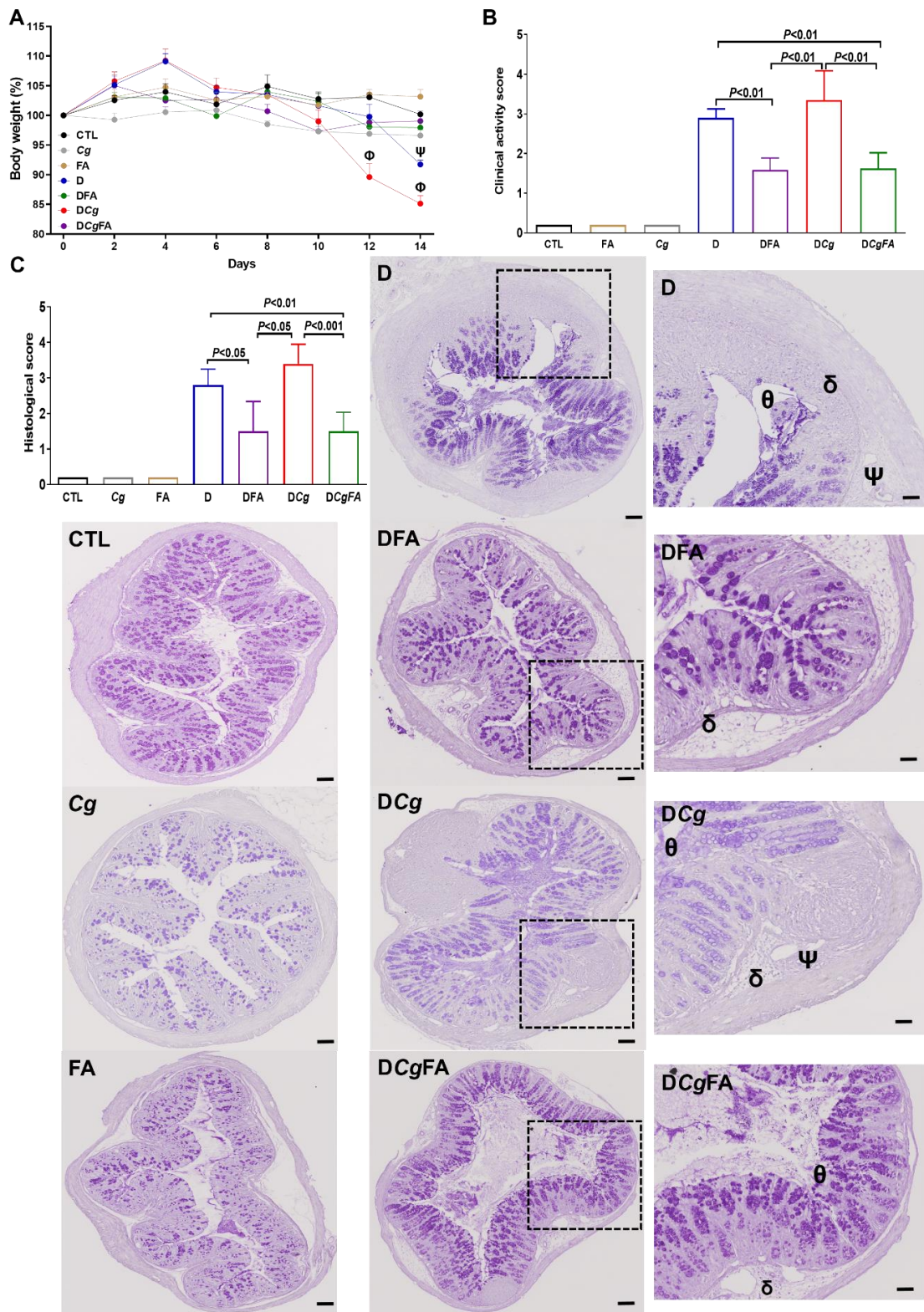


Figure 38 : Effets des acides gras sur les paramètres inflammatoires dans un modèle de colite chimio-induite par DSS. (A) Masse corporelle des souris au cours de l'expérimentation (en %). $\Phi=****P<0,0001$, DCg vs. DCgFA ; $\Psi=*P<0,05$, D vs. DFA. Les groupes témoins correspondent à CTL (eau), Cg (*C. glabrata*) et FA (acides oléique/palmitique). Les groupes expérimentaux correspondent à D (DSS), DCg (DSS et *C. glabrata*), DFA (DSS + acides oléique/palmitique) et DCgFA (DSS + *C. glabrata* + acides oléique/palmitique). (B) Score clinique des souris sous colite chimio-induite par DSS au cours de l'expérimentation. (C) Score histologique de l'inflammation. (D) Analyse histologique des sections de côlon provenant de souris sous colite chimio-induite par DSS.

Les panneaux (CTL), (Cg) et (FA) représentent des sections de côlon de souris ayant reçu de l'eau (CTL), *C. glabrata* ou les AG (oléique/palmitique), respectivement. Le panneau (D) représente des sections de côlon de souris recevant du DSS. Le panneau (DCg) représente des sections de côlon de souris recevant du DSS + *C. glabrata*. Les panneaux (DFA) correspondent à des sections de côlon de souris recevant du DSS + acides oléique/palmitique. Les panneaux (DCgFA) correspondent à des sections de côlon de souris recevant du DSS + *C. glabrata* + acides oléique/palmitique. Les sections des souris sous colite DSS-induite montrent d'importants infiltrats de cellules inflammatoires (δ), une destruction tissulaire (θ) et des œdèmes (Ψ) dans la muqueuse ou la sous-muqueuse des structures de la paroi du côlon. Les données sont issues de 6 souris par groupe. Les barres d'échelle représentent 50 μm (panneaux de gauche) et 25 μm (panneaux de droite présentant les zooms des conditions D, DFA, DCg et DCgFA).

2. Caractérisation de la charge fongique dans les selles et les organes des animaux sous DSS et recevant du *C. glabrata* seul ou en présence d'un traitement par AG

La charge fongique a été déterminée dans tous les groupes d'animaux ayant reçu les levures et dans le groupe contrôle. Cette charge a été évaluée tous les 2 jours dans les selles puis dans les organes (côlon, cæcum et estomac) le jour du sacrifice afin d'évaluer si les AG détiennent des propriétés antifongiques permettant l'élimination de *C. glabrata* (**Figure 39**). Nous observons une diminution significative de la charge fongique entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour pour l'ensemble des groupes (Cg, DCg et DCgAG). Cette diminution continue jusqu'au 6^{ème} jour où l'on observe une élimination totale de *C. glabrata* notamment dans le cas du groupe Cg. Dans le cas du groupe DCg, nous observons une reprise de la colonisation et une augmentation de la charge fongique à partir du 12^{ème} jour et ce, de manière significative par rapport aux groupes CTL, Cg et au groupe traité avec les AG (DCgAG) (**Fig. 39A**). En parallèle, nous remarquons également une colonisation significative au sein de l'estomac pour le groupe DCg par rapport à l'ensemble des autres groupes (**Fig. 39B**).

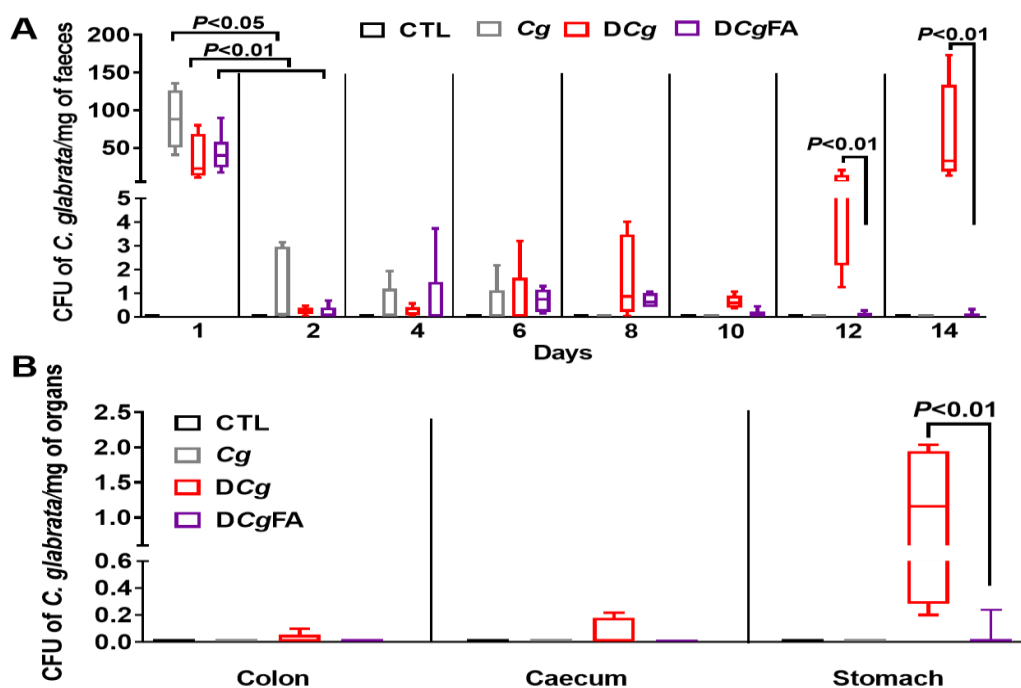


Figure 39 : Effet des acides gras sur l'élimination de *C. glabrata* dans le tractus digestif lors d'une colite chimio-induite par DSS. Les quatre groupes sont constitués du contrôle (CTL ; eau), *C. glabrata* (Cg), DSS + *C. glabrata* (DCg) et DSS + *C. glabrata* + AG (DCgFA). (A) Détermination du nombre de colonies viables de *C. glabrata* récupérées dans les selles. (B) Nombre de colonies viables de *C. glabrata* récupérées dans l'estomac, le caecum et le côlon. Les données sont issues de 6 souris par groupe.

3. Détermination de la charge bactérienne dans les selles de souris sous colite DSS-induite et recevant du *C. glabrata* seul ou en présence d'un traitement par AG

La charge bactérienne a été analysée à partir des selles, tous les deux jours, pour l'ensemble des groupes (**Figure 40**). La comparaison des groupes D et DCg par rapport aux groupes contrôles, montre que les populations en *E. coli* et en *E. faecalis* augmentent de manière significative à partir du 10^{ème} et 12^{ème} jour du suivi des animaux, respectivement, et ce jusqu'au jour du sacrifice (**Fig. 40A-B**). Comparé aux groupes contrôles D et DCg, nous notons une diminution significative de ces populations bactériennes au sein des groupes de souris sous DSS et traités par AG (DAG et DCgAG).

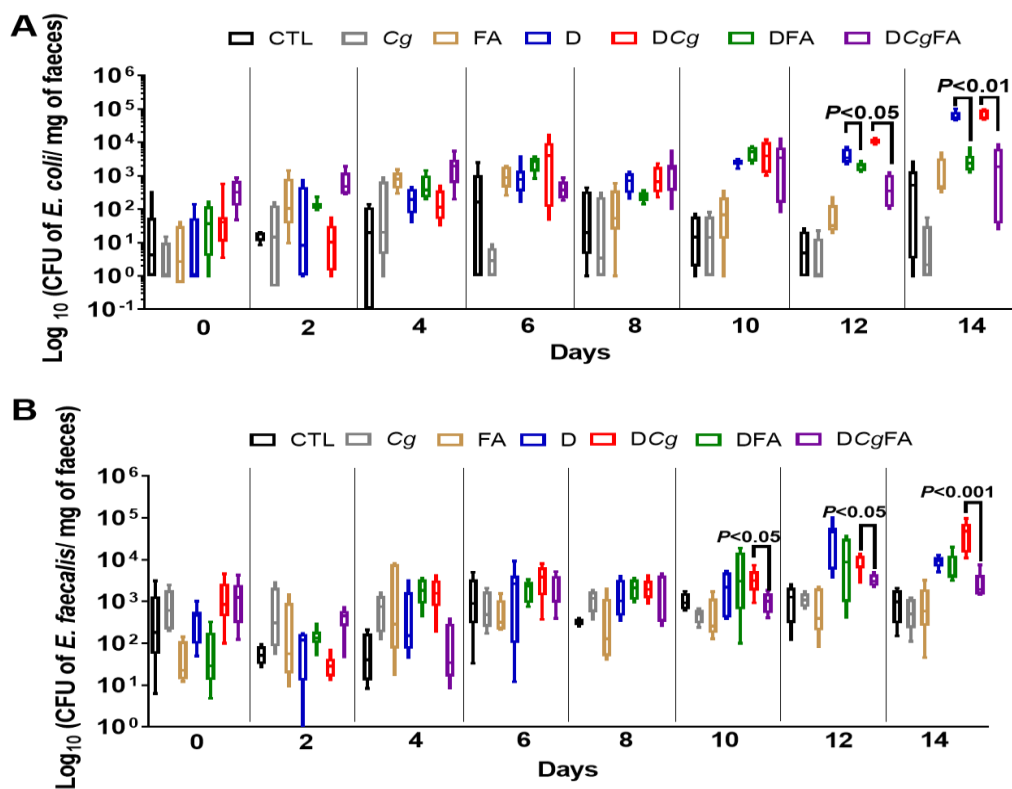


Figure 40 : Détermination des populations bactériennes fécales viables après traitement par les acides gras chez des souris atteintes de colite chimio-induite par DSS. Les sept groupes sont constitués du contrôle (CTL ; eau), *C. glabrata* (Cg), AG (FA), DSS (D), DSS + AG (DFA), DSS + *C. glabrata* (DCg), DSS + *C. glabrata* + AG (DCgFA). (A) Détermination du nombre d'unité formant colonie (UFC) de *E. coli* récupérées dans les échantillons de selles. (B) Nombre d'UFC de *E. faecalis* récupérées dans les selles. La charge bactérienne à l'état basal (souris sans traitement) est déterminée à J0 avant que les souris reçoivent le DSS, *C. glabrata* ou un traitement par les AG. Les données sont issues de 6 souris par groupe.

4. Effets des acides gras sur la modulation de l'expression des récepteurs de l'immunité, des facteurs de signalisation et des cytokines inflammatoires exprimés dans le côlon des souris avec colite chimio-induite par DSS

A la fin de l'expérimentation, les souris ont été sacrifiées et une partie du côlon a été utilisée pour analyser l'expression de certains récepteurs, médiateurs et cytokines intestinaux (**Figure 41**). Ainsi, le groupe CTL représente le taux basal de leur expression dans un environnement sain. Les groupes Cg et FA représentent aussi le taux basal de l'expression dans un environnement sain en présence de *C. glabrata* ou des AG, respectivement. Ainsi, dans les groupes sous DSS (D et DCg), une augmentation significative de l'expression de TLR8, de la dectine-1, de Myd88, de FOXP3 d'une part et des cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α et IFN γ) d'autre part

ont été observées comparativement aux groupes contrôles (CTL, Cg et FA). Cependant, les souris sous DSS traitées avec les AG (DFA et DCgFA) montrent à la fois une diminution significative de l'expression du récepteur TLR8, du facteur de signalisation Myd88 et une augmentation significative de la dectine-1, de l'AhR et de la cytokine IL-10 par rapport aux groupes sous DSS (D et DCg) (**Fig. 41A-D et 41F**). En parallèle, les souris sous DSS colonisées par *C. glabrata* et recevant des AG (DCgFA) montrent une augmentation significative de l'expression de FOXP3 ainsi qu'une diminution significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α et IFN γ) par rapport aux groupes sous DSS colonisés par *C. glabrata* (DCg) (**Fig. 41E et 41G-J**). De plus, les souris sous DSS et recevant des AG (DFA) affichent les mêmes tendances par rapport au groupe sous inflammation (D) (**Fig. 41E et 41G-J**).

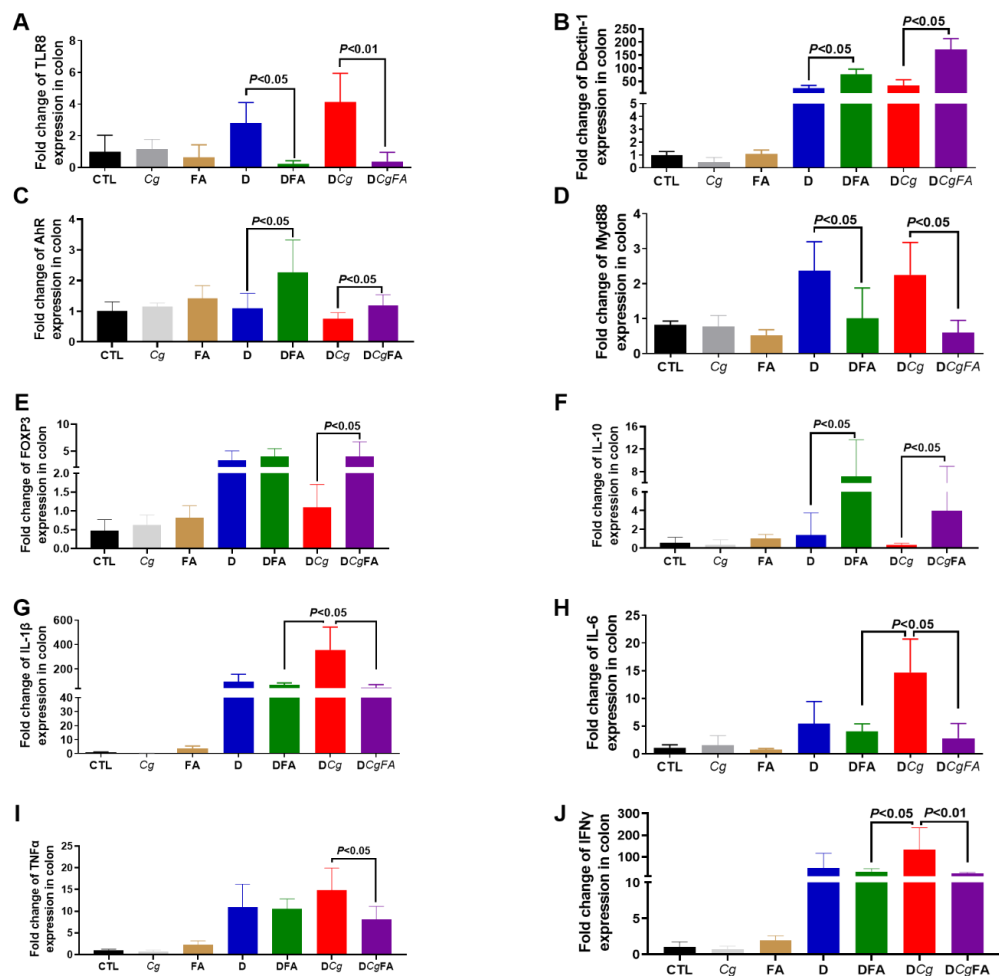


Figure 41 : Expression des récepteurs, des médiateurs et des cytokines dans le côlon des souris sous colite chimio-induite par DSS et traitées avec les acides gras. (A-J) Niveaux d'expression relative des ARNm de TLR8, la Dectine-1, AhR, Myd88, FOXP3, IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF α et IFN γ dans le côlon des souris. Les données sont issues de 6 souris par groupe.

Discussion

Les MICI sont des maladies multifactorielles qui se caractérisent par une prédisposition génétique mais également par des facteurs environnementaux et immunologiques qui influencent le microbiote intestinal^{36,52,492}. Ce microbiote peut alors subir des altérations qui joueraient un rôle crucial dans de nombreuses maladies y compris les MICI^{17,104,493}. D'ailleurs, les patients atteints de MICI montrent une diminution de la biodiversité de ce microbiote intestinal, en particulier pour les espèces anaérobies strictes des phyla Firmicutes et Actinobacteria⁴⁹⁴. Il a été également rapporté qu'une réduction des *Bacteroides spp.* apparaît dans les MICI, surtout au cours de la phase active de la maladie⁴⁹⁵. Il faut également souligner que ce microbiote intestinal est essentiel pour la santé de l'hôte ainsi que pour la maturation du système immunitaire. De plus, ce microbiote est aussi capable de synthétiser des métabolites microbiens, comme les AGCC produits par la fermentation bactérienne, qui participent au maintien de l'homéostasie intestinale⁴⁹⁶.

Par ailleurs, sous certaines conditions physiopathologiques, notamment engendrées par l'inflammation intestinale, il a été démontré que *C. albicans* est capable de coloniser de manière fréquente et intense le tractus digestif, et qu'à son tour la colonisation par ces levures amène à l'aggravation de la colite intestinale^{113,114}. De ce fait, il est maintenant bien établi que l'inflammation intestinale et la colonisation intense par *C. albicans* constituent des facteurs importants à l'origine d'une dysbiose bactérienne^{15,114} qui elle-même, de par ces altérations, crée une boucle d'amplification du processus inflammatoire^{17,102}. Parmi ces altérations bactériennes, nous retrouvons une prolifération excessive des pathogènes opportunistes tels que les entérobactéries (*E. coli*) et/ou *E. faecalis*. Cette prolifération se fait au détriment de certaines bactéries anaérobies, telles que *L. johnsonii* et *B. thetaiotaomicron*, qui présentent un rôle bénéfique dans la prévention de l'inflammation intestinale^{189,497}. De même, une corrélation inverse semble exister entre les populations de ces bactéries (*L. johnsonii* et *B. thetaiotaomicron*) et la colonisation par les levures du genre *Candida*¹⁵. Nous avons montré au travers du modèle de colite chimio-induite par DSS, que ces bactéries sont potentiellement bénéfiques et préventives contre les colites ulcéraives aiguës ainsi que dans

l'élimination de *C. glabrata*¹⁹. Des approches *in vitro* ont également permis de mettre en évidence que ces deux bactéries sont capables d'inhiber la croissance de *C. glabrata* via leurs activités enzymatiques de type mannosidase ou chitinase¹⁹. Une autre étude a aussi mis en évidence le rôle des *Lactobacilles*, dans l'inhibition de la colonisation muqueuse par *C. albicans* suggérant un rôle de ces probiotiques dans la prévention des candidoses muqueuses²⁰⁰. De surcroît, nos travaux précédents ont pu montrer que la restauration de la flore bactérienne, dont notamment *L. johnsonii* et *B. thetaiotaomicron*, atténue le développement de la colite chez la souris grâce à la modulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des TLRs¹⁹.

Dans ce contexte, nous avons évalué la capacité de la co-incubation de ces bactéries avec des cellules épithéliales de côlon murin à libérer des AG impliqués dans la modulation de l'inflammation intestinale. Après une première étape d'analyse par GC/MS, nous avons pu mettre en évidence la présence de deux AG dans le surnageant des cultures : l'acide oléique (18 :1) et l'acide palmitique (16 :0). Il est essentiel de souligner que l'acide palmitique est un AGCL saturé connu pour son rôle dans la modulation du système immunitaire. En effet, cet AGCL est capable d'induire l'activation des monocytes et de stimuler les réponses pro-inflammatoires des cellules immunitaires humaines^{498,499}. A l'inverse l'acide oléique, qui est un AGCL insaturé, présente quant à lui des propriétés anti-inflammatoires^{498,500,501}.

Dans la présente étude, nous avons mis en place un modèle *in vitro* de type transwell impliquant des cellules Caco-2 exposées à 1,5 % de DSS. Nous avons pu montrer que ces cellules étaient capables de sécréter certaines cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-8 ou encore CCL2) en réaction au DSS. Nous avons aussi montré une augmentation de la migration des macrophages à travers une monocouche de cellules Caco-2 prétraitée par DSS, vers des cellules fongiques contenues dans le compartiment opposé à celui des macrophages. L'établissement de ce modèle constitue un outil original pour évaluer les propriétés anti-inflammatoires de ces AGCL. Ainsi, contrairement à l'acide palmitique, l'acide oléique ou la combinaison des deux AGCL induit une diminution significative de l'expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-8 et CCL2) par les cellules Caco-2 exposées à du DSS. De même, les deux AGCL combinés étaient capables de réduire de manière significative la migration des macrophages vers *C. albicans* en présence de la monocouche de cellules Caco-2

prétraitées par DSS. L'ensemble de ces données révèlent que l'acide palmitique présente des propriétés biologiques différentes de l'acide oléique en termes d'activité anti-inflammatoire et de modulation des réponses médiées par les macrophages.

Dans cette même étude, nous nous sommes intéressés aux récepteurs impliqués dans la reconnaissance des AG : FFAR1, FFAR2 et FFAR3^{236,502}. Ces récepteurs jouent un rôle important pour les fonctions métaboliques et contribuent à l'homéostasie énergétique ainsi qu'à la modulation de l'inflammation⁵⁰³. Il a été montré que la signalisation FFAR1-dépendante en présence des métabolites microbiens intestinaux tels que l'acide linoléique restaure les altérations de la barrière épithéliale intestinale⁵⁰⁴. Dans le cas de FFAR2, différentes études montrent son implication dans la modulation de la réponse inflammatoire^{236,504}. Ainsi, les souris déficientes en FFAR2 présentent une réponse inflammatoire excessive lors d'une colite expérimentale. Cet effet serait en lien avec des infiltrats cellulaires impliquant de nombreuses cellules immunitaires⁵⁰⁵. Ces données sont en accord avec les résultats observés dans notre étude où nous montrons que l'ajout de l'acide oléique seul ou combiné à l'acide palmitique permet d'augmenter l'expression de FFAR1, de FFAR2, de l'AMPK et de l'IL-10 dans le modèle macrophage. De plus, il a été montré que l'altération de l'AMPK à la surface des macrophages serait associée à une production accrue des cytokines pro-inflammatoires⁵⁰⁶. De plus, Salvado *et al.* ont rapporté que l'effet bénéfique de l'OA dépend de l'activation de l'AMPK, un capteur métabolique qui module l'inflammation⁵⁰⁷. Les travaux de Finucane OM *et al.* démontrent aussi que l'acide oléique est capable d'inhiber la production d'IL-1 β induite par l'ATP *via* un mécanisme dépendant de l'AMPK dans des macrophages exposés au LPS et à l'acide palmitique⁵⁰⁸. En parallèle, nos données sur les macrophages ont permis de montrer que l'acide oléique augmente l'expression de l'IL-10. Ces propriétés anti-inflammatoires de l'acide oléique ont été également confirmées dans un modèle animal d'obésité induite⁵⁰⁹.

Les propriétés anti-inflammatoires de ces deux AGCL ont été également explorées dans la présente étude. Le modèle utilisé est celui du macrophage activé par le LPS dans lequel nous avons mesuré l'expression des cytokines inflammatoires comme TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, CCL2 ou CCL5 et l'expression de plusieurs médiateurs/récepteurs majeurs de l'inflammation (COX-2 ou AhR). Nos données mettent alors en évidence que la combinaison des deux

AGCL diminue l'expression des cytokines TNF α , IL-6, IL-12 ou encore CCL2 et CCL5. Dans ce même modèle macrophage, nous avons montré que la combinaison de ces deux AGCL est également capable de diminuer de manière significative les taux protéiques des cytokines TNF α et IL-6. Ces données sont en accord avec une étude récente sur des macrophages murins (RAW264.7 macrophage cells) qui rapporte que certains AG présentent des propriétés anti-inflammatoires. Dans cette étude, les AG notamment l'acide oléique, permettent de réguler la transcription de gènes associés au processus inflammatoire avec notamment une diminution de l'expression de TNF α et d'IL-6 ainsi qu'une diminution de la production de COX-2⁵¹⁰. Ces données sont à relier avec des études qui ont rapporté que l'augmentation des médiateurs inflammatoires tels que TNF α ou encore COX-2 participerait à la sévérité des colites chimio-induites^{511,512}.

Dans un second temps, nous avons recherché à savoir si ces deux AGCL par eux-mêmes sont capables de présenter des propriétés antifongiques. Pour cela, nous avons étudié les effets de ces derniers sur l'adhérence de *C. glabrata* aux cellules épithéliales, sur la viabilité des espèces *C. albicans* et *C. glabrata* ainsi que sur la maturation de leurs biofilms. Nous avons pu montrer que les deux AGCL diminuent significativement la viabilité et la formation des biofilms par les espèces *Candida spp.* tout comme l'adhérence de *C. glabrata* sur des cellules épithéliales. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Muthamil S *et al.* qui ont pu démontrer l'efficacité de l'acide oléique à inhiber la formation du biofilm et diminuer la virulence des espèces *Candida spp.* analysées. L'analyse protéomique montre que l'acide oléique est capable d'exercer un stress oxydatif chez la cellule fongique et que ce stress cible plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme du glucose, la production de lipases, la biosynthèse de l'ergostérol et la biosynthèse des acides aminés⁵¹³. L'étude de Prasath KG *et al.*, quant à elle a montré que comme pour l'acide oléique, l'acide palmitique est capable d'inhiber les facteurs de virulence de *Candida* tels que les activités enzymatiques lytiques ou encore la formation du biofilm⁵¹⁴.

Nous avons ensuite évalué *in vivo* le rôle anti-inflammatoire de ces deux AGCL combinés ainsi que leur capacité à éliminer *C. glabrata* dans un modèle murin de colite chimio-induite. Ainsi, l'administration orale de ces AGCL combinés permet une diminution significative des paramètres inflammatoires en termes de masse

corporelle, de score clinique et de score histologique. Ces données sont conformes à celles déjà rapportées par Buthelezj S *et al.*, démontrant des propriétés anti-inflammatoires de ces AGCL⁵¹⁵. Ces données sont corroborées dans une étude de Reddy KVK & Naidu KA, qui montre dans un modèle *in vivo* que l'acide oléique est capable d'atténuer les lésions des muqueuses avec notamment une diminution des œdèmes et de la distorsion des cryptes dans la muqueuse⁵¹⁶. Par ailleurs, nos travaux menés sur un modèle *in vivo* de colite chimio-induite ont permis de montrer que l'utilisation de ces deux AGCL combinés était associée à la réduction de l'inflammation et que celle-ci était corrélée à l'élimination de *C. glabrata* des muqueuses digestives. Nos analyses des variations des populations en *E. coli* et *E. faecalis* montrent que ces dernières diminuent significativement chez les souris traitées avec les deux AGCL combinés.

Le dernier volet *in vivo* de notre étude concerne l'évaluation de l'effet du traitement par ces deux AGCL combinés sur la régulation des récepteurs intestinaux ainsi que sur le profil cytokinique. Les souris avec colite inflammatoire et gavées avec du *C. glabrata* montrent au niveau de la muqueuse colique, une expression accrue de TLR8 et de la Dectine-1. Ces données suggèrent que l'altération du microbiote et l'inflammation intestinale conduisent à l'activation des récepteurs intestinaux *via* des pathobiontes opportunistes tels que *E. coli*, *E. faecalis* ou encore *C. glabrata*. De manière inattendue, ces mêmes souris traitées par les deux AGCL combinés montrent une augmentation de l'expression du récepteur Dectine-1 alors que l'expression du récepteur TLR8 est diminuée. En parallèle, nous avons observé que l'expression de Myd88, une molécule adaptatrice, augmente de manière significative chez les souris présentant une inflammation intestinale. Il est essentiel de souligner que Myd88 est important dans la protection de l'hôte vis-à-vis de la colite intestinale puisque des souris Myd88^{-/-} présentent une plus grande sévérité de l'inflammation intestinale comparativement à des souris contrôles⁵¹⁷. Étant donné que l'inflammation intestinale des souris sous DSS et traitées avec les deux AGCL combinés diminue, il est tout à fait concevable que le traitement par ces deux AGCL combinés puisse aboutir à une baisse de l'expression de Myd88. Cette diminution de l'expression de Myd88 corrélée à celle de TLR8 peut aussi s'expliquer par la diminution de la charge fongique ainsi que par celle de certains pathobiontes comme les populations bactériennes en *E. coli* et *E. faecalis*⁵¹⁸.

Au cours de cette étude, nous avons aussi pu montrer que les souris sous DSS traitées par les deux AGCL combinés montrent une augmentation de l'expression du récepteur AhR. Ce récepteur est bien connu pour son implication dans la toxicité de la dioxine, un contaminant environnemental pouvant affecter les personnes *via* l'alimentation⁵¹⁹. Il est également connu pour être impliqué dans de nombreux processus immunitaires et inflammatoires comme ceux retrouvés dans les maladies cardiovasculaires, la sclérose en plaques ou encore dans la dépression et l'obésité⁵²⁰⁻⁵²². Celui-ci possède d'ailleurs un rôle particulier dans la modulation des réponses inflammatoires notamment au niveau de la muqueuse intestinale⁵²³. En effet, de nombreuses cellules de l'immunité comme les macrophages, les cellules dendritiques ou encore les lymphocytes T expriment ce récepteur dont l'activation joue un rôle immunomodulateur^{519,523}. Ainsi, une étude rapporte justement que ce récepteur serait impliqué dans l'activation des cellules T reg⁵²⁴. Benson JM & Shepherd DM, ont émis l'hypothèse que l'activation de l'AhR serait capable d'atténuer l'inflammation intestinale associée à la MC. Pour conforter cette hypothèse, ils ont utilisé un modèle murin de colite sous TNBS où les souris gavées avec de la dioxine montrent une diminution des symptômes cliniques tout en diminuant les dommages tissulaires coliques. L'activation de l'AhR amène aussi à une diminution des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12 et IFN γ) et au maintien de la prolifération de la population T reg FOXP3⁺ au sein des tissus intestinaux⁵¹⁹. De même, une récente étude a montré que certaines bactéries intestinales comme les *Lactobacillus* ainsi que leurs métabolites seraient capables d'activer les réponses médiées par l'AhR⁵²⁵. La synthèse de nos données acquises dans cette étude faisant intervenir un modèle murin de colite chimio-induite, montre que le traitement par les deux AGCL combinés induit une augmentation significative de l'expression de l'AhR, de FOXP3 et de l'IL-10 alors que l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α et IFN γ) diminue par rapport aux souris non traitées par ces deux AGCL combinés. Dans cette étude, nous avons aussi pu montrer dans le modèle murin que l'augmentation de l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-6 est associée au développement de l'inflammation et à la colonisation par *C. glabrata* au niveau intestinal. Dans ces mêmes conditions, le traitement par les deux AGCL combinés se caractérise par une atténuation de l'inflammation intestinale, de la charge fongique et de la charge bactérienne associées à la diminution des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , l'IFN γ ou encore l'IL-1 β et l'IL-6.

Conclusions et perspectives

Dans un modèle *ex-vivo*, nous avons montré que les interactions entre *L. johnsonii*, *B. thetaiotaomicron* et les cellules épithéliales colique aboutissent à la sécrétion de deux acides gras majoritaires : l'acide oléique et l'acide palmitique. A l'inverse de l'acide palmitique, l'acide oléique seul ou combiné avec l'acide palmitique possède des propriétés anti-inflammatoires notables en réduisant notamment l'expression de plusieurs cytokines/chimiokines pro-inflammatoires démontrées par un modèle cellulaire de cellules Caco-2 exposées à du DSS. Ces propriétés ont été également démontrées dans un autre modèle cellulaire impliquant des macrophages. Dans ce dernier modèle, les propriétés biologiques de l'acide oléique, seul ou combiné avec l'acide palmitique, impliqueraient une reconnaissance par les récepteurs FFARs et AhR qui aboutirait à l'augmentation de l'IL-10 et une diminution de COX-2, de TNF α et de l'IL-6. Nos résultats mettent également en évidence les propriétés antifongiques des AGCL avec notamment des propriétés inhibitrices d'adhérence aux cellules, sur la formation du biofilm de *Candida spp* et sur la viabilité fongique. L'ensemble des propriétés anti-inflammatoires et antifongiques exercé par les deux AGCL combinés a été confirmé dans un modèle murin de colite chimio-induite où l'administration orale de ces deux AGCL combinés atténue l'augmentation des paramètres inflammatoires tout en réduisant les populations bactériennes connues pour être des pathobiontes comme *E. coli* et *E. faecalis* ainsi qu'en participant à l'élimination de *C. glabrata*. (**Figure 42**).

Concernant nos perspectives à court termes, nous avons entrepris des travaux sur les relations structure/activité des AGCL notamment en étudiant l'effet(s) de certaine(s) substitution(s) sur les propriétés antifongiques et anti-inflammatoires de ces molécules. Nos résultats préliminaires confirment que les activités antifongiques des AGCL sont attribuées principalement aux AGCL insaturés « cis » tels que l'acide oléique, l'acide linoléique ou encore l'acide palmitoléique alors que les AGCL saturés comme l'acide stéarique ou l'acide palmitique sont d'efficacité moindre. Concernant, les AGCL insaturés « trans » tel que l'acide élaïdique, ils ne semblent pas présenter de propriétés antifongiques. De même, sur le plan inflammatoire, nos données préliminaires révèlent que les AGCL insaturés « cis »

possèdent une forte activité anti-inflammatoire à l'inverse des AGCL saturés et surtout des AGCL insaturés « trans » qui eux possèdent une activité pro-inflammatoire. Un autre domaine vers lequel nous souhaitons orienter nos travaux futurs est l'analyse des mécanismes d'action des AGCL sur la viabilité fongique et plus particulièrement les cibles moléculaires impliquées dans l'activité antifongique de ces AGCL.

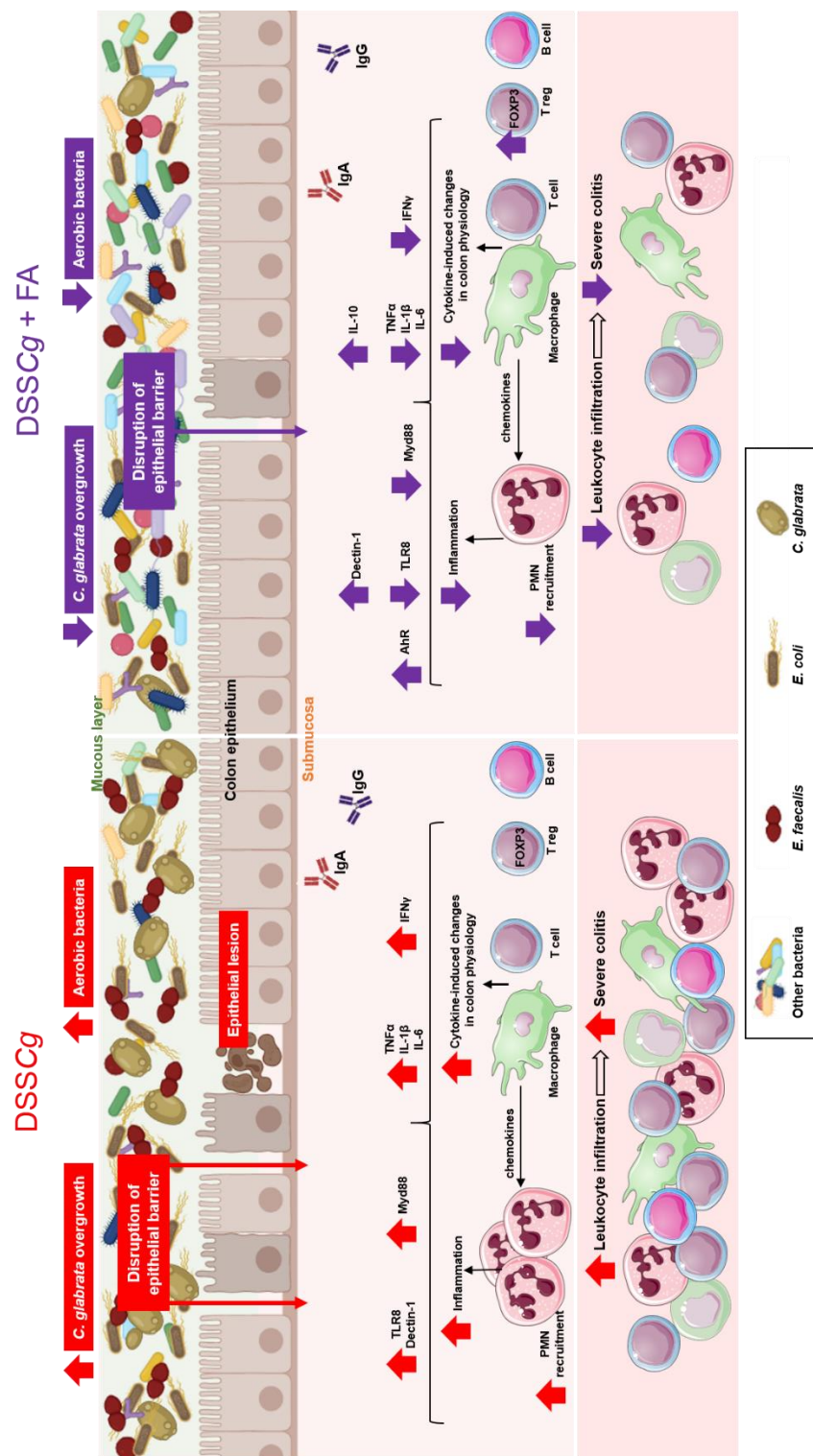


Figure 42 : Schéma de synthèse des effets observés après administration orale des acides gras sur l'inflammation intestinale, les variations du microbiote intestinal ainsi que sur la colonisation de *C. glabrata* dans un modèle murin de colite chimio-induite. Le panel DSSCg (gauche) : Les souris avec colite chimio-induite montrent une augmentation significative de leurs populations en *E. coli*, *E. faecalis* et *C. glabrata*. Accompagnée de lésions épithéliales conduisant à des infiltrats leucocytaires au niveau du côlon. Chez ces mêmes souris, la prolifération de *C. glabrata* amène à une augmentation des paramètres inflammatoires et à une modulation de l'expression des récepteurs intestinaux et des voies de signalisation associées. L'augmentation des

pathobiontes opportunistes comme *C. glabrata*, *E. coli* et *E. faecalis* se traduit par une augmentation de l'expression de certains récepteurs intestinaux dont le TLR8 et la Dectine-1. Cette augmentation engendre alors une activation de certains facteurs de signalisation et molécules adaptatrices comme Myd88. En conséquence, la prolifération des pathogènes et l'inflammation intestinale amènent à une augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires. Le panel DSSCg + FA (droite) : Le traitement des souris avec les deux AGCL combinés (FA) conduit à une diminution du nombre de bactéries aérobies se traduisant par une diminution de l'expression de TLR8 et de Myd88 impliqués dans la reconnaissance et la réponse envers ces microorganismes. Dans ces mêmes souris, l'augmentation de l'expression du récepteur AhR conduirait à une réduction de la réponse inflammatoire faisant intervenir une augmentation de l'expression de FOXP3. La variation de l'expression de ces différents récepteurs est alors corrélée à une augmentation de l'expression de la cytokine IL-10 et à une diminution de celles des cytokines pro-inflammatoires. L'ensemble de ces processus amène à une diminution des paramètres inflammatoires, à la réduction des lésions épithéliales et à la diminution des infiltrats leucocytaires localisés au niveau de la muqueuse colique. La partie « DSSCg » représente les résultats obtenus et visualisés par rapport au groupe contrôle (CTL ; sans inflammation). La partie « DSSCg + FA » représente les résultats obtenus et visualisés par rapport au groupe colonisé par *Candida* sous DSS (DCg). Une flèche dirigée vers le haut (↑) représente une augmentation significative ; une flèche dirigée vers le bas (↓) représente une diminution significative ; un signe « égal » (=) montre qu'il n'y a pas de variation significative.

Partie 2 : Analyse de l'effet d'un traitement par chitine fongique sur l'élimination de *C. glabrata* et sur l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite chimio-induite.

A) Effet(s) du traitement curatif avec de la chitine sur l'élimination de *C. glabrata* et sur l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite chimio-induite

La première procédure consiste à réaliser un traitement curatif en vue d'évaluer l'effet de la chitine fongique sur la modulation de la réponse immune, sur la colonisation par *C. glabrata* ainsi que sur les variations du microbiote intestinal. Pour ce faire, les souris reçoivent un gavage unique de *C. glabrata* à J0. Le DSS à 2 % est administré par voie orale dans l'eau de boisson et ce pendant la durée entière de l'expérimentation. La chitine est administrée aux souris par voie intra-péritonéale pendant les 5 premiers jours de l'expérimentation (cf. figure 21 dans la section 8.B.b.2) du matériels et méthodes).

1. Évaluation des effets d'un traitement curatif par la chitine sur les paramètres inflammatoires à travers un modèle murin de colite chimio-induite par DSS

Au cours de cette expérimentation, 2 souris du groupe sous DSS (D) sont décédées ainsi que 3 souris du groupe sous DSS en présence de *C. glabrata* (DCg) (**Figure 43**). Les groupes CTL, Cg, Ch et CgCh ne présentent pas de signe clinique d'inflammation avec une masse corporelle (**Fig. 43A**) et un score clinique (**Fig. 43B**) qui ont peu varié. De même dans ces groupes, le score histologique du côlon est resté faible (**Fig. 43C**). Ces mêmes souris présentaient une absence d'infiltrats leucocytaires, d'œdèmes ou encore de lésions épithéliales au niveau de la muqueuse colique (**Fig. 43D**). Comparativement aux groupes sous DSS (D et DCg) qui ont montré une diminution significative de la masse corporelle à partir du 10^{ème} jour de l'expérimentation, les souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine (DCh et DCgCh) ne montrent aucune diminution significative de leur masse corporelle (**Fig. 43A**). En effet, cette diminution de la masse corporelle a été de l'ordre de 10 à 15% pour les groupes sous DSS (D et DCg) par rapport aux souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine (DCh et DCgCh). De même, les souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine (DCh et DCgCh)

affichent une diminution significative des scores clinique et histologiques par rapport aux souris sous DSS (D et DCg) (**Fig. 43B-C**). Enfin, sur le volet histologique, nos observations montrent des infiltrats leucocytaires, des œdèmes et des lésions épithéliales moins bien prononcés pour les souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine (DCh et DCgCh) que pour les souris contrôles (D et DCg) (**Fig. 43D**).

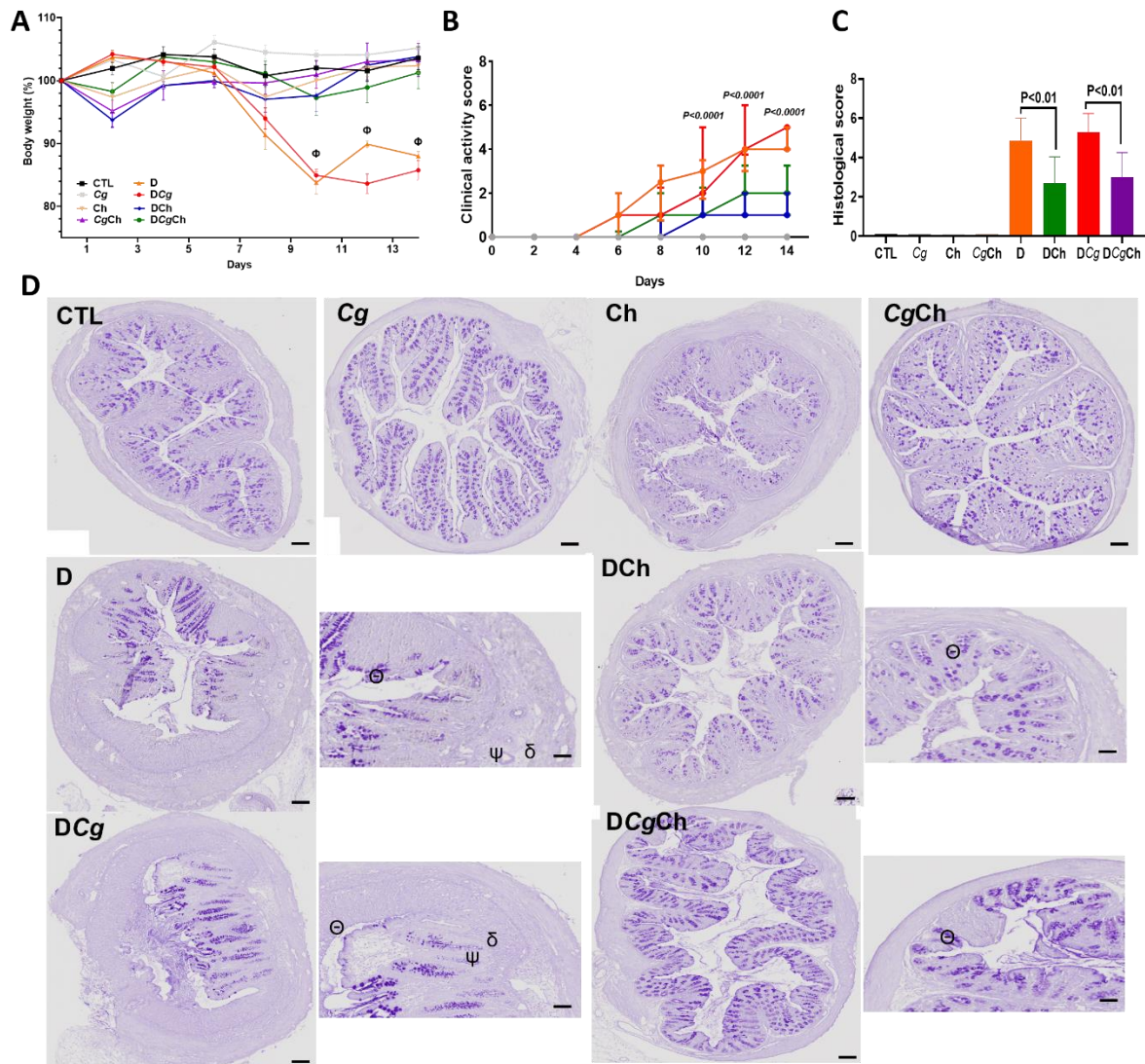


Figure 43 : Effets du traitement curatif par la chitine sur les paramètres inflammatoires dans un modèle de colite chimio-induite par DSS. A. Variation de la masse corporelle des groupes au cours des 14 jours de l'expérimentation. $\Phi=****P<0.0001$, groupes D et DCg vs. groupes DCh et DCgCh. B. Score clinique des groupes au cours des 14 jours du suivi. $****P<0.0001$, groupes D et DCg vs. groupes DCh et DCgCh. C. Score histologique des 8 groupes. D. Coupes histologiques réalisées sur des prélèvements de côlon issus des 8 groupes d'animaux. (Θ) lésion épithéliale ; (δ) infiltrat leucocytaire ; (ψ) œdème. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation. Échelle : 50 μ m pour le panel d'images côté gauche et 25 μ m pour le panel d'images côté droit (zoom).

2. Détermination de la charge fongique dans les selles et dans les organes des animaux avec colite chimio-induite et traités de manière curative par la chitine

Nous avons déterminé la charge fongique fécale des souris tous les deux jours. La charge fongique au niveau du tractus digestif (estomac, cæcum et côlon) a été déterminée à la fin de l'expérimentation dans les groupes ayant eu un gavage unique de *C. glabrata* (**Figure 44**). Une réduction significative de la charge fongique entre le 1^{er} jour et le 2^{ème} jour a été observée pour l'ensemble des groupes (*Cg*, *CgCh*, *DCg* et *DCgCh*). Cette baisse persiste jusqu'au 8^{ème} jour où l'on observe une élimination quasi totale de *C. glabrata* dans le cas des groupes *Cg* et *CgCh*. Dans le cas du groupe *DCg*, nous observons une reprise de la colonisation à partir du dixième jour jusqu'au jour du sacrifice. Les souris sous DSS ayant reçu un traitement curatif par la chitine (*DCgCh*) montrent une baisse significative de la charge fongique à partir du douzième jour par rapport au groupe contrôle respectif (*DCg*) (**Fig. 44A**). En parallèle, la charge fongique de l'estomac, du cæcum et du côlon qui ont été prélevés sur les animaux sous DSS et traités de manière curative par la chitine (*DCgCh*) est significativement plus faible que celle retrouvée dans le groupe contrôle (*DCg*) (**Fig. 44B-D**). Par ailleurs, il n'existe pas de différence significative entre la charge fongique du groupe *Cg* vs. *CgCh* quel que soit l'organe considéré. Néanmoins, une meilleure tendance à la colonisation par *C. glabrata* a été observée au niveau de l'estomac (**Fig. 44B**).

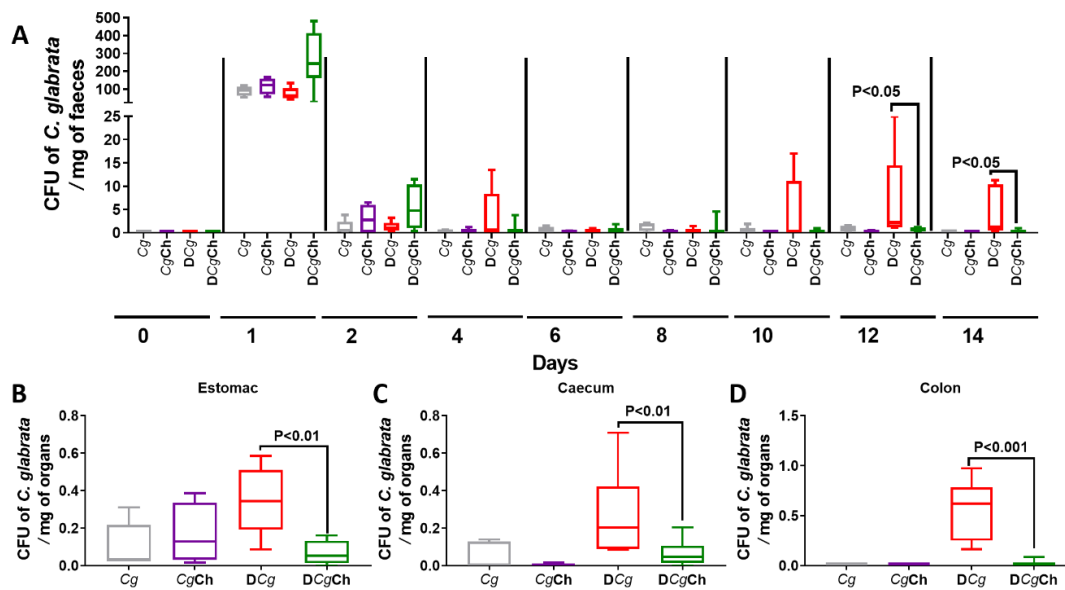


Figure 44 : Effet du traitement curatif par la chitine sur la colonisation de *C. glabrata* au sein des souris sous colite induite par DSS. A. Nombre de colonies fongiques (UFC/mg) dans les selles. B. Charge fongique retrouvée au sein de l'estomac. C. Charge fongique retrouvée au sein du cæcum. D. Charge fongique retrouvée au sein du côlon. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation.

3. Détermination de la charge bactérienne dans les selles des animaux sous colite chimio-induite et traités de manière curative par la chitine

La charge bactérienne contenue dans les selles a été déterminée pour l'ensemble des groupes (**Figure 45**). Les populations en *E. coli* et en *E. faecalis* augmentent significativement entre le 8^{ème} et le 14^{ème} jour au sein des groupes sous DSS (D et DCg) par rapport aux groupes contrôles. Dans le cas des souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine, la charge des bactéries *E. coli* et *E. faecalis* restent similaire à celle des groupes sans inflammation (**Fig. 45A-B**). Les populations *L. johnsonii* et *L. reuteri* diminuent significativement dans les groupes sous DSS (D et DCg) à partir du 10^{ème} jour et du 14^{ème} jour respectivement par rapport aux groupes contrôles. Dans le cas des souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine, la charge de *L. johnsonii* et de *L. reuteri* reste similaire à celle des groupes sans inflammation (**Fig. 45C-D**).

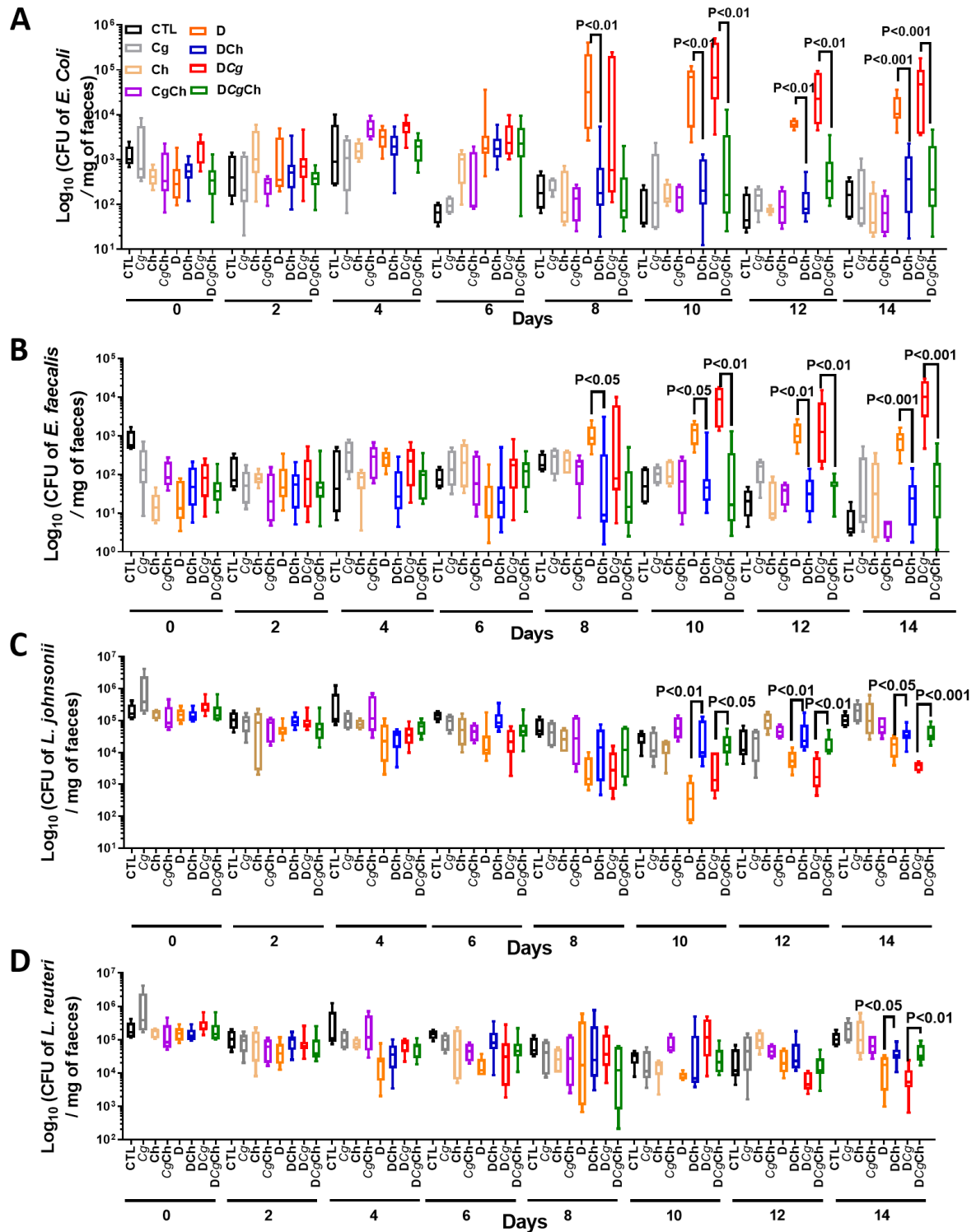


Figure 45 : Evolution de la charge des populations bactériennes fécales des souris sous colite induite par DSS et traitées de manière curative par la chitine. A. Nombre de colonies *E. coli*, en UFC/mg dans les selles. B. Nombre de colonies *E. faecalis*, en UFC/mg dans les selles. C. Nombre de colonies *L. johnsonii*, en UFC/mg dans les selles. D. Nombre de colonies *L. reuteri* en UFC/mg dans les selles. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation.

4. Effet d'un traitement curatif par la chitine sur la modulation de l'expression des cytokines et des récepteurs exprimés au sein du côlon murin et impliqués dans la réponse inflammatoire de l'hôte

A la fin de l'expérimentation, les souris ont été sacrifiées et une portion du côlon a été utilisée pour analyser l'expression des différents récepteurs et cytokines intestinaux afin de déterminer si la chitine, en traitement curatif, joue un rôle dans la modulation de la réponse immuno-inflammatoire (**Figure 46**). Le taux basal de l'expression des cytokines et des récepteurs est représenté par le groupe CTL. Chez les souris sous DSS (D et DCg), il existe une augmentation significative de l'expression des récepteurs TLRs, de la dectine-1 et de la « chitinase 3 like protein 1 » (Chi3L1) par rapport au groupe contrôle (CTL). Dans ces mêmes groupes (D et DCg), la même tendance est observée pour les cytokines pro-inflammatoires TNF α , IFN γ , IL-6 et IL-10 par rapport au groupe contrôle (CTL) (**Fig. 46A-D et 46F-J**). En parallèle, ces mêmes souris sous DSS (D et DCg) montrent une diminution de l'expression de PPAR γ par rapport au groupe contrôle (**Fig. 46E**). De manière intéressante, les souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine (DCh et DCgCh) montrent une diminution significative de l'expression de TLR2 et de TNF α avec une augmentation de l'expression de la dectine-1 et de PPAR γ , comparativement aux groupes sous DSS (D et DCg) (**Fig. 46A, 46D-E et 46G**). De plus, les souris ayant reçu *C. glabrata*, sous DSS et traitées avec de la chitine (DCgCh) montrent une diminution significative de l'expression des TLRs (TLR2 et TLR8) et de l'ensemble du panel de cytokines pro-inflammatoires observées (TNF α , IFN γ et IL-6) par rapport aux souris contrôles (DCg) (**Fig. 46A-B et 46G-I**). Par ailleurs, les souris sous inflammation traitées avec de la chitine (DCh) montrent quant à elles une augmentation significative de l'expression de la « Chi3L1 » ainsi que des récepteurs TLR9 et PPAR γ amenant à une expression accrue de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par rapport aux souris sous DSS (D) (**Fig. 46C, 46E-F et 46J**). De même, les souris ayant reçu *C. glabrata*, sous DSS et traitées avec de la chitine (DCgCh) affichent les mêmes tendances que celles du groupe DCh en termes d'expression de PPAR γ , de la « Chi3L1 » et de TLR9 par rapport au groupe contrôle (DCg) (**Fig. 46C et 46E-F**). Ces données suggèrent que les souris sous traitement curatif par la chitine montrent une réponse pro-inflammatoire atténuée avec notamment un profil cytokinique similaire à celui retrouvé chez les souris contrôles (sans inflammation) (**Fig. 46**).

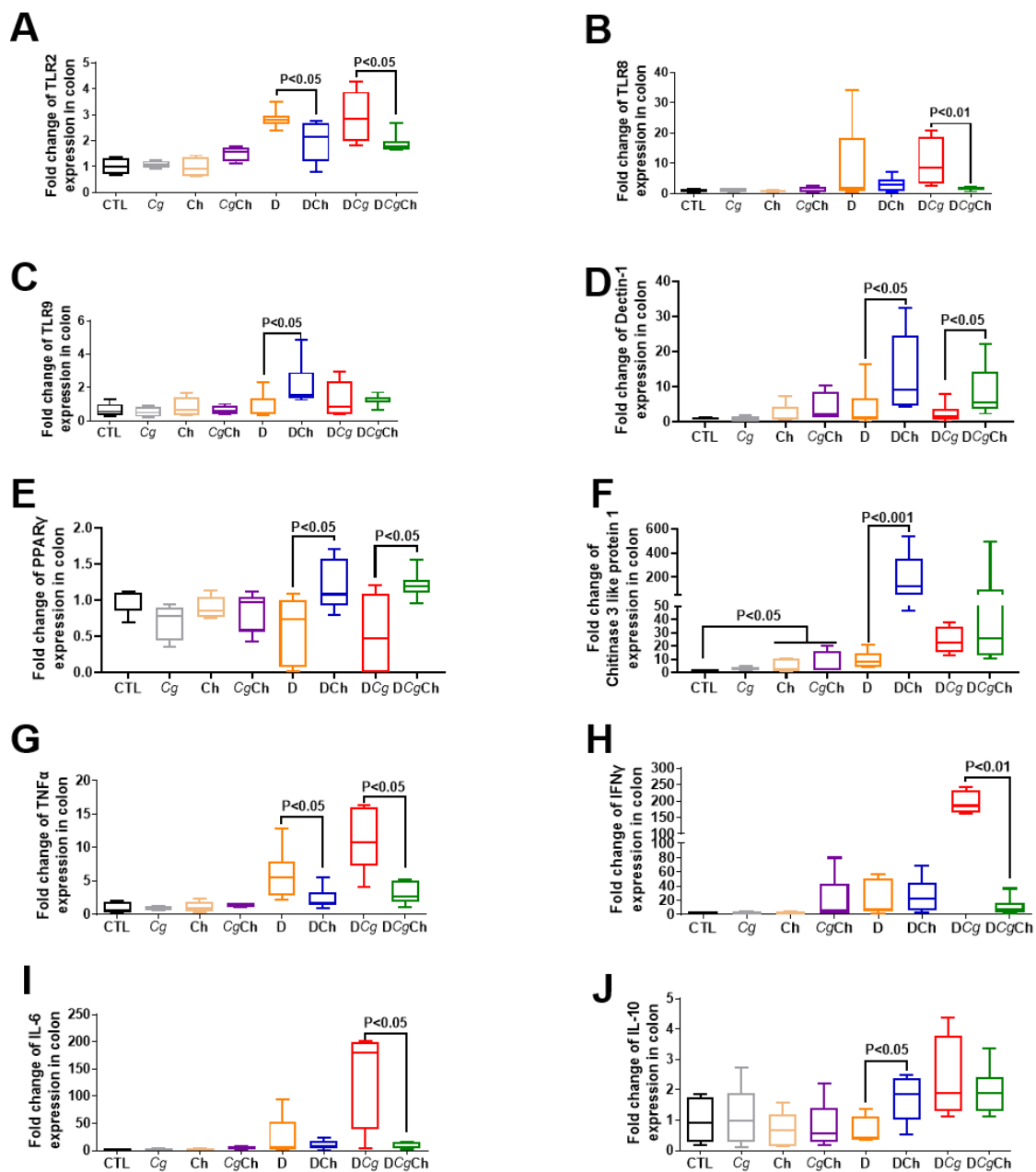


Figure 46 : Expression des récepteurs et des médiateurs intestinaux ainsi que des cytokines produites dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS et traité de manière curative par la chitine. (A-J) Niveaux d'expression relative des ARNm de TLR2, TLR8, TLR9, Dectine-1, PPAR γ , Chitinase 3 like protéine 1, TNF α , IFN γ , IL-6 et IL-10 au sein du côlon murin. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation.

5. Purification et détection des anticorps de type IgG issus de souris sous DSS et ayant reçu un traitement curatif par la chitine

Les souris reçoivent de la chitine par voie intra-péritonéale pendant les 5 premiers jours de l'expérimentation. A la fin de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés et le sang de chaque animal a été récupéré afin de purifier et détecter les IgG murines de nos divers groupes (**Figure 47**). Après purification des IgG totales sur colonne

d'affinité de protéine G, nous avons réalisé un SDS-PAGE pour chaque groupe afin de détecter la présence des IgG murines comme représenté dans la figure 47 pour les groupes CTL, CgCh, D et DCgCh. Nos résultats montrent alors que la majorité des IgG est située dans la fraction d'éluion 2, puis dans une moindre mesure dans les fractions d'éluion 3 à 5. Il faut également souligner que ces IgG sont localisées aux alentours de 50kDa pour la chaîne lourde et de 30kDa pour la chaîne légère (Fig. 47).

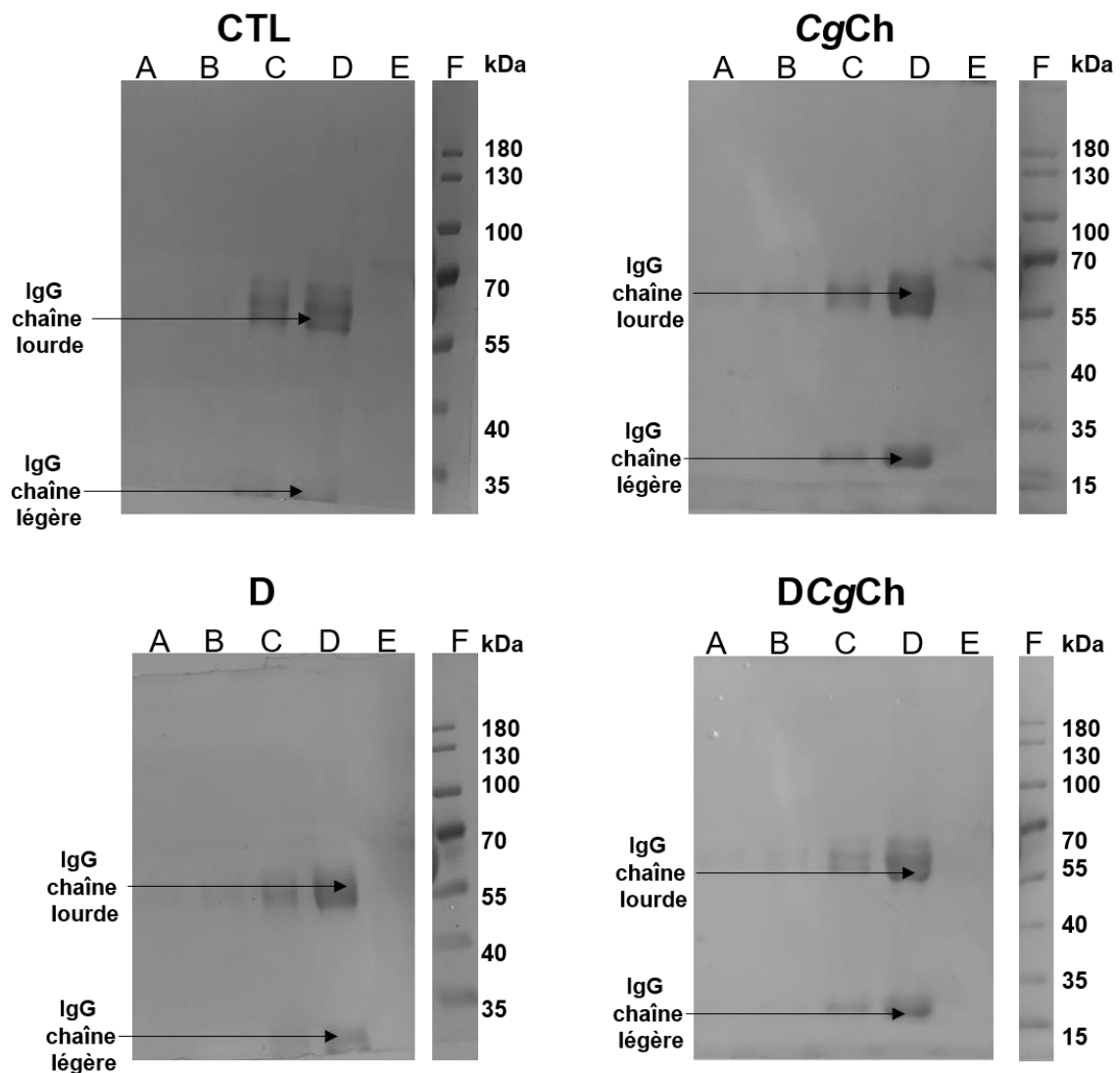


Figure 47 : Détection par SDS-PAGE des IgG totales murines purifiées à partir du sérum de souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine. Détection par SDS-PAGE des IgG totales murines purifiées pour les groupes CTL (souris contrôle sans traitement), CgCh (souris contrôle ayant reçu un gavage unique par *C. glabrata* et traitées par la chitine), D (souris sous DSS) et DCgCh (souris sous DSS ayant reçu un gavage unique par *C. glabrata* et traitées par la chitine). A. Fraction d'éluion 5. B. Fraction d'éluion 4. C. Fraction d'éluion 3. D. Fraction d'éluion 2. E. Fraction d'éluion 1. F. Témoin de masse moléculaire (10-180 kDa).

6. Reconnaissance de la chitine par les anticorps murins de type IgG issus de souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine

Après purification des anticorps murins de type IgG, nous avons vérifié la présence d'anticorps anti-chitine par test ELISA (**Figure 48**). Les IgG des groupes CTL et Cg ne montrent pas de reconnaissance importante de la chitine par rapport aux groupes traités avec de la chitine. Effectivement, nous remarquons une augmentation de la reconnaissance de la chitine uniquement dans le cas des groupes contrôles traités de manière curative par de la chitine (Ch et CgCh) par rapport aux groupes contrôles non traités (CTL et Cg). Néanmoins, il faut souligner que nous n'observons pas d'augmentation significative pour les groupes sous inflammation traités avec de la chitine (DCh et DCgCh) par rapport aux groupes sous inflammation (D et DCg). Par ailleurs, les IgG totales issues du groupe sous inflammation en présence de *C. glabrata* montrent une reconnaissance accrue de la chitine au regard de celles du groupe sous inflammation (D).

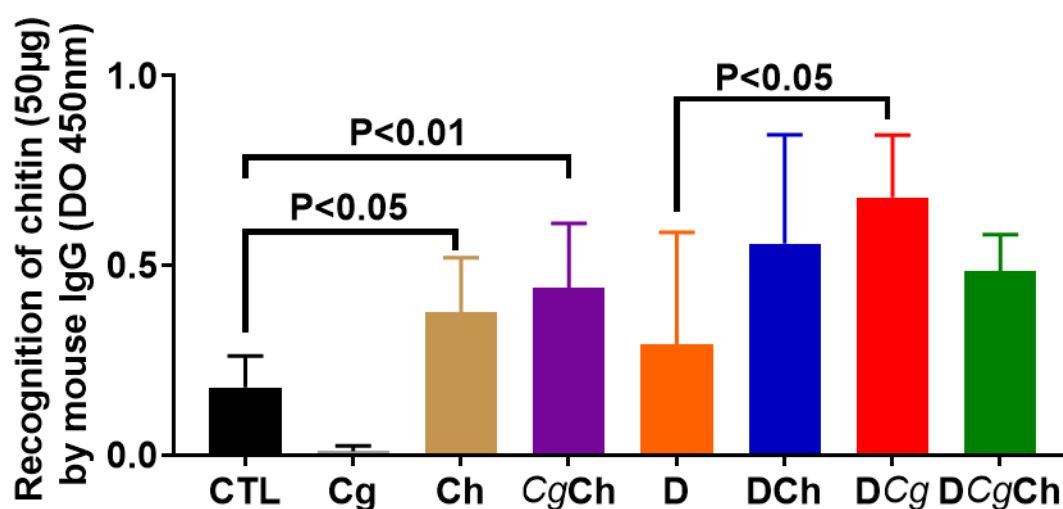


Figure 48 : Analyse par ELISA de la réponse anticorps anti-chitine (IgG totales) purifiées à partir des sérums des souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine. La chitine a été déposée à une concentration finale de 50 µg/mL. La révélation a été effectuée au moyen d'un anticorps secondaire (Goat anti-mouse IgG, Human-ads-HRP) Les résultats proviennent de trois expérimentations indépendantes.

B) Effet(s) du traitement préventif avec de la chitine sur l'élimination de *C. glabrata* et sur l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite chimio-induite

La deuxième procédure consiste à évaluer si les souris traitées de manière préventive avec de la chitine développent une résistance accrue contre la colonisation par *C. glabrata*. Pour ce faire, les souris reçoivent une injection intracutanée de chitine par semaine et ce, pendant trois semaines. A l'issue de cette troisième injection, les souris sont soumises à un protocole de colite chimio-induite par DSS à 2 %. Les souris reçoivent le DSS contenu dans l'eau de boisson et un gavage unique à *C. glabrata* dès le premier jour de l'expérimentation (cf. figure 22 dans la section 8.B.b.3) du matériels et méthodes).

1. Évaluation des effets d'un traitement préventif par la chitine sur les paramètres inflammatoires à travers un modèle murin de colite chimio-induite par DSS

Aucun décès n'a été déploré au cours de cette expérimentation (**Figure 49**). Les groupes CTL, Cg, Ch et CgCh ne présentent pas de signe clinique d'inflammation avec une masse corporelle (**Fig. 49A**) et un score clinique (**Fig. 49B**) qui ont peu varié. De même dans ces groupes, le score histologique du côlon est resté faible (**Fig. 49C**). Ces mêmes souris ne présentaient ni infiltrats leucocytaires, ni œdèmes, ni lésions épithéliales au niveau de la muqueuse colique (**Fig. 49D**). Comparativement aux groupes sous DSS (D et DCg), les souris sous DSS et traitées de manière préventive par la chitine (DCh et DCgCh) ne montrent qu'une faible amélioration significative de la masse corporelle (**Fig. 49A**). En effet, cette diminution de la masse corporelle a été de l'ordre de 5% pour les groupes sous DSS (D et DCg) par rapport aux souris sous DSS et traitées de manière curative par la chitine (DCh et DCgCh) et est de 10 % par rapport aux souris contrôles (CTL, Cg, Ch et CgCh). De même, les souris sous DSS et traitées de manière préventive par la chitine (DCh et DCgCh) affichent une diminution significative du score clinique par rapport aux souris sous DSS (D et DCg) (**Fig. 49B**). Néanmoins, les souris sous DSS et prétraitées avec de la chitine (DCh et DCgCh) n'affichent pas de variation significative du score histologique par rapport à celui des souris sous DSS (D et DCg) (**Fig. 49C**). En effet, les analyses histologiques des sections de côlon des

souris prétraitées par la chitine (DCh et DCgCh) ne montrent aucune amélioration en termes d'infiltrats leucocytaires, d'œdèmes et de lésions épithéliales comparativement aux souris contrôles (D et DCg) (Fig. 49D).

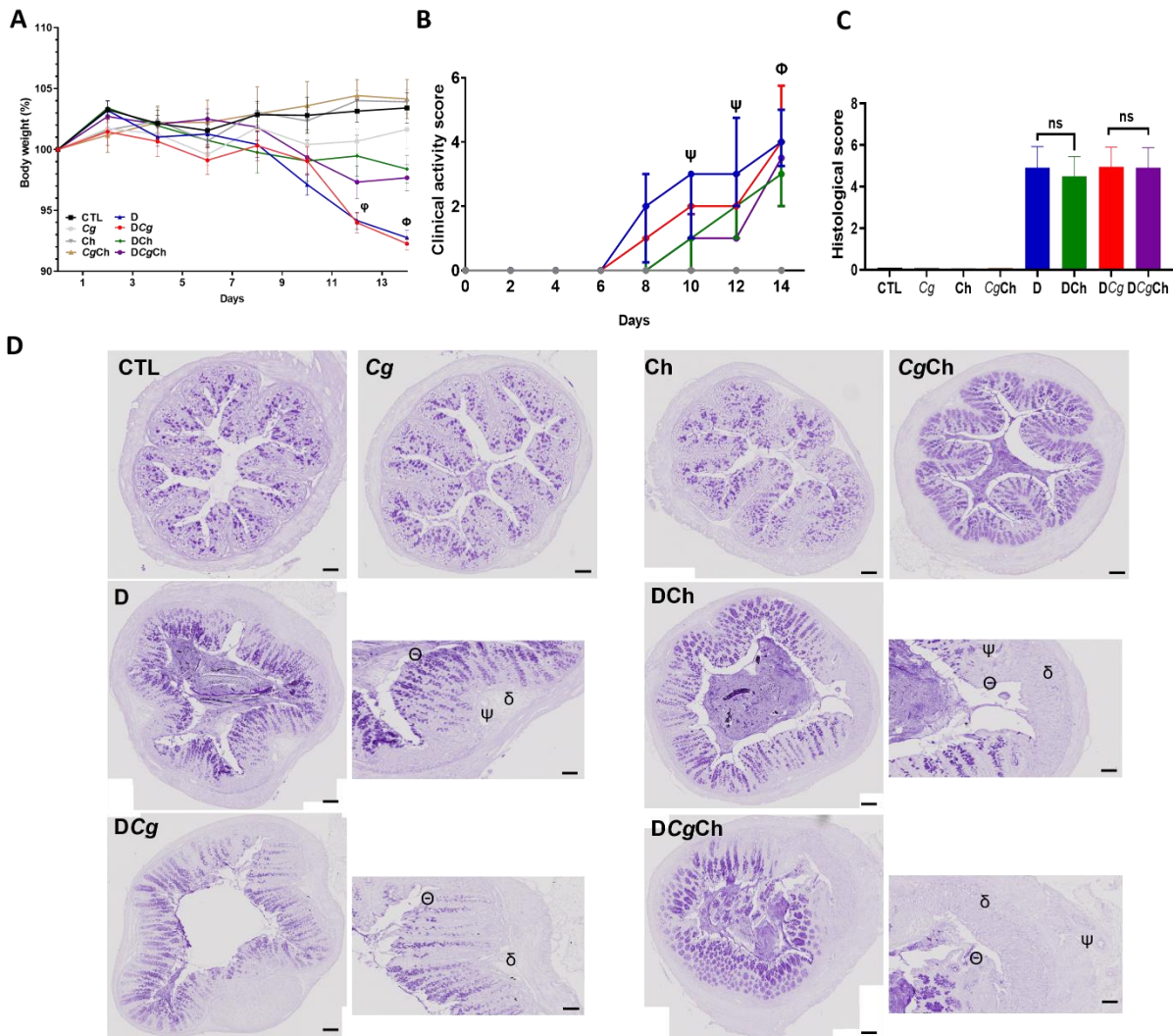


Figure 49 : Effets du traitement préventif par la chitine sur les paramètres inflammatoires dans un modèle de colite chimio-induite par DSS. A. Variation de la masse corporelle des groupes au cours des 14 jours de l'expérimentation. $\phi = **P < 0.01$ D vs. DCg ; $\Phi = **P < 0.01$ D vs. DCg et DCg vs. DCgCh. B. Score clinique des groupes au cours des 14 jours du suivi. $\psi = ***P < 0.001$ D vs. DCg et $**P < 0.01$ DCg vs. DCgCh ; $\Phi = ****P < 0.0001$ D vs. DCg et DCg vs. DCgCh. C. Score histologique des 8 groupes. D. Coupes histologiques réalisées sur des prélèvements de côlon issus des 8 groupes murins. (Θ) lésion épithéliale ; (δ) infiltrat leucocytaire ; (ψ) œdème. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation. Échelle : 50 μ m pour le panel d'images côté gauche et 25 μ m pour le panel d'images côté droit (zoom).

2. Détermination de la charge fongique dans les selles et dans les organes des animaux avec une colite chimio-induite et traitées de manière préventive par la chitine

Nous avons déterminé la charge fongique fécale des souris tous les deux jours. La charge fongique au niveau du tractus digestif (estomac, cæcum et côlon) a été déterminée à la fin de l'expérimentation dans les groupes ayant eu un gavage unique de *C. glabrata* (**Figure 50**). Une réduction significative de la charge fongique entre le 1^{er} jour et le 2^{ème} jour a été observée pour l'ensemble des groupes (*Cg*, *CgCh*, *DCg* et *DCgCh*). Cette baisse persiste jusqu'au 4^{ème} jour où l'on observe une élimination quasi totale de *C. glabrata* dans le cas du groupe *CgCh* alors qu'elle persiste dans le groupe *Cg*. Dans le cas du groupe *DCg*, nous observons une reprise de la colonisation à partir du dixième jour jusqu'au jour du sacrifice (J14). Les souris sous DSS ayant reçu un traitement préventif par la chitine (*DCgCh*) montrent une baisse significative de la charge fongique à partir du dixième jour par rapport au groupe contrôle (*DCg*) (**Fig. 50A**). En parallèle, la charge fongique de l'estomac, du cæcum et du côlon qui ont été prélevés sur les animaux sous DSS et traités de manière préventive par la chitine (*DCgCh*) est significativement plus faible que celle retrouvée dans le groupe contrôle (*DCg*) (**Fig. 50B-D**). Par ailleurs, la charge fongique de l'estomac et du cæcum prélevés sur les souris *CgCh* est significativement plus faible que celle retrouvée dans le groupe *Cg*. Une meilleure tendance à la colonisation par *C. glabrata* a été observée au niveau de l'estomac (**Fig. 50B**).

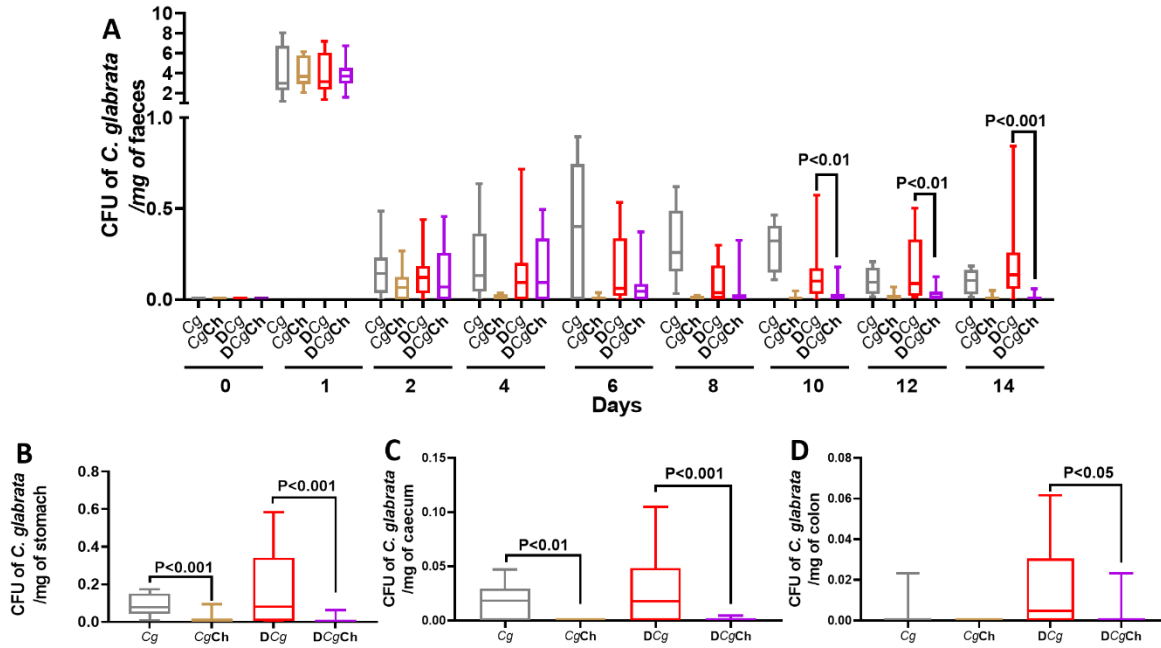


Figure 50 : Effet du traitement préventif par la chitine sur la colonisation de *C. glabrata* au sein des souris sous colite induite par DSS. A. Nombre de colonies fongiques (UFC/mg) dans les selles. B. Charge fongique retrouvée au sein de l'estomac. C. Charge fongique retrouvée au sein du cæcum. D. Charge fongique retrouvée au sein du côlon. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation.

3. Détermination de la charge bactérienne dans les selles des animaux sous colite chimio-induite et traités de manière préventive par la chitine

La charge bactérienne contenue dans les selles a été déterminée pour l'ensemble des groupes (**Figure 51**). Les populations en *E. coli* et en *E. faecalis* augmentent de manière significative, à partir du dixième jour et du quatorzième jour respectivement, au sein de l'ensemble des groupes sous DSS (D, DCh, DCg et DCgCh) par rapport aux groupes contrôles (**Fig. 51A et Fig. 51B**). Néanmoins, cette augmentation est significativement moins importante pour les groupes prétraités avec de la chitine (DCh et DCgCh) que pour les groupes sous DSS (D et DCg). Les populations de *L. johnsonii* et de *L. reuteri* diminuent dans l'ensemble des groupes sous DSS (D, DCh, DCg et DCgCh), à partir du dixième jour et du quatorzième jour respectivement, par rapport aux groupes contrôles (**Fig. 51C et Fig. 51D**). Néanmoins, dans le cas des souris sous traitement préventif par la chitine (DCh et DCgCh), la diminution de la charge de *L. johnsonii* est significativement moindre que pour celle des groupes sous DSS (D et DCg) (**Fig. 51C**).

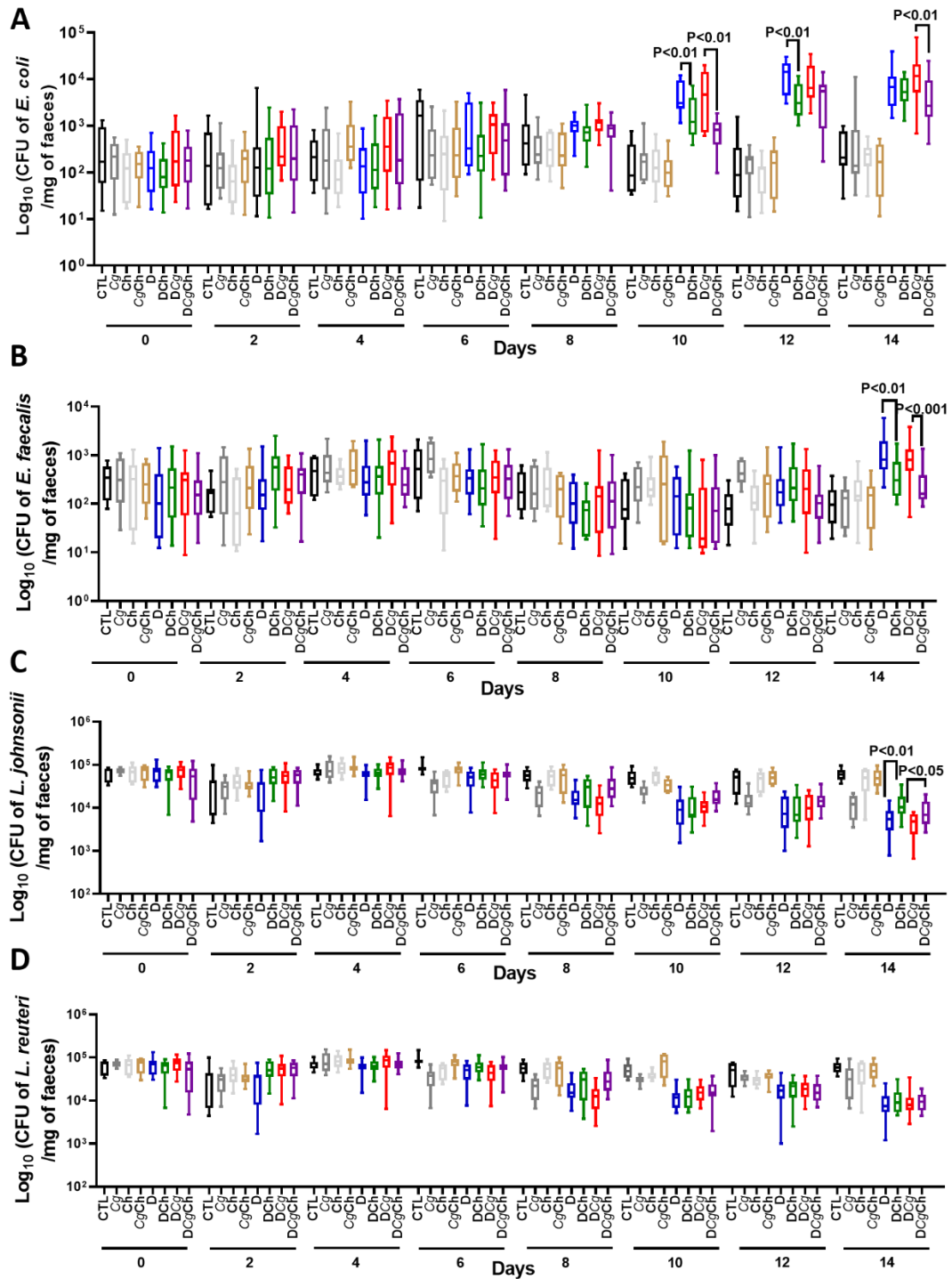


Figure 51 : Evolution des populations bactériennes fécales au cours de la colite chimio-induite par DSS après traitement préventif avec de la chitine. A. Nombre de colonies *E. coli*, en UFC/mg dans les selles. B. Nombre de colonies *E. faecalis*, en UFC/mg dans les selles. C. Nombre de colonies *L. johnsonii*, en UFC/mg dans les selles. D. Nombre de colonies *L. reuteri* en UFC/mg dans les selles. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation.

4. Effet du traitement préventif par la chitine sur la modulation de l'expression des cytokines, des médiateurs et des récepteurs exprimés au sein du côlon murin et impliqués dans la réponse inflammatoire de l'hôte

A la fin de l'expérimentation, les souris ont été sacrifiées et une portion du côlon a été utilisée pour analyser l'expression des différents récepteurs et cytokines intestinaux afin de déterminer si la chitine, en traitement préventif, joue un rôle dans la modulation de la réponse immuno-inflammatoire (**Figure 52**). Le taux basal de l'expression des cytokines et des récepteurs est représenté par le groupe CTL. Chez les souris sous DSS (D et DCg), il existe une diminution significative de PPAR γ et une augmentation significative de l'expression des récepteurs TLRs, de la dectine-1, de la Chi3L1 et des cytokines pro-inflammatoires TNF α , IFN γ et IL-6 comparativement au groupe contrôle (CTL). Les souris sous DSS et traitées de manière préventive avec de la chitine (DCh et DCgCh) montrent une augmentation significative de l'expression de TLR4, TLR9, Dectine-1, PPAR γ , de la Chi3L1 ou encore de Myd88 comparativement à leurs groupes contrôles respectifs (D et DCg) (**Fig. 52A-F**). De plus, les souris ayant reçu *C. glabrata*, sous DSS et prétraitées avec de la chitine (DCgCh) affichent une augmentation significative de NF- κ B par rapport à son groupe contrôle (DCg) (**Fig. 52G**). En parallèle, les souris sous DSS et traitées de manière préventive avec la chitine (DCh) montrent les mêmes tendances par rapport à son groupe contrôle (D) (**Fig. 52G**). Dans le cas de l'expression de l'IFN γ , celle-ci diminue de manière significative pour les souris ayant reçu du *C. glabrata*, sous DSS et traitées de manière préventive avec de la chitine (DCgCh) par rapport à son groupe contrôle (DCg) (**Fig. 52H**). Néanmoins, il n'existe pas de différence significative en termes d'expression des cytokines TNF α , IL-6 et IL-10 entre les souris sous DSS et traitées de manière préventive par la chitine (DCh et DCgCh) et les souris des groupes contrôles (D et DCg) (**Fig. 52H et 52J-K**).

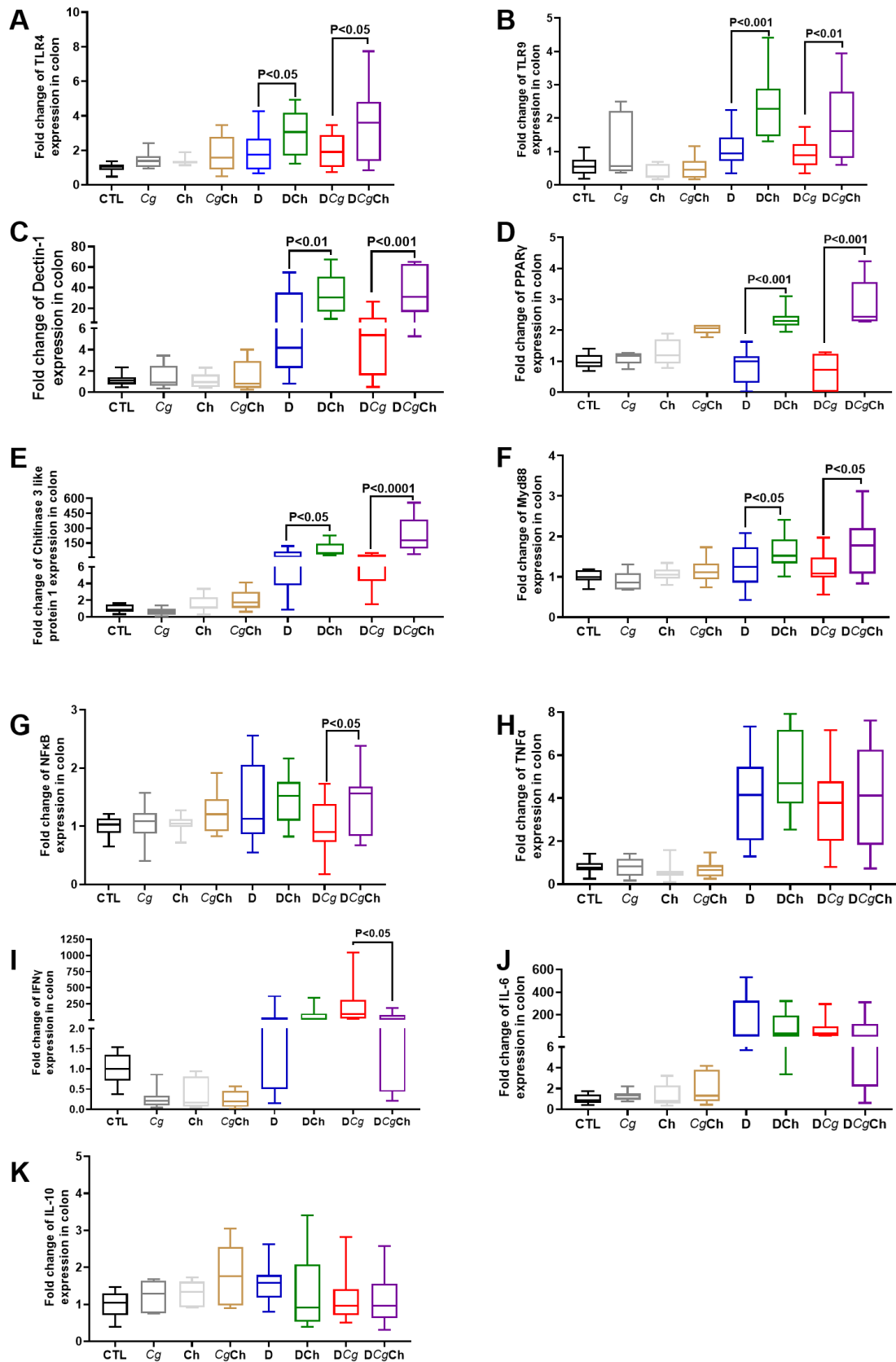


Figure 52 : Expression des récepteurs et des médiateurs intestinaux ainsi que des cytokines inflammatoires dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS et traité de manière préventive par la chitine. (A-K) Niveaux d'expression relative des ARNm de TLR4, TLR9, Dectine-1, PPAR γ , Chitinase 3 like protein 1, Myd88, NF- κ B, TNF α , IFN γ , IL-6 et IL-10 dans le côlon des souris. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation.

5. Analyse des populations de cellules T régulatrices spléniques, de la modulation de l'expression de FOXP3 au niveau colique des souris sous colite chimio-induite et traitées de manière préventive par la chitine

A l'issue de l'expérimentation, les souris ont été sacrifiées et la rate ainsi que le colon ont été récupérés afin d'analyser les populations de cellules T régulatrices (**Figure 53**). Le groupe contrôle (CTL) représente la population basale en cellules T régulatrices (T reg). Une tendance à la diminution de la population cellulaire T reg splénique a été observée lorsque nous sommes en présence d'inflammation chimio-induite (D et DCg) par rapport au groupe contrôle (CTL). Cette diminution est d'autant plus marquée que les souris aient été traitées de manière préventive par la chitine (DCh et DCgCh) (**Fig. 53A**).

Concernant l'analyse des cellules T reg au niveau colique. Nous avons également analysé l'expression de FOXP3 au niveau colique, un régulateur important dans l'établissement et le maintien du phénotype des T reg. De manière intéressante, l'expression de FOXP3 est significativement augmentée en présence des souris sous DSS (D et DCg) par rapport au groupe contrôle (CTL) (**Fig. 53B**). Par ailleurs, nous observons que les groupes sous DSS et traités de manière préventive avec la chitine (DCh et DCgCh) montrent une augmentation significativement moins importante de l'expression de FOXP3 par rapport aux groupes contrôles respectifs (D et DCg). L'ensemble de ces données mettent en évidence que les souris sous DSS et traitées de manière préventive avec la chitine montrent une diminution significative des populations cellulaires T régulatrices.

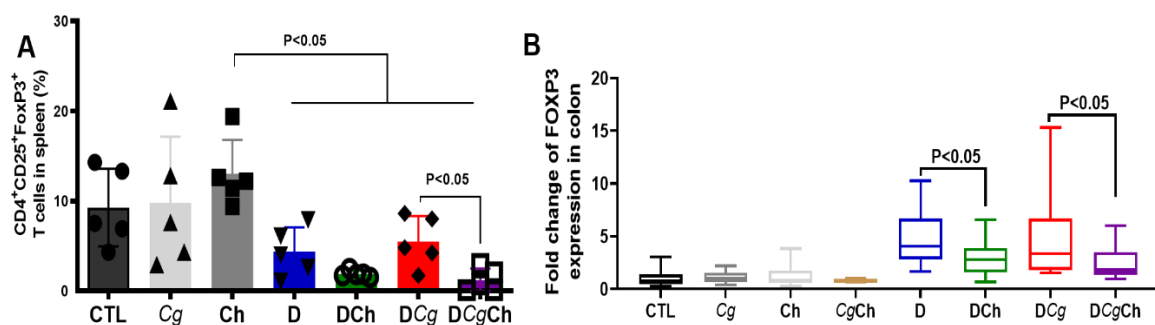


Figure 53 : Variation des populations des cellules T régulatrices spléniques ainsi que de l'expression de FOXP3 colique des souris sous DSS et traitées de manière préventive avec la chitine. (A) Analyses des populations de cellules T régulatrices spléniques par cytométrie en flux (FACS). Les données sont issues de 5 souris par groupe. (B) Niveaux d'expression relative de l'ARNm de FOXP3 au niveau colique. Les données sont issues de 5 souris par groupe sans inflammation et de 10 souris par groupe sous inflammation.

6. Purification et détection des anticorps de type IgG issus de souris sous DSS et ayant reçu un traitement préventif par la chitine

A l'issue de l'expérimentation, les souris ont été sacrifiées et les IgG murines ont été purifiées et détectées pour les divers groupes (**Figure 54**). Après purification sur colonne d'affinité, nous avons réalisé un SDS-PAGE pour chaque groupe afin de détecter la présence des IgG murines comme représenté dans la figure 54A pour les groupes CTL, Cg, D et DCh (**Fig. 54A**). Afin de déterminer la fraction d'élution contenant la concentration maximale d'IgG, nous avons réalisé une expérience de Dot-Blot en déposant 20 μ L d'éluat sur une membrane de nitrocellulose puis de révéler la présence d'IgG par un anticorps secondaire marqué à la FITC. Nos résultats mettent en évidence que les IgG murines ont été majoritairement concentrées dans la fraction d'élution 2 et dans une moindre mesure dans les fractions 3 à 5 (**Fig. 54B**).

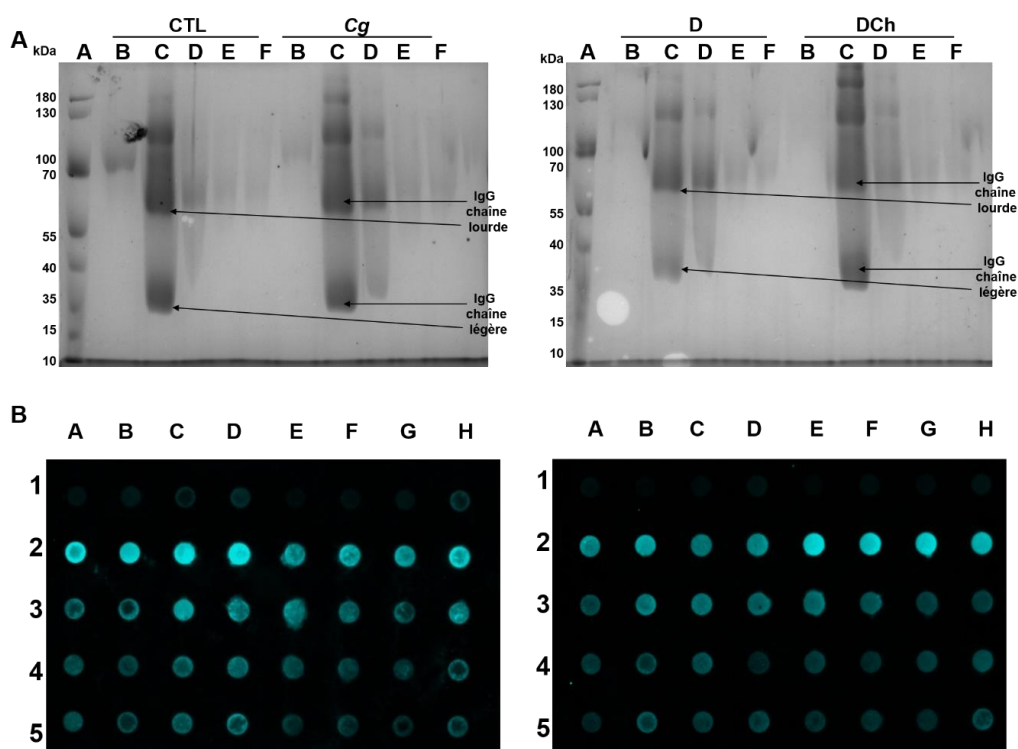


Figure 54 : Détection par SDS-PAGE et Dot-blots des IgG totales murines purifiées à partir du sérum de souris sous DSS et traitées de manière préventive par la chitine. (A) Exemple d'une détection par SDS-PAGE des IgG totales murines purifiées pour les groupes CTL, Cg, D et DCh. A. Marqueur de poids moléculaire (10-250 kDa). B. Fraction d'élution 1. C. Fraction d'élution 2. D. Fraction d'élution 3. E. Fraction d'élution 4. F. Fraction d'élution 5. (B) Détection par dot-blot des IgG totales murines purifiées. A = groupe CTL ; B = groupe Cg ; C = groupe Ch ; D = groupe CgCh ; E = groupe D ; F = groupe DCh ; G = groupe DCg ; H = groupe DCgCh. 1,2,3,4,5 = fractions d'élution 1, 2, 3, 4 et 5, respectivement. Le marquage des IgG a été réalisé à l'aide d'un anticorps anti-IgG murin-FITC (Goat anti-mouse IgG-FITC). Les résultats proviennent de deux expérimentations indépendantes.

7. Reconnaissance de la chitine par les anticorps murins de type IgG issus de souris sous DSS et traitées de manière préventive par la chitine

Après purification et détection des IgG murines, nous avons vérifié la présence d'anticorps anti-chitine par test ELISA (**Figure 55**). L'amplitude de la réponse anticorps anti-chitine est très faible dans le groupe contrôle (CTL) et le groupe des souris sous DSS (DSS). Dans le cas des souris traitées de manière préventive par la chitine (Ch et CgCh), une augmentation significative de cette amplitude est notable comparativement aux souris contrôles (CTL). Il en est de même pour les groupes sous DSS et traités de manière préventive par la chitine (DCh et DCgCh) qui affichent une forte amplitude par rapport aux groupes DSS (D et DCg). Ces données révèlent qu'un traitement préventif par la chitine permet d'induire une réponse humorale spécifique notamment chez les souris présentant une colite chimio-induite.

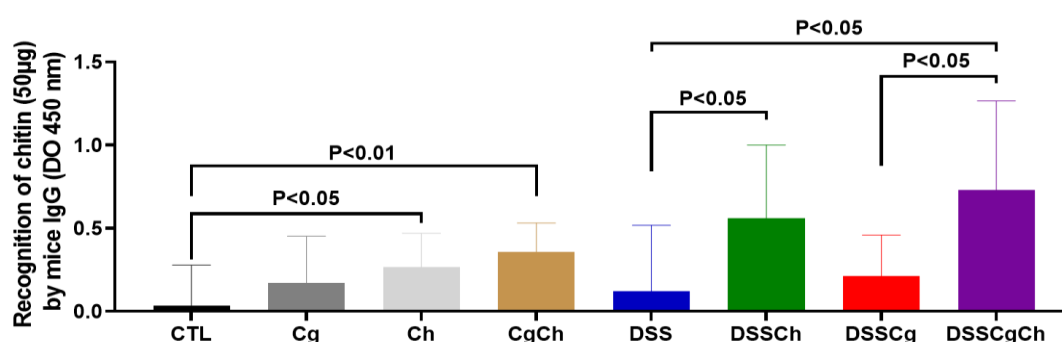


Figure 55 : Analyse par ELISA de la réponse anticorps anti-chitine (IgG totales) purifiées à partir des sérums des souris sous DSS et traitées de manière préventive par la chitine. La chitine a été déposée à une concentration finale de 50 µg/mL. La révélation a été effectuée au moyen d'un anticorps secondaire (Goat anti-mouse IgG, Human-ads-HRP). Les résultats proviennent de trois expérimentations indépendantes.

8. Effet des anticorps IgG murins sur la modulation de l'expression des cytokines, des médiateurs et des récepteurs impliqués dans les voies de signalisation inflammatoire des macrophages

Les propriétés immunomodulatrices des anticorps anti-chitine sur l'expression des récepteurs, des médiateurs et des cytokines qui sont issus des macrophages ont été évaluées (**Figure 56**). Le groupe contrôle (MΦ) représente le taux basal de l'expression. L'ajout des IgG provenant des souris traitées de manière préventive avec la chitine (MΦ+ IgG Ch) diminue significativement l'expression de TLR4 et augmente l'expression de l'IL-10 et de TNFα (**Fig. 56A et 56H-I**). En présence de macrophages activés par le LPS (MΦ+LPS), une augmentation significative de l'expression de TLR4, TLR8, Myd88, NF-κB ainsi que des cytokines IL-1β, IL-6, IL-10

et TNF α a été observée par rapport au groupe contrôle (M Φ) (**Fig. 56A-B et 56D-I**). A l'inverse, PPAR γ quant à lui diminue de manière significative lorsque les macrophages sont stimulés avec du LPS (M Φ +LPS) par rapport au groupe contrôle (M Φ) (**Fig. 56C**). En parallèle, les macrophages stimulés avec du LPS en présence des anticorps issus des souris traitées avec la chitine (M Φ LPS+ IgG Ch) montrent une diminution significative de l'expression de TLR4 et de TLR8, des facteurs de signalisation Myd88 et NF- κ B ainsi que des cytokines IL-1 β et IL-6 comparativement aux macrophages stimulés avec du LPS (M Φ LPS) ou des macrophages exposés avec du LPS et en présence des anticorps issus des souris non traitées (M Φ LPS+ IgG CTL) (**Fig. 56A-B et 56D-G**). De plus, l'expression de PPAR γ et de l'IL-10 de la condition M Φ LPS+ IgG Ch augmente de manière significative par rapport à la condition M Φ LPS ou à la condition M Φ LPS+ IgG CTL dans le cas de PPAR γ (**Fig. 56C et 56H**). Enfin, une augmentation significative de l'expression de TNF α est observée pour les conditions M Φ LPS+ IgG CTL et M Φ LPS+ IgG Ch par rapport à la condition M Φ LPS (**Fig. 56I**).

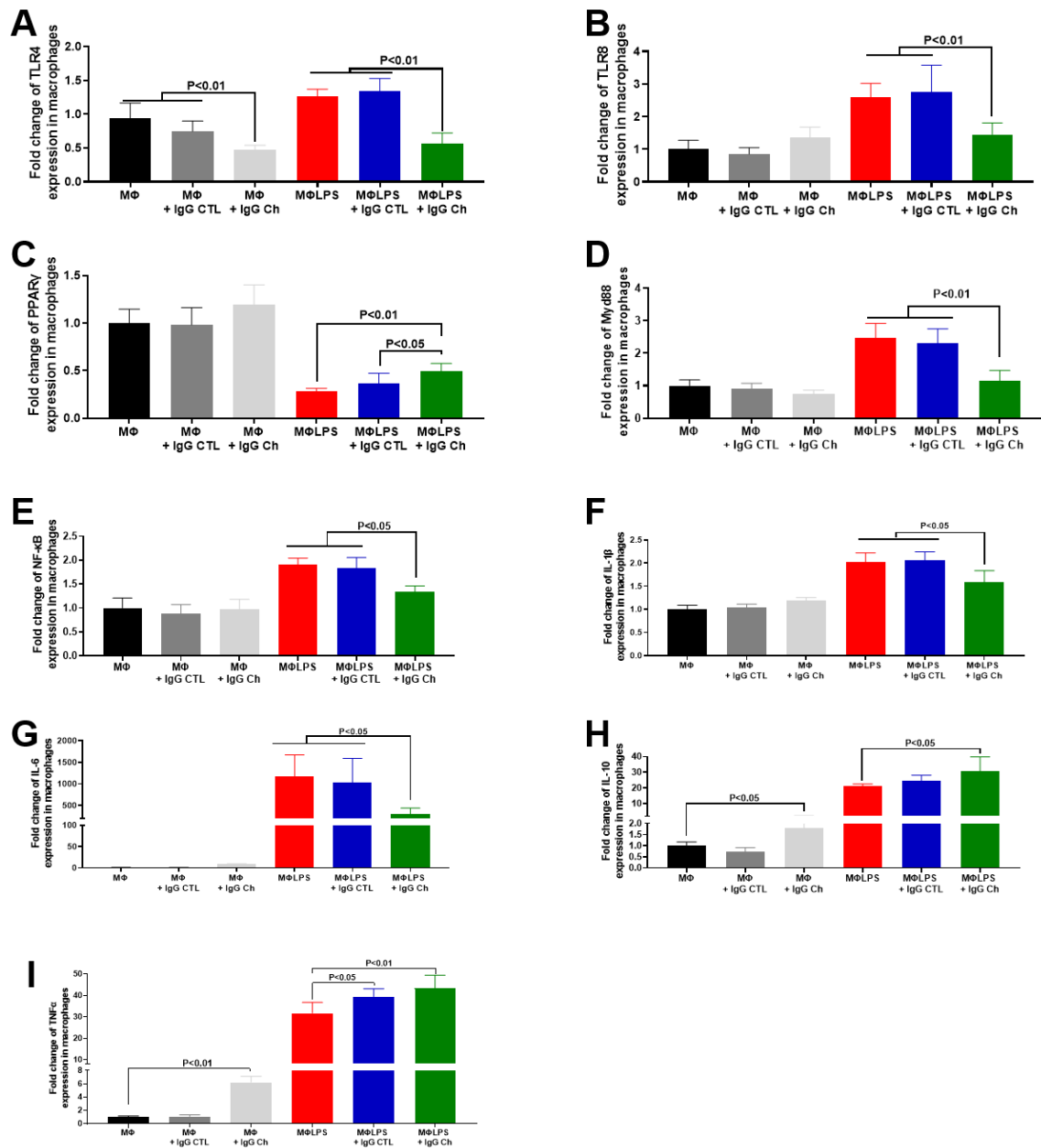


Figure 56 : Expression des récepteurs, des médiateurs et des cytokines qui sont exprimés par les macrophages exposés au LPS et traités aux anticorps murins. (A-I) Niveaux d'expression relative des ARNm de TLR4, TLR8, PPAR γ , Myd88, NF- κ B, IL-1 β , IL-6 ; IL-10 et TNF α , respectivement dans les macrophages. MΦ représente un groupe contrôle (macrophages seuls). MΦ+ IgG CTL correspond à des macrophages mis en présence d'anticorps IgG issus du groupe de souris contrôle (CTL). MΦ+ IgG Ch correspond à des macrophages mis en présence d'anticorps IgG issus du groupe de souris prétraitées par la chitine (Ch). MΦLPS représente un contrôle positif (macrophages exposés au lipopolysaccharide). MΦLPS+ IgG CTL correspond à des macrophages exposés au LPS et mis en présence d'anticorps IgG issus du groupe de souris contrôle (CTL). MΦLPS+ IgG Ch correspond à des macrophages exposés au LPS et mis en présence d'anticorps IgG issus du groupe de souris prétraitées par la chitine (Ch). Les résultats ont été obtenus à partir de deux expérimentations indépendantes.

Discussion

Plusieurs études expérimentales et cliniques rapportent que les levures du genre *Candida* sont capables d'exacerber l'inflammation intestinale associée à la MC. Ces mêmes études montrent également que l'inflammation intestinale à son tour promeut la colonisation des muqueuses intestinales par les levures^{15,104,199}. Dans ce contexte, nous nous sommes concentrés sur les effets biologiques des composants pariétaux des levures qui jouent un rôle déterminant dans l'interaction hôte-cellules fongiques. Parmi ces composants pariétaux, la chitine a été décrite comme un composé structural indispensable pour la rigidité cellulaire. De nombreuses propriétés possédées par ce composé pariétal ou ses dérivés comme le chitosan ont été rapportées : antioxydante⁵²⁶, anticoagulante⁵²⁷, anti-tumorale⁵²⁸, antimicrobienne⁵²⁹ et anti-inflammatoire^{15,530}. Nous entendons explorer dans cette étude le rôle de la chitine dans la modulation de l'inflammation intestinale chimio-induite par DSS et sa capacité à favoriser l'élimination de *C. glabrata* dans ce contexte inflammatoire. Nos précédentes investigations faisant intervenir l'administration orale de chitine à des souris avec colite chimio-induite ont mis en évidence ses effets bénéfiques dans la réduction de l'inflammation intestinale¹⁵.

Dans la présente étude impliquant un traitement curatif par la chitine, nous avons montré une diminution significative des paramètres inflammatoires (tels que le score clinique et le score histologique) des souris présentant une colite et traitées par la chitine. Ces résultats sont en cohérence avec certaines données de la littérature qui mettent en évidence les effets bénéfiques de la chitine lors de la colite chimio-induite^{15,531}. Conformément aux travaux de Wagener J *et al.*, une diminution des infiltrats leucocytaires et de l'inflammation intestinale a été observée pour les souris sous DSS et traitées par la chitine. En effet ces auteurs ont mis en évidence qu'une injection de LPS à des souris augmente de manière significative l'infiltrat de cellules immunitaires au niveau de la cavité péritonéale alors que les souris exposées au LPS et traitées par la chitine affichent quant à elles une infiltration significativement moindre de ces cellules immunitaires⁵³².

Dans ce même modèle nous montrons qu'un traitement curatif par chitine à des souris sous colite DSS-induite a pour conséquence une baisse significative de la

charge bactérienne aérobie fécale et plus précisément des populations en *E. coli* et *E. faecalis*. De manière intéressante, cet effet de la chitine pourrait être attribué à sa capacité à activer les PRRs à la surface des cellules épithéliales. Cette reconnaissance a pour conséquence la sécrétion de diverses cytokines/chimiokines, capables de favoriser la clairance bactérienne au site d'infection *via* le recrutement des neutrophiles⁵³³. La baisse de la flore bactérienne aérobie contraste avec le maintien de la charge bactérienne anaérobie fécale (*L. johnsonii* et *L. reuteri*) lors du traitement curatif par la chitine. Les lactobacilles sont d'ailleurs reconnues pour exercer des activités anti-inflammatoires bien établies^{497,534,535}. Ces bactéries exercent aussi des effets antifongiques *via* une activité lytique sur certains polysaccharides pariétaux ou par la production de métabolites secondaires capables de stimuler les réponses immunitaires^{19,20,536,537}.

En parallèle, toujours dans ce même modèle, nous observons une diminution significative de l'expression des TLRs (TLR2 et TLR8) et de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ , TNF α ou encore l'IL-6 pour les souris traitées. Cette diminution de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires chez les souris traitées peut s'expliquer en partie par la baisse significative des charges fongique et bactérienne associée au traitement par la chitine. Plus précisément, c'est la baisse de la charge bactérienne aérobie contenant des pathobiontes associés à l'inflammation intestinale²² qui pourrait expliquer la réduction de cette inflammation observée chez les souris recevant un traitement curatif par la chitine. L'augmentation significative de l'expression de la Chi3L1 associée au traitement curatif par la chitine est en cohérence avec des travaux démontrant que Chi3L1 possède une fonction dans le développement et la résolution de l'inflammation intestinale ainsi que dans la clairance bactérienne^{538,539}. D'autre part, les souris sous inflammation traitées avec la chitine montrent une augmentation significative de l'expression de PPAR γ ainsi que du récepteur TLR9 amenant à une augmentation de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, tout en affichant une diminution des cytokines pro-inflammatoires IFN γ , IL-6 et TNF α . Nos résultats sont cohérents avec ceux de Wagener J *et al.*, qui montrent que les particules de chitine fongique co-stimulent l'IL-10 et réduisent les cytokines pro-inflammatoires. Dans cette même étude, les oligosaccharides issus de la chitine ont le potentiel d'induire la sécrétion d'IL-10 par l'intermédiaire du récepteur TLR9, favorisant ainsi l'atténuation des réponses

inflammatoires chez la souris⁵³². Il faut également souligner que d'autres études montrent que la chitine ou le chitosan agissent comme des agents anti-inflammatoires en étant par exemple impliqués dans les processus de cicatrisation des plaies^{540,541}. Ces données corroborent nos résultats précédents où nous montrons que les souris sous DSS recevant de la chitine par voie orale ont présenté des niveaux réduits de colonisation par *C. glabrata* tout en restaurant la biodiversité bactérienne. Cette même étude met également en évidence une activation de la Chi3L1 et du récepteur PPAR γ de manière significative¹⁵.

Dans la seconde partie de cette étude impliquant des souris avec colite chimio-induite et recevant un traitement préventif par la chitine en association avec l'adjuvant de Freund, nous avons montré qu'il n'existe pas de différence significative en termes de paramètres inflammatoires entre les souris traitées ou non par la chitine à l'exception de la perte de poids corporelle qui était moindre chez les souris traitées de manière préventive par la chitine.

Nos données issues de cette seconde partie mettent en évidence une augmentation significative de l'expression de TLR4 et des facteurs de signalisation Myd88 et NF- κ B pour les souris traitées de manière préventive par la chitine. Ces données sont en lien avec un fait marquant de cette étude montrant que les souris sous inflammation exposées à un traitement préventif avec la chitine montrent une baisse significative de la charge fongique. En effet, cette colonisation persiste dans les groupes non traités alors qu'elle disparaît totalement dans le cas des groupes traités de manière préventive par la chitine. Ces résultats corroborent avec ceux de l'étude de Koller B *et al.*, montrant que la chitine est capable de réguler à la hausse l'expression de TLR4 sur des kératinocytes primaires en modulant la réponse immunitaire innée de l'organisme contre les pathogènes⁵³³. En régulant à la hausse l'expression de TLR4, la chitine peut renforcer l'immunité innée contre les pathogènes notamment par le recrutement de neutrophiles permettant une défense de l'hôte contre les infections bactériennes. Ce mécanisme peut également être relevant dans le cas des levures pathogènes puisque les cellules épithéliales humaines sont capables d'établir une défense antifongique directe par l'intermédiaire d'une signalisation médiée par TLR4⁵⁴². En parallèle, nos données montrent que les souris traitées de manière préventive par la chitine affichent également une augmentation de l'expression de la dectine-1, ce qui correspond avec des études

expérimentales montrant que la dectine-1 a aussi un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections à *Candida*^{398,399}. De surcroît, des souris déficientes en dectine-1 sont plus susceptibles aux infections à *Candida*^{115,400}. Ces données sont également à mettre en lien avec une autre étude sur des souris infectées par des promastigotes de *Leishmania major* qui met en évidence que des microparticules de chitine ou de chitosan, injectées par voie sous-cutanée, détiennent des effets immunothérapeutiques en permettant notamment de stimuler le système immunitaire afin de combattre et lutter efficacement contre l'infection causée par cet agent pathogène⁵⁴³.

Nos résultats obtenus par FACS, au cours de la procédure de traitement préventif par la chitine, montrent que la population des cellules T reg spléniques diminuent de manière significative lorsque les souris sont préalablement traitées. De même, les niveaux d'expression de FOXP3 au niveau du côlon diminuent significativement lorsque les souris sont prétraitées avec de la chitine. Ces résultats sont en cohérences avec les données d'une autre étude sur un modèle murin qui met en évidence que l'utilisation du chitosan comme adjuvant permet à la fois une augmentation de l'expression de TLR4 ainsi qu'une diminution du nombre de cellules CD4+CD25+FOXP3+Treg qui contribuent à la clairance immunitaire d'une infection par *H. pylori*. Dans cette même étude, les souris traitées avec du chitosan montrent une réduction significative de l'ARNm et du nombre de cellules FOXP3+ au sein de la muqueuse gastrique, ce qui altérerait la tolérance de la réponse immunitaire vis-à-vis de *H. pylori*, favorisant ainsi la clairance et l'élimination de ce pathogène⁴⁸⁸.

A l'issue du traitement préventif par la chitine, nous avons purifié les IgG totales des animaux. Nous les avons mis en présence des macrophages en vue d'étudier leurs propriétés immuno-modulatrices. Nos résultats montrent que les IgG sériques issues des souris traitées avec de la chitine, et non les IgG sériques issues de souris non traitées, possèdent de fortes propriétés anti-inflammatoires notamment en diminuant l'expression des TLRs activée par le LPS. Ces modulations de l'expression des récepteurs impliqués dans l'immunité se traduit par une diminution de l'expression de Myd88 et de NF- κ B, des médiateurs impliqués dans la voie de signalisation des TLRs, provoquant la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires qui en découlent comme l'IL-1 β et l'IL-6 par rapport aux macrophages exposés au LPS seul. Bien que les résultats ne concernent pas spécifiquement les

IgG anti-chitines, nos données sont en accord avec l'étude de Zhang Y *et al.*, dans laquelle des macrophages murins co-stimulés avec du LPS et des IgG montrent une diminution de l'expression de TLR4, du facteur de transcription NF- κ B et de la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6. De plus, ils mettent en évidence que cet événement dépend du récepteur Fc- γ RIIb qui joue un rôle critique dans la régulation négative des réponses immunitaires. En effet, leurs résultats mettent en évidence que la diminution de l'activation de NF- κ B et de l'expression de TLR4 se fait *via* l'activation de la voie de la protéine kinase A par la prostaglandine E2 dépendante de Fc- γ RIIb et pouvant contribuer à l'effet inhibiteur de ces IgG⁵⁴⁴. Il faut également souligner que les récepteurs Fc- γ R sont des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des IgG et peuvent induire des signaux inhibiteurs ou activateurs permettant de modérer la réponse des macrophages. D'ailleurs, ces récepteurs Fc- γ R contribuent justement à déterminer le seuil d'activation des cellules immunitaires *via* l'équilibre établi entre ceux qui sont activateurs et ceux qui sont inhibiteurs. En parallèle, une autre étude met en évidence que la variation de l'expression du récepteur Fc- γ RII est dépendante du récepteur PPAR γ ⁵⁴⁵. Ces données sont en cohérence avec nos résultats qui montrent que la stimulation de nos macrophages avec des IgG, issues des souris traitées avec la chitine, en présence de LPS permet d'augmenter l'expression du récepteur PPAR γ ainsi que de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par rapport aux macrophages stimulés uniquement par du LPS. De manière étonnante, l'ajout des IgG en présence de LPS augmente significativement l'expression de la cytokine TNF α par rapport aux macrophages stimulés uniquement par LPS. Cependant, ces données sont en accord avec l'étude de Vargas-Hernández O *et al.*, qui ont étudié l'interaction entre les récepteurs TLR4 et Fc- γ R sur des cellules THP-1, activées par du LPS seul ou en présence des IgG humaines. Dans cette étude, la co-stimulation par LPS et IgG amène à une augmentation significative de l'expression et de la production protéique de TNF α par rapport aux macrophages exposés uniquement au LPS. De surcroît, leurs données supportent le concept d'une interaction entre TLRs et Fc- γ R. Néanmoins, les auteurs de cette étude estiment que des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la ou les voies de signalisation intracellulaire affectées par l'interaction TLR4/Fc- γ R ainsi que pour mieux comprendre quel Fc- γ R en particulier y participe⁵⁴⁶.

Conclusions et perspectives

Ce travail confirme l'effet anti-inflammatoire de la chitine dans le modèle murin de colite chimio-induite par DSS notamment lorsque celle-ci est administrée par voie intra-péritonéale et de manière curative. Ce traitement permet une diminution significative des paramètres inflammatoires, de l'expression des récepteurs et des cytokines pro-inflammatoires impliqués dans les processus inflammatoires. Par ailleurs, ce traitement s'accompagne également d'une diminution de la charge fongique et de la charge bactérienne aérobie fécale qui tendent à retrouver les mêmes niveaux de colonisation que les souris sans inflammation (**Figure 57**).

Le deuxième volet de cette étude concerne l'utilisation, pour la première fois au sein de l'équipe, de la chitine en traitement préventif dans le modèle murin de colite chimio-induite. Nous avons établi que ce traitement permet de réduire drastiquement la colonisation par *C. glabrata* aussi bien chez les souris présentant une inflammation (colite) que chez les souris sans inflammation. Bien qu'il s'agisse d'un résultat déterminant, les mécanismes qui régissent la clairance fongique associés à ce traitement restent à explorer. Nos données mettent également en évidence qu'un traitement préventif permet d'induire des anticorps dirigés contre la chitine notamment dans le contexte d'une inflammation intestinale. Cependant et contrairement au traitement curatif, le traitement préventif ne permet pas de réduire l'inflammation intestinale notamment en termes de réduction des infiltrats leucocytaires, d'œdèmes ou de lésions épithéliales. Cette observation mérite d'être nuancée car la chitine qui a servi pour le traitement préventif a été additionnée d'un adjuvant dont l'activité immunomodulatrice pourrait interférer avec celle de la chitine (**Figure 58**).

Par la suite, nous avons purifié les IgG totales et détecté la présence d'anticorps dirigés contre la chitine (IgG anti-chitine) issus de souris traitées avec de la chitine. Le modèle des macrophages stimulés par LPS et exposés aux IgG anti-chitine révèle les propriétés anti-inflammatoires de ces anticorps ainsi que leur capacité à moduler l'expression de certains PRRs.

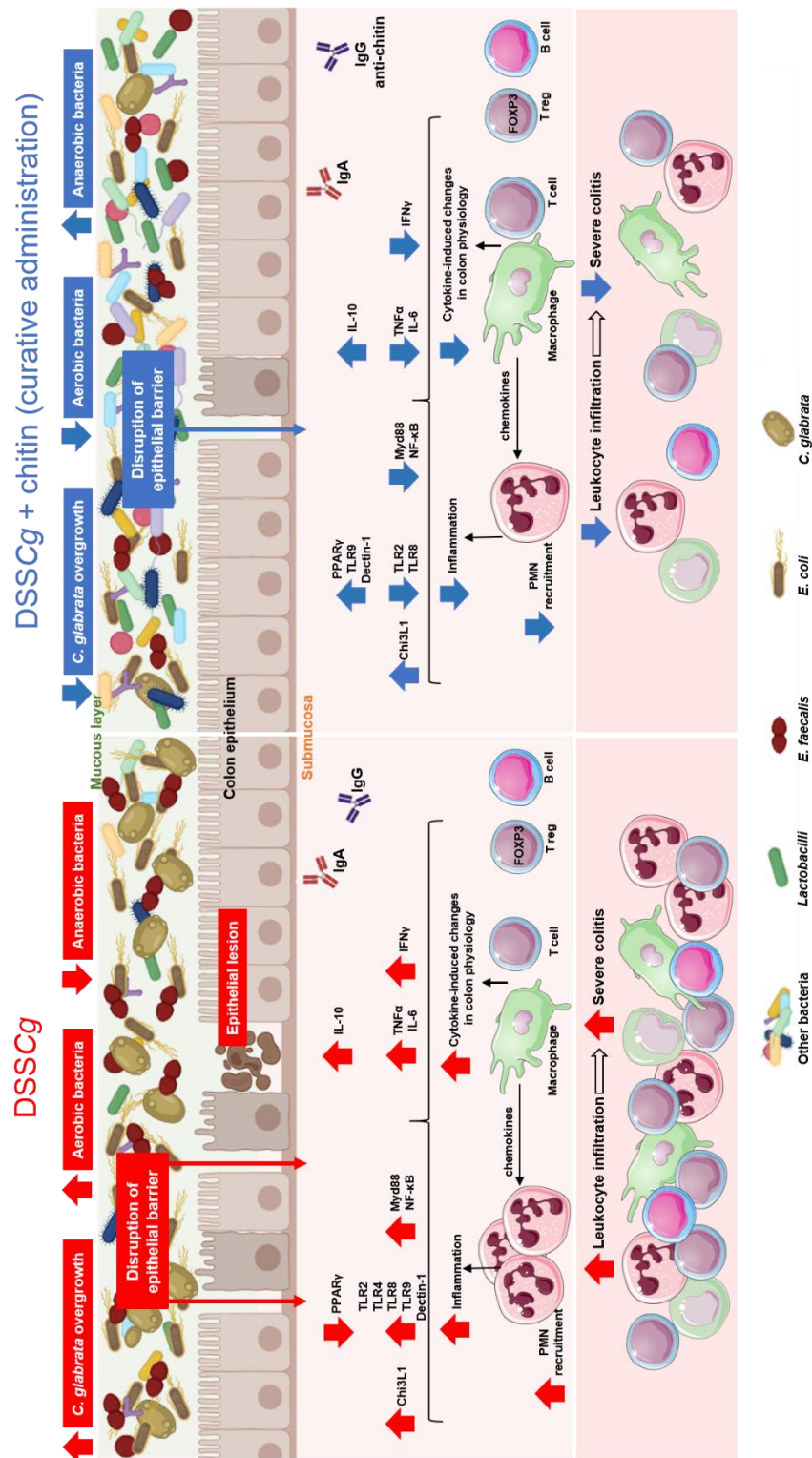


Figure 57 : Schéma de synthèse des effets d'une administration curative avec la chitine sur l'inflammation intestinale, le microbiote intestinal et la colonisation de *C. glabrata* dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS. Le panel de gauche (DSSCg) : Les souris atteintes de colite chimio-induite par DSS montrent une augmentation significative de leurs populations *E. coli*, *E. faecalis* et *C. glabrata* à l'inverse des populations en *Lactobacillus spp.* qui diminuent. Ces souris montrent des lésions épithéliales et des infiltrats leucocytaires au niveau de la muqueuse colique. Chez ces mêmes souris, la prolifération de *C. glabrata* provoque une augmentation des paramètres inflammatoires et une modulation de l'expression des récepteurs intestinaux et des voies de signalisation impliqués dans l'inflammation. D'ailleurs, la prolifération des pathobiontes opportunistes comme *C. glabrata*, *E. coli* et *E. faecalis* se traduit par une augmentation de l'expression de certains

récepteurs intestinaux dont les TLRs et la dectine-1. Cela engendre une activation de plusieurs facteurs de signalisation et molécules adaptatrices comme NF- κ B et Myd88. Cette inflammation et l'augmentation de ces pathogènes a pour conséquence une augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires. Cet état inflammatoire amène à une diminution de PPAR γ et à une augmentation de l'expression de la Chi3L1, un marqueur spécifiquement régulé à la hausse au cours de l'inflammation. Le panel de droite (DSSCg + chitin curative administration) : A contrario, les souris colonisées par *C. glabrata* sous DSS et traitées de manière curative par la chitine affichent une diminution du nombre de bactéries aérobies se traduisant par une diminution de l'expression des TLRs impliqués dans la reconnaissance et les réponses engagées contre ces microorganismes. En parallèle, l'augmentation des *Lactobacillus spp.* peut, en partie, expliquer la diminution de l'inflammation puisqu'elles sont connues pour posséder des propriétés anti-inflammatoires. Ces bactéries présentent également une activité chitinase permettant la dégradation de cette chitine. En effet, les oligosaccharides de chitine ont le potentiel d'induire la sécrétion d'IL-10 notamment par l'intermédiaire de TLR9, favorisant l'atténuation des réponses inflammatoires chez la souris. En présence du traitement, une augmentation de l'expression de la Chi3L1 est observée chez ces souris. Cette Chi3L1 serait impliquée dans la résolution de l'inflammation intestinale ainsi que dans la clairance bactérienne. L'ensemble de ces données est en cohérence avec la diminution des paramètres inflammatoires observés chez ces souris tout comme la diminution des lésions épithéliales et des infiltrats leucocytaires localisés dans le côlon. Ces données sont corrélées avec l'augmentation de l'expression de la dectine-1, connue pour exercer un rôle important dans la défense de l'hôte face aux infections à *Candida*. La partie « DSSCg » représente les résultats obtenus en présence des souris avec colite chimio-induite et comparés à ceux du groupe contrôle (CTL ; sans inflammation). La partie « DSSCg + chitin curative administration » représente les résultats obtenus en présence des souris avec colite chimio-induite et traitées de manière curative par la chitine et comparés à ceux du groupe colonisé par *C. glabrata* sous DSS (DCg). Une flèche dirigée vers le haut (\uparrow) représente une augmentation significative ; une flèche dirigée vers le bas (\downarrow) représente une diminution significative ; un signe « égal » (=) montre qu'il n'y a pas de variation significative.

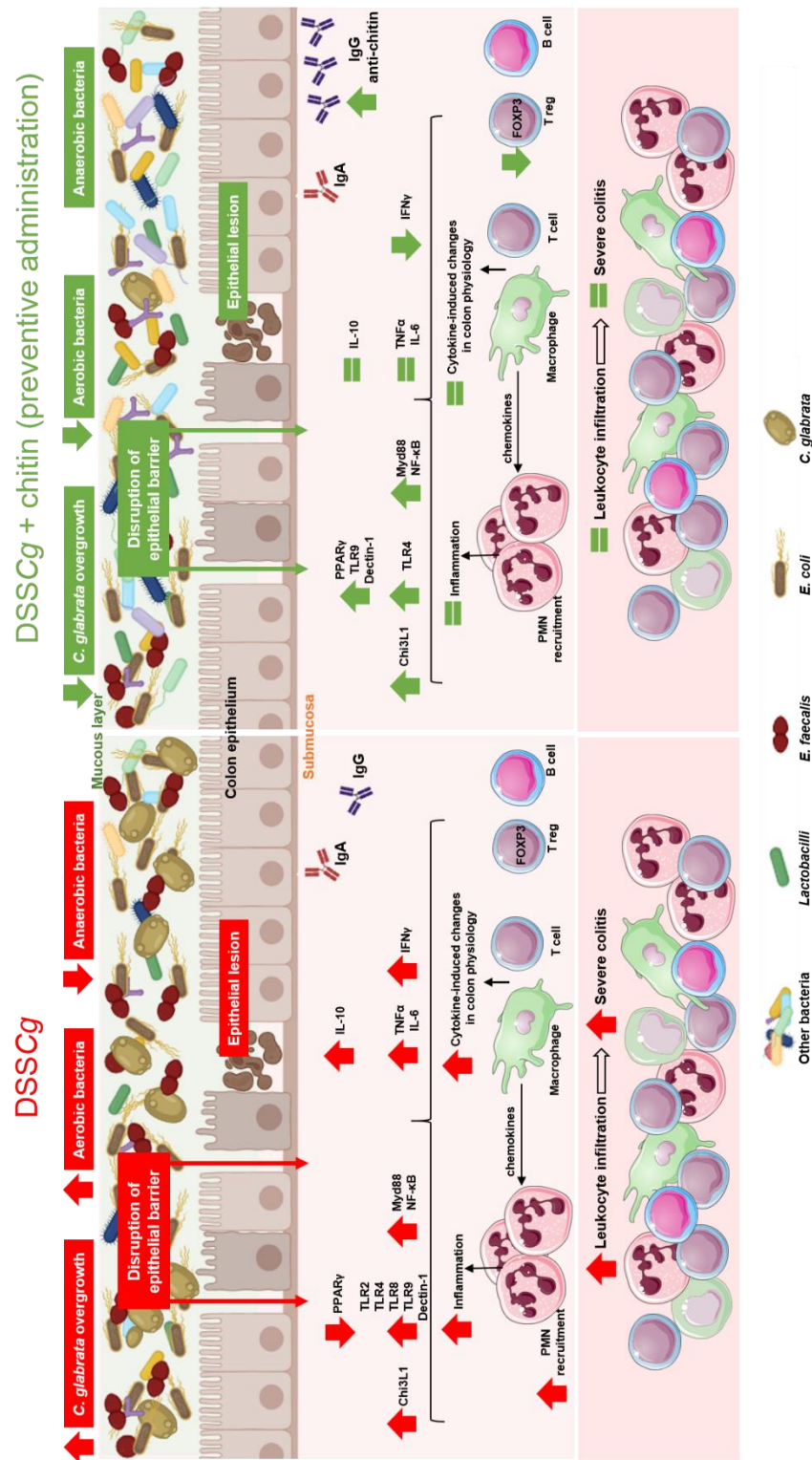


Figure 58 : Schéma de synthèse des effets d'une administration préventive avec la chitine sur l'inflammation intestinale, le microbiote intestinal et la colonisation de *C. glabrata* dans un modèle murin de colite chimio-induite par DSS. Le panel de gauche (DSSCg) : Les souris atteintes de colite chimio-induite par DSS montrent une augmentation significative de leurs populations *E. coli*, *E. faecalis* et *C. glabrata* à l'inverse des populations en *Lactobacillus spp.* qui diminuent. Ces souris montrent des lésions épithéliales et des infiltrats leucocytaires au niveau de la muqueuse colique. Chez ces mêmes souris, la prolifération de *C. glabrata* provoque une augmentation des paramètres inflammatoires et une modulation de l'expression des récepteurs intestinaux et des voies de signalisation impliqués dans l'inflammation. D'ailleurs, la prolifération des pathobiontes opportunistes comme *C. glabrata*, *E. coli* et *E. faecalis* se traduit par une augmentation de l'expression de certains

récepteurs intestinaux dont les TLRs et la dectine-1. Cela engendre une activation de plusieurs facteurs de signalisation et molécules adaptatrices comme NF- κ B et Myd88. Cette inflammation et l'augmentation de ces pathogènes a pour conséquence une augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires. Cet état inflammatoire amène à une diminution de PPAR γ et à une augmentation de l'expression de la Chi3L1, un marqueur spécifiquement régulé à la hausse au cours de l'inflammation. Le panel de droite (DSSCg + chitin preventive administration) : Les souris sous traitement préventif ne montrent pas d'atténuation de la colite comme le montre les paramètres inflammatoires, les lésions épithéliales ou encore les infiltrats leucocytaires localisés dans la muqueuse colique. Pour aller plus loin, ces souris montrent une augmentation de l'expression de TLR4, de NF- κ B, de Myd88 et le maintien d'une expression élevée des cytokines pro-inflammatoires. D'un autre côté, une diminution significative des espèces bactériennes pathogènes et de *C. glabrata* est observée chez ces souris. Ces observations peuvent être expliquées par une augmentation de l'expression de TLR4 connu pour être impliqué dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes et la protection face aux invasions fongiques. De surcroît, l'augmentation de l'expression de la dectine-1 participe également à la protection des souris face aux infections à *Candida*. Ces observations peuvent aussi être expliquées par la diminution du nombre de cellules T régulatrices spléniques et la réduction de l'expression de FOXP3 dans le côlon, favorisant la clairance et l'élimination des pathogènes. Au total, le traitement préventif avec la chitine ne semble pas favoriser l'atténuation de la colite mais permet une forte élimination de *C. glabrata*. De plus, ce traitement permet d'obtenir des anticorps dirigés contre la chitine et possédant des propriétés anti-inflammatoires. La partie « DSSCg » représente les résultats obtenus en présence des souris avec colite chimio-induite et comparés à ceux du groupe contrôle (CTL ; sans inflammation). La partie « DSSCg + chitin preventive administration » représente les résultats obtenus en présence des souris avec colite chimio-induite et traitées de manière préventive par la chitine et comparés à ceux du groupe colonisé par *C. glabrata* sous DSS (DCg). Une flèche dirigée vers le haut (\uparrow) représente une augmentation significative ; une flèche dirigée vers le bas (\downarrow) représente une diminution significative ; un signe « égal » (=) montre qu'il n'y a pas de variation significative.

Actuellement, nous envisageons de continuer à étudier l'effet des IgG anti-chitine sur les macrophages notamment dans la production des cytokines inflammatoires afin de mieux caractériser leur rôle dans la modulation de la réponse immuno-inflammatoire. L'effet du traitement préventif sur la colonisation à *C. glabrata* amène à envisager d'autres travaux pour comprendre les mécanismes qui participent à la clairance des cellules fongiques au niveau intestinal. Il s'agira notamment d'explorer si cette élimination des levures fait intervenir des anticorps neutralisants, des anticorps qui participent à l'inhibition de l'adhérence des cellules fongiques aux cellules épithéliales ou encore à la promotion des processus phagocytaires impliquant les effets immunomodulateurs de la chitine. Nous souhaitons également mieux comprendre les relations entre les cellules T régulatrices spléniques et les modalités de leur mobilisation au niveau de la muqueuse colique en vue de participer à la régulation de l'inflammation intestinale et au maintien de l'homéostasie intestinale.

Bibliographie

1. Ananthakrishnan, A. N. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **9**, 367–374 (2013).
2. Ruel, J., Ruane, D., Mehandru, S., Gower-Rousseau, C. & Colombel, J.-F. IBD across the age spectrum—is it the same disease? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 88–98 (2014).
3. Haag, L.-M. & Siegmund, B. Intestinal Microbiota and the Innate Immune System – A Crosstalk in Crohn’s Disease Pathogenesis. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
4. Bunu, D.-M. *et al.* Cardiovascular Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Diagnosis, and Preventive Strategies. *Gastroenterology Research and Practice* **2019**, 1–14 (2019).
5. Roda, G. *et al.* Crohn’s disease. *Nat Rev Dis Primers* **6**, 22 (2020).
6. Baumgart, D. C. & Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet* **369**, 1627–1640 (2007).
7. Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A. P. & Hashash, J. G. A comprehensive review and update on Crohn’s disease. *Dis Mon* **64**, 20–57 (2018).
8. Mak, W. Y., Zhao, M., Ng, S. C. & Burisch, J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *J Gastroenterol Hepatol* **35**, 380–389 (2020).
9. Crohn, B. B., Ginzburg, L. & Oppenheimer, G. D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med* **67**, 263–268 (2000).
10. Almeida, C. V. D., Camargo, M. R. de, Russo, E. & Amedei, A. Role of diet and gut microbiota on colorectal cancer immunomodulation. *WJG* **25**, 151–162 (2018).
11. Garrett, W. S. Cancer and the microbiota. *Science* **348**, 80–86 (2015).
12. Sendid, B. *et al.* Glycannes pariétaux de levures et anticorps spécifiques: Biomarqueurs et outils d’analyse physiopathologique des candidoses et de la maladie de Crohn. *Med Sci (Paris)* **25**, 473–482 (2009).

13. Standaert–Vitse, A. *et al.* Candida albicans Is an Immunogen for Anti–Saccharomyces cerevisiae Antibody Markers of Crohn’s Disease. *Gastroenterology* **130**, 1764–1775 (2006).
14. Standaert-Vitse, A. *et al.* Candida albicans Colonization and ASCA in Familial Crohn’s Disease. *Am J Gastroenterol* **104**, 1745–1753 (2009).
15. Charlet, R. *et al.* Remodeling of the Candida glabrata cell wall in the gastrointestinal tract affects the gut microbiota and the immune response. *Sci Rep* **8**, 3316 (2018).
16. Zhang, S.-L., Wang, S.-N. & Miao, C.-Y. Influence of Microbiota on Intestinal Immune System in Ulcerative Colitis and Its Intervention. *Front. Immunol.* **8**, 1674 (2017).
17. Hoarau, G. *et al.* Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn’s Disease. *mBio* **7**, (2016).
18. Hoffmann, T. W. *et al.* Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice. *ISME J* **10**, 460–477 (2016).
19. Charlet, R., Bortolus, C., Sendid, B. & Jawhara, S. Bacteroides thetaiotaomicron and Lactobacillus johnsonii modulate intestinal inflammation and eliminate fungi via enzymatic hydrolysis of the fungal cell wall. *Sci Rep* **10**, 11510 (2020).
20. Krzyściak, W. *et al.* Effect of a Lactobacillus Salivarius Probiotic on a Double-Species Streptococcus Mutans and Candida Albicans Caries Biofilm. *Nutrients* **9**, E1242 (2017).
21. Kivanç, M. & Er, S. Biofilm formation of Candida Spp. isolated from the vagina and antibiofilm activities of lactic acid bacteria on the these Candida Isolates. *Afr Health Sci* **20**, 641–648 (2020).
22. Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A. & Petersen, A. M. Escherichia coli Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol Reviews* **32**, e00060-18, /cmr/32/2/CMR.00060-18.atom (2019).
23. Shamooun, M., Martin, N. M. & O’Brien, C. L. Recent advances in gut Microbiota mediated therapeutic targets in inflammatory bowel diseases: Emerging modalities for future pharmacological implications. *Pharmacological Research* **148**, 104344 (2019).

24. Benchimol, E. I. *et al.* Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: A systematic review of international trends: *Inflammatory Bowel Diseases* **17**, 423–439 (2011).
25. Kaplan, G. G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 720–727 (2015).
26. Kaplan, G. G. & Ng, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **152**, 313–321.e2 (2017).
27. Ng, S. C. *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* **390**, 2769–2778 (2017).
28. Zeng, Z. *et al.* Incidence and clinical characteristics of inflammatory bowel disease in a developed region of Guangdong Province, China: A prospective population-based study: Incidence of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* **28**, 1148–1153 (2013).
29. Kim, H. J. *et al.* Incidence and Natural Course of Inflammatory Bowel Disease in Korea, 2006–2012: A Nationwide Population-based Study. *Inflammatory Bowel Diseases* **21**, 623–630 (2015).
30. Ananthakrishnan, A. N. *et al.* Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 39–49 (2018).
31. Song, E. M. *et al.* Incidence and Outcomes of Perianal Disease in an Asian Population with Crohn’s Disease: A Nationwide Population-Based Study. *Dig Dis Sci* **65**, 1189–1196 (2020).
32. Soon, I. S. *et al.* The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol* **12**, 51 (2012).
33. Gower-Rousseau, C. *et al.* Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988–1990). *Gut* **35**, 1433–1438 (1994).
34. Ghione, S. *et al.* Dramatic Increase in Incidence of Ulcerative Colitis and Crohn’s Disease (1988–2011): A Population-Based Study of French Adolescents. *Am J Gastroenterol* **113**, 265–272 (2018).
35. Fumery, M. *et al.* Long-term outcome of pediatric-onset Crohn’s disease: A population-based cohort study. *Dig Liver Dis* **51**, 496–502 (2019).

36. Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427–434 (2007).
37. Vavricka, S. R. *et al.* Frequency and Risk Factors for Extraintestinal Manifestations in the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort: *American Journal of Gastroenterology* **106**, 110–119 (2011).
38. Pushpanathan, P., Mathew, G. S., Selvarajan, S., Seshadri, K. G. & Srikanth, P. Gut Microbiota and Its Mysteries. *Indian Journal of Medical Microbiology* **37**, 268–277 (2019).
39. Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Crohn's disease. *Lancet* **380**, 1590–1605 (2012).
40. Ji, Q. *et al.* Design, synthesis and evaluation of novel quinazoline-2,4-dione derivatives as chitin synthase inhibitors and antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **22**, 3405–3413 (2014).
41. Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J. & Gil, A. 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 Research International* **2015**, 1–15 (2015).
42. Silverberg, M. S. *et al.* Toward an Integrated Clinical, Molecular and Serological Classification of Inflammatory Bowel Disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology* **19**, 5A-36A (2005).
43. Sendid, B. *et al.* Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**, 219–226 (1996).
44. Quinton, J. F. *et al.* Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* **42**, 788–791 (1998).
45. Spivak, J. *et al.* Antibodies to I2 predict clinical response to fecal diversion in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 1122–1130 (2006).
46. Ahmed, Z., Lysek, M., Zhang, N. & Malik, T. A. Association Between Serological Markers and Crohn's Disease Activity. *J Clin Med Res* **12**, 6–12 (2020).

47. Mitsuyama, K. *et al.* Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **22**, 1304–1310 (2016).
48. Marlicz, W., Skonieczna-Żydecka, K., Dabos, K. J., Łoniewski, I. & Koulaouzidis, A. Emerging concepts in non-invasive monitoring of Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol* **11**, 1756284818769076 (2018).
49. Sominen, H. K. *et al.* Blood-Derived DNA Methylation Signatures of Crohn's Disease and Severity of Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* **156**, 2254-2265.e3 (2019).
50. Lo Presti, A. *et al.* Fecal and Mucosal Microbiota Profiling in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol* **10**, 1655 (2019).
51. Guo, S. *et al.* A Simple Fecal Bacterial Marker Panel for the Diagnosis of Crohn's Disease. *Front Microbiol* **10**, 1306 (2019).
52. Lepage, P. Le microbiome digestif humain : interactions avec l'hôte et dysfonctions. *Revue des Maladies Respiratoires* **34**, 1085–1090 (2017).
53. Marion-Letellier, R., Savoye, G., Beck, P. L., Panaccione, R. & Ghosh, S. Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammatory Bowel Diseases: A Reappraisal of Effects and Therapeutic Approaches. *Inflammatory Bowel Diseases* **19**, 650–661 (2013).
54. Niccolai, E., Boem, F., Russo, E. & Amedei, A. The Gut–Brain Axis in the Neuropsychological Disease Model of Obesity: A Classical Movie Revised by the Emerging Director “Microbiome”. *Nutrients* **11**, 156 (2019).
55. Jarmakiewicz-Czaja, S., Piątek, D. & Filip, R. The Influence of Nutrients on Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Nutrition and Metabolism* **2020**, 1–14 (2020).
56. Scoville, E. A. *et al.* Serum Polyunsaturated Fatty Acids Correlate with Serum Cytokines and Clinical Disease Activity in Crohn's Disease. *Sci Rep* **9**, 2882 (2019).
57. O'Keefe, S. J. D. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 691–706 (2016).

58. Hviid, A., Svanström, H. & Frisch, M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut* **60**, 49–54 (2011).
59. Piovani, D. *et al.* Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* **157**, 647-659.e4 (2019).
60. Kaplan, G. G. *et al.* The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol* **105**, 2412–2419 (2010).
61. Ananthakrishnan, A. N., McGinley, E. L., Binion, D. G. & Saeian, K. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis* **17**, 1138–1145 (2011).
62. Pineton de Chambrun, G. *et al.* Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol* **7**, 589–601 (2014).
63. Parkes, G. C., Whelan, K. & Lindsay, J. O. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J Crohns Colitis* **8**, 717–725 (2014).
64. Harries, A. D., Baird, A. & Rhodes, J. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* **284**, 706 (1982).
65. Somerville, K. W., Logan, R. F., Edmond, M. & Langman, M. J. Smoking and Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* **289**, 954–956 (1984).
66. Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F. & Gendre, J. P. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* **120**, 1093–1099 (2001).
67. Cosnes, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**, 481–496 (2004).
68. Birrenbach, T. & Böcker, U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* **10**, 848–859 (2004).
69. Zuo, L. *et al.* Cigarette smoking is associated with intestinal barrier dysfunction in the small intestine but not in the large intestine of mice. *J Crohns Colitis* **8**, 1710–1722 (2014).

70. Allais, L. *et al.* Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. *Environ Microbiol* **18**, 1352–1363 (2016).
71. Huang, H. *et al.* Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature* **547**, 173–178 (2017).
72. Luo, Y. *et al.* Exploring the genetic architecture of inflammatory bowel disease by whole-genome sequencing identifies association at ADCY7. *Nat Genet* **49**, 186–192 (2017).
73. Uhlig, H. H. & Powrie, F. Translating Immunology into Therapeutic Concepts for Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 755–781 (2018).
74. Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E. & Järnerot, G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* **124**, 1767–1773 (2003).
75. Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F. & Peyrin-Biroulet, L. Crohn's disease. *The Lancet* **389**, 1741–1755 (2017).
76. Girardin, S. E. *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**, 8869–8872 (2003).
77. Gong, Q. *et al.* Structural basis of RIP2 activation and signaling. *Nat Commun* **9**, 4993 (2018).
78. Haile, P. A. *et al.* Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 2 (RIP2) Kinase Specific Clinical Candidate, 2-((4-(Benzo[*d*]thiazol-5-ylamino)-6-(*tert*-butylsulfonyl)quinazolin-7-yl)oxy)ethyl Dihydrogen Phosphate, for the Treatment of Inflammatory Diseases. *J. Med. Chem.* **62**, 6482–6494 (2019).
79. Ma, X. *et al.* NOD2 inhibits tumorigenesis and increases chemosensitivity of hepatocellular carcinoma by targeting AMPK pathway. *Cell Death Dis* **11**, 174 (2020).
80. Hugot, J. P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599–603 (2001).
81. Ogura, Y. *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 603–606 (2001).

82. Lavoie, S. *et al.* The Crohn's disease polymorphism, ATG16L1 T300A, alters the gut microbiota and enhances the local Th1/Th17 response. *eLife* **8**, e39982 (2019).
83. Hampe, J. *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* **39**, 207–211 (2007).
84. Leung, T.-F., Tang, N. L. S., Wong, G. W. K. & Fok, T.-F. CD14 and toll-like receptors: potential contribution of genetic factors and mechanisms to inflammation and allergy. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 169–175 (2005).
85. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
86. Taguchi, T., Mitcham, J. L., Dower, S. K., Sims, J. E. & Testa, J. R. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* **32**, 486–488 (1996).
87. Poltorak, A. *et al.* Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* **24**, 340–355 (1998).
88. Oostenbrug, L. E. *et al.* Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**, 567–575 (2005).
89. Tolentino, Y. F. M. *et al.* Common NOD2/CARD15 and TLR4 Polymorphisms Are Associated with Crohn's Disease Phenotypes in Southeastern Brazilians. *Dig Dis Sci* **61**, 2636–2647 (2016).
90. Zeissig, S. *et al.* Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* **56**, 61–72 (2007).
91. Söderman, J. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the region of *CLDN2-MORC4* in relation to inflammatory bowel disease. *WJG* **19**, 4935 (2013).
92. McGovern, D. P. B. *et al.* MAGI2 genetic variation and inflammatory bowel disease: *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 75–83 (2009).

93. Norén, E., Almer, S. & Söderman, J. Genetic variation and expression levels of tight junction genes identifies association between MAGI3 and inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol* **17**, 68 (2017).
94. Hahn-Strömberg, V. *et al.* Polymorphisms in the *CLDN1* and *CLDN7* genes are related to differentiation and tumor stage in colon carcinoma. *APMIS* **122**, 636–642 (2014).
95. Dhar, P. *et al.* Effect of MUC1 length polymorphisms on the NLRP3 inflammasome response of human macrophages. *Human Immunology* **80**, 878–882 (2019).
96. Gaboriau-Routhiau, V. & Cerf-Bensussan, N. Microbiote intestinale et développement du système immunitaire. *Med Sci (Paris)* **32**, 961–967 (2016).
97. Parronchi, P. *et al.* Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* **150**, 823–832 (1997).
98. Neurath, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **14**, 329–342 (2014).
99. Rahabi, M. *et al.* Divergent Roles for Macrophage C-type Lectin Receptors, Dectin-1 and Mannose Receptors, in the Intestinal Inflammatory Response. *Cell Rep* **30**, 4386-4398.e5 (2020).
100. Inoue, S. *et al.* Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. *Am J Gastroenterol* **94**, 2441–2446 (1999).
101. Russo, E. *et al.* Immunomodulating Activity and Therapeutic Effects of Short Chain Fatty Acids and Tryptophan Post-biotics in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* **10**, 2754 (2019).
102. Zhang, S.-L., Wang, S.-N. & Miao, C.-Y. Influence of Microbiota on Intestinal Immune System in Ulcerative Colitis and Its Intervention. *Front. Immunol.* **8**, 1674 (2017).
103. Lizasa, H., Ishihara, S., Richardo, T., Kanehiro, Y. & Yoshiyama, H. Dysbiotic infection in the stomach. *WJG* **21**, 11450 (2015).
104. Mukherjee, P. K. *et al.* Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 77–87 (2015).

105. Poulain, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology* **41**, 208–217 (2015).
106. Gow, N. A. R., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J. P. & Netea, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **10**, 112–122 (2012).
107. Alves, C. T. *et al.* *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect* **69**, 396–407 (2014).
108. Mota, S. *et al.* *Candida glabrata* susceptibility to antifungals and phagocytosis is modulated by acetate. *Front Microbiol* **6**, 919 (2015).
109. Sendid, B. *et al.* Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* **6**, 80 (2006).
110. Vermeire, S. *et al.* Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA), phenotypes of IBD, and intestinal permeability: a study in IBD families. *Inflamm Bowel Dis* **7**, 8–15 (2001).
111. Papp, M., Norman, G. L., Altorjay, I. & Lakatos, P. L. Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? *World J Gastroenterol* **13**, 2028–2036 (2007).
112. Papp, M., Altorjay, I. & Lakatos, P. L. [Relevance of serologic studies in inflammatory bowel diseases]. *Orv Hetil* **148**, 887–896 (2007).
113. Jawhara, S. *et al.* Colonization of Mice by *Candida albicans* Is Promoted by Chemically Induced Colitis and Augments Inflammatory Responses through Galectin-3. *J INFECT DIS* **197**, 972–980 (2008).
114. Jawhara, S. *et al.* Murine Model of Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis Reveals *Candida glabrata* Virulence and Contribution of β -Mannosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 11313–11324 (2012).
115. Iliev, I. D. *et al.* Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. *Science* **336**, 1314–1317 (2012).

116. Panpetch, W. *et al.* Additional *Candida albicans* administration enhances the severity of dextran sulfate solution induced colitis mouse model through leaky gut-enhanced systemic inflammation and gut-dysbiosis but attenuated by *Lactobacillus rhamnosus* L34. *Gut Microbes* **11**, 465–480 (2020).
117. Porter, J. R. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev* **40**, 260–269 (1976).
118. Hemmeter, J. C. *Diseases of the Intestines: Their Special Pathology, Diagnosis and Treatment*. (P. Blakiston's son & Company, 1901).
119. Shulman, S. T., Friedmann, H. C. & Sims, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis* **45**, 1025–1029 (2007).
120. Liang, D., Leung, R. K.-K., Guan, W. & Au, W. W. Involvement of gut microbiome in human health and disease: brief overview, knowledge gaps and research opportunities. *Gut Pathog* **10**, 3 (2018).
121. Agustí, A. *et al.* Interplay Between the Gut-Brain Axis, Obesity and Cognitive Function. *Front. Neurosci.* **12**, 155 (2018).
122. Rajilić-Stojanović, M. & de Vos, W. M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 996–1047 (2014).
123. Almeida, A. *et al.* A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* **568**, 499–504 (2019).
124. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
125. Larsson, E. *et al.* Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* **61**, 1124–1131 (2012).
126. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **14**, e1002533 (2016).

127. Nam, Y.-D., Jung, M.-J., Roh, S. W., Kim, M.-S. & Bae, J.-W. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One* **6**, e22109 (2011).
128. De Filippo, C. *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14691–14696 (2010).
129. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).
130. Liang, C. *et al.* Diversity and enterotype in gut bacterial community of adults in Taiwan. *BMC Genomics* **18**, 932 (2017).
131. Dhakan, D. B. *et al.* The unique composition of Indian gut microbiome, gene catalogue, and associated fecal metabolome deciphered using multi-omics approaches. *GigaScience* **8**, (2019).
132. Turnbaugh, P. J. *et al.* The human microbiome project. *Nature* **449**, 804–810 (2007).
133. Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F. & Braesco, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine,” held in Paris, June 14, 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition* **78**, 675–683 (2003).
134. Riaz Rajoka, M. S. *et al.* Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Science and Human Wellness* **6**, 121–130 (2017).
135. Yatsunenko, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227 (2012).
136. Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* **5**, e177 (2007).
137. Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. & Akkermans, A. D. L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* **68**, 219–226 (2002).
138. Pessione, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Inf. Microbio.* **2**, (2012).

139. Penders, J. *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**, 511–521 (2006).
140. Milani, C. *et al.* The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* **81**, (2017).
141. Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915–1920 (2005).
142. Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R. & Gordon, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* **6**, 776–788 (2008).
143. Ley, R. E. *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**, 1647–1651 (2008).
144. Cryan, J. F. & Dinan, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* **13**, 701–712 (2012).
145. Jakobsson, H. E. *et al.* The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep* **16**, 164–177 (2015).
146. Landman, C. & Quévrain, E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne* **37**, 418–423 (2016).
147. Wostmann, B. S. The germfree animal in nutritional studies. *Annu Rev Nutr* **1**, 257–279 (1981).
148. Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S. & Okada, Y. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* **79**, 32–37 (1993).
149. Schnupf, P. *et al.* Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro. *Nature* **520**, 99–103 (2015).
150. Gaboriau-Routhiau, V. *et al.* The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* **31**, 677–689 (2009).
151. Lécuyer, E. *et al.* Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity* **40**, 608–620 (2014).

152. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 12204–12209 (2010).
153. Surana, N. K. & Kasper, D. L. The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from *B. fragilis* PSA: Immunomodulatory effects of *B. fragilis* PSA. *Immunological Reviews* **245**, 13–26 (2012).
154. Tai, N., Wong, F. S. & Wen, L. The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity. *Rev Endocr Metab Disord* **16**, 55–65 (2015).
155. Fan, Y. & Pedersen, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* **19**, 55–71 (2021).
156. Tremaroli, V. & Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242–249 (2012).
157. Drouault-Holowacz, S. *et al.* A double blind randomized controlled trial of a probiotic combination in 100 patients with irritable bowel syndrome. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **32**, 147–152 (2008).
158. Piche, T. Anomalies pariétales et de la flore au cours du syndrome de l’intestin irritable. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **33**, S40–S47 (2009).
159. Sobhani, I. *et al.* Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *PLoS ONE* **6**, e16393 (2011).
160. Russo, E. *et al.* Preliminary Comparison of Oral and Intestinal Human Microbiota in Patients with Colorectal Cancer: A Pilot Study. *Front. Microbiol.* **8**, 2699 (2018).
161. Manichanh, C. *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**, 205–211 (2006).
162. Ott, S. J. *et al.* Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 685–693 (2004).

163. Kowalska-Duplaga, K. *et al.* Differences in the intestinal microbiome of healthy children and patients with newly diagnosed Crohn's disease. *Sci Rep* **9**, 18880 (2019).
164. Dong, L.-N., Wang, M., Guo, J. & Wang, J.-P. Role of intestinal microbiota and metabolites in inflammatory bowel disease. *Chinese Medical Journal* **132**, 1610–1614 (2019).
165. Kelly, C. P. & LaMont, J. T. *Clostridium difficile* — More Difficult Than Ever. *N Engl J Med* **359**, 1932–1940 (2008).
166. Lyras, D. *et al.* Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* **458**, 1176–1179 (2009).
167. Carter, G. P., Rood, J. I. & Lyras, D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: Past and present perspectives. *Gut Microbes* **1**, 58–64 (2010).
168. Singh, H. *et al.* Higher Incidence of *Clostridium difficile* Infection Among Individuals With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **153**, 430-438.e2 (2017).
169. Dieterle, M. G. & Young, V. B. Reducing Recurrence of *C. difficile* Infection. *Cell* **169**, 375 (2017).
170. Giaffer, M. H., Holdsworth, C. D. & Duerden, B. I. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **33**, 646–650 (1992).
171. Bielaszewska, M. *et al.* Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. *EMBO Mol Med* **6**, 347–357 (2014).
172. Rivera-Chávez, F. *et al.* Salmonella Uses Energy Taxits to Benefit from Intestinal Inflammation. *PLoS Pathog* **9**, e1003267 (2013).
173. Ormsby, M. J. *et al.* Inflammation associated ethanolamine facilitates infection by Crohn's disease-linked adherent-invasive *Escherichia coli*. *EBioMedicine* **43**, 325–332 (2019).
174. Zhou, Y. *et al.* Increased *Enterococcus faecalis* infection is associated with clinically active Crohn disease. *Medicine* **95**, e5019 (2016).
175. Balish, E. & Warner, T. *Enterococcus faecalis* Induces Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10 Knockout Mice. *The American Journal of Pathology* **160**, 2253–2257 (2002).

176. Abubakar, I., Myhill, D., Aliyu, S. H. & Hunter, P. R. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: A systematic review and meta-analysis: *Inflammatory Bowel Diseases* **14**, 401–410 (2008).
177. Strauss, J. *et al.* Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host: *Inflammatory Bowel Diseases* **17**, 1971–1978 (2011).
178. Schultz, B. M. *et al.* A Potential Role of *Salmonella* Infection in the Onset of Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
179. Kirk, K. F. *et al.* Molecular epidemiology and comparative genomics of *Campylobacter concisus* strains from saliva, faeces and gut mucosal biopsies in inflammatory bowel disease. *Sci Rep* **8**, 1902 (2018).
180. Suau, A. *et al.* *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst Appl Microbiol* **24**, 139–145 (2001).
181. Hold, G. L., Schwiertz, A., Aminov, R. I., Blaut, M. & Flint, H. J. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4320–4324 (2003).
182. Martín, R. *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol* **15**, 67 (2015).
183. Martín, R. *et al.* The Commensal Bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* Is Protective in DNBS-induced Chronic Moderate and Severe Colitis Models: *Inflammatory Bowel Diseases* **20**, 417–430 (2014).
184. Sokol, H. *et al.* Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota: *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 1183–1189 (2009).
185. Machiels, K. *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275–1283 (2014).

186. Varela, E. *et al.* Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **38**, 151–161 (2013).
187. Blandford, L. E., Johnston, E. L., Sanderson, J. D., Wade, W. G. & Lax, A. J. Promoter orientation of the immunomodulatory *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide A (PSA) is off in individuals with inflammatory bowel disease (IBD). *Gut Microbes* **10**, 569–577 (2019).
188. Hudcovic, T. *et al.* Monocolonization with *Bacteroides ovatus* protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long-lasting dextran sodium sulfate treatment. *Physiol Res* **58**, 101–110 (2009).
189. Delday, M., Mulder, I., Logan, E. T. & Grant, G. *Bacteroides thetaiotaomicron* Ameliorates Colon Inflammation in Preclinical Models of Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **25**, 85–96 (2019).
190. Bamba, T., Matsuda, H., Endo, M. & Fujiyama, Y. The pathogenic role of *Bacteroides vulgatus* in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* **30 Suppl 8**, 45–47 (1995).
191. Shiba, T. *et al.* The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol* **47**, 371–378 (2003).
192. Imaoka, A. *et al.* Anti-inflammatory activity of probiotic Bifidobacterium: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol* **14**, 2511–2516 (2008).
193. Kato, K. *et al.* Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **20**, 1133–1141 (2004).
194. Tursi, A. *et al.* Treatment of Relapsing Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis With the Probiotic VSL#3 as Adjunctive to a Standard Pharmaceutical Treatment: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *American Journal of Gastroenterology* **105**, 2218–2227 (2010).
195. Lee, J.-H. *et al.* Lactobacillus *suntoryeus* inhibits pro-inflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF- κ B activation in experimental colitis. *Int J Colorectal Dis* **24**, 231–237 (2009).

196. Eun, S.-H., Lim, S.-M., Jang, S.-E., Han, M. J. & Kim, D.-H. *Lactobacillus sakei* K17, an inducer of IL-10 expression in antigen-presenting cells, attenuates TNBS-induced colitis in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **38**, 447–454 (2016).
197. Singh, A. K., Hertzberger, R. Y. & Knaus, U. G. Hydrogen peroxide production by lactobacilli promotes epithelial restitution during colitis. *Redox Biology* **16**, 11–20 (2018).
198. Di Giacinto, C., Marinaro, M., Sanchez, M., Strober, W. & Boirivant, M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* **174**, 3237–3246 (2005).
199. Bortolus, C. *et al.* A Small Aromatic Compound Has Antifungal Properties and Potential Anti-Inflammatory Effects against Intestinal Inflammation. *IJMS* **20**, 321 (2019).
200. Matsubara, V. H., Wang, Y., Bandara, H. M. H. N., Mayer, M. P. A. & Samaranayake, L. P. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 6415–6426 (2016).
201. Salazar, O. & Asenjo, J. A. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol Lett* **29**, 985–994 (2007).
202. Cuskin, F. *et al.* Human gut Bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. *Nature* **517**, 165–169 (2015).
203. Morales, D. K. *et al.* Control of *Candida albicans* Metabolism and Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* Phenazines. *mBio* **4**, (2013).
204. Geirnaert, A. *et al.* Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity. *Sci Rep* **7**, 11450 (2017).
205. Sun, M., Wu, W., Liu, Z. & Cong, Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* **52**, 1–8 (2017).

206. Groen, R. N., de Clercq, N. C., Nieuwdorp, M., Hoenders, H. J. R. & Groen, A. K. Gut microbiota, metabolism and psychopathology: A critical review and novel perspectives. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **55**, 283–293 (2018).
207. Storr, M., Vogel, H. J. & Schicho, R. Metabolomics: is it useful for inflammatory bowel diseases? *Current Opinion in Gastroenterology* **29**, 378–383 (2013).
208. Velagapudi, V. R. *et al.* The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *Journal of Lipid Research* **51**, 1101–1112 (2010).
209. Kindt, A. *et al.* The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice. *Nat Commun* **9**, 3760 (2018).
210. Schoeler, M. & Caesar, R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* **20**, 461–472 (2019).
211. Baur, P. *et al.* Metabolic Phenotyping of the Crohn's Disease-like IBD Etiopathology in the TNF $\Delta^{ARE/WT}$ Mouse Model. *J. Proteome Res.* **10**, 5523–5535 (2011).
212. Lu, K., Knutson, C. G., Wishnok, J. S., Fox, J. G. & Tannenbaum, S. R. Serum Metabolomics in a *Helicobacter hepaticus* Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease Reveal Important Changes in the Microbiome, Serum Peptides, and Intermediary Metabolism. *J. Proteome Res.* **11**, 4916–4926 (2012).
213. Schicho, R. *et al.* Quantitative Metabolomic Profiling of Serum and Urine in DSS-Induced Ulcerative Colitis of Mice by ^1H NMR Spectroscopy. *J. Proteome Res.* **9**, 6265–6273 (2010).
214. Murdoch, T. B. *et al.* Urinary Metabolic Profiles of Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10 Gene-Deficient Mice. *Anal. Chem.* **80**, 5524–5531 (2008).
215. Le Gall, G. *et al.* Metabolomics of Fecal Extracts Detects Altered Metabolic Activity of Gut Microbiota in Ulcerative Colitis and Irritable Bowel Syndrome. *J. Proteome Res.* **10**, 4208–4218 (2011).
216. Stephens, N. S. *et al.* Urinary NMR metabolomic profiles discriminate inflammatory bowel disease from healthy. *Journal of Crohn's and Colitis* **7**, e42–e48 (2013).

217. Lavelle, A. & Sokol, H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **17**, 223–237 (2020).
218. Schicho, R. *et al.* Quantitative Metabolomic Profiling of Serum, Plasma, and Urine by ¹H NMR Spectroscopy Discriminates between Patients with Inflammatory Bowel Disease and Healthy Individuals. *J. Proteome Res.* **11**, 3344–3357 (2012).
219. Jansson, J. *et al.* Metabolomics Reveals Metabolic Biomarkers of Crohn's Disease. *PLoS ONE* **4**, e6386 (2009).
220. Franzosa, E. A. *et al.* Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol* **4**, 293–305 (2019).
221. Sugimoto, S., Naganuma, M. & Kanai, T. Indole compounds may be promising medicines for ulcerative colitis. *J Gastroenterol* **51**, 853–861 (2016).
222. Nikolaus, S. *et al.* Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **153**, 1504-1516.e2 (2017).
223. Zou, M.-H. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation and immune activation. *Front Biosci* **20**, 1116–1143 (2015).
224. Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G. & Clarke, G. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis. *Neuropharmacology* **112**, 399–412 (2017).
225. PubChem. Tryptophan. *National Library of Medicine*
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6305> (2004).
226. Clayton, P. T. *et al.* Pellagra with colitis due to a defect in tryptophan metabolism. *Eur J Pediatr* **150**, 498–502 (1991).
227. Gupta, N. K. *et al.* Serum Analysis of Tryptophan Catabolism Pathway: Correlation With Crohn's Disease Activity: *Inflammatory Bowel Diseases* **18**, 1214–1220 (2012).
228. Monteleone, I. *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology* **141**, 237-248.e1 (2011).

229. Alexeev, E. E. *et al.* Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *The American Journal of Pathology* **188**, 1183–1194 (2018).
230. Hashimoto, T. *et al.* ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* **487**, 477–481 (2012).
231. Kalish, B. T., Fallon, E. M. & Puder, M. A Tutorial on Fatty Acid Biology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **36**, 380–388 (2012).
232. Calder, P. C. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **39**, 18S-32S (2015).
233. Abedi, E. & Sahari, M. A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci Nutr* **2**, 443–463 (2014).
234. Hawkesworth, S. *et al.* Feeding the world healthily: the challenge of measuring the effects of agriculture on health. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**, 3083–3097 (2010).
235. Hoffman, S., Alvares, D. & Adeli, K. Intestinal lipogenesis: how carbs turn on triglyceride production in the gut. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **22**, 284–288 (2019).
236. Kimura, I., Ichimura, A., Ohue-Kitano, R. & Igarashi, M. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiological Reviews* **100**, 171–210 (2020).
237. Tvrzicka, E., Kremmyda, L.-S., Stankova, B. & Zak, A. FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE - A REVIEW. PART 1: CLASSIFICATION, DIETARY SOURCES AND BIOLOGICAL FUNCTIONS. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **155**, 117–130 (2011).
238. Huang, C. B., Alimova, Y., Myers, T. M. & Ebersole, J. L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology* **56**, 650–654 (2011).
239. Schönfeld, P. & Wojtczak, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of Lipid Research* **57**, 943–954 (2016).

240. Machate, D. J. *et al.* Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis. *IJMS* **21**, 4093 (2020).
241. Oteng, A.-B. & Kersten, S. Mechanisms of Action of trans Fatty Acids. *Advances in Nutrition* **11**, 697–708 (2020).
242. Estadella, D. *et al.* Lipotoxicity: Effects of Dietary Saturated and Transfatty Acids. *Mediators of Inflammation* **2013**, 1–13 (2013).
243. Wanders, A., Zock, P. & Brouwer, I. Trans Fat Intake and Its Dietary Sources in General Populations Worldwide: A Systematic Review. *Nutrients* **9**, 840 (2017).
244. Hillgartner, F. B., Salati, L. M. & Goodridge, A. G. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiological Reviews* **75**, 47–76 (1995).
245. Ferré, P. & Foufelle, F. SREBP-1c Transcription Factor and Lipid Homeostasis: Clinical Perspective. *Horm Res Paediatr* **68**, 72–82 (2007).
246. Butterworth, P. J. *Lehninger: principles of biochemistry* (4th edn) D. L. Nelson and M. C. Cox, W. H. Freeman & Co., New York, 1119 pp (plus 17 pp glossary), ISBN 0-7167-4339-6 (2004). *Cell Biochem. Funct.* **23**, 293–294 (2005).
247. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. (W.H. Freeman, 2005).
248. Yoshida, K. *et al.* Bacterial Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids: Their Biosynthetic Genes, Functions, and Practical Use. *Marine Drugs* **14**, 94 (2016).
249. Smith, S. & Tsai, S.-C. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1041 (2007).
250. McGarry, J. D. & Foster, D. W. Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 395–420 (1980).
251. Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J. & Bäckhed, F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host & Microbe* **23**, 705–715 (2018).

252. Camacho, S. & Ruppel, A. Is the calorie concept a real solution to the obesity epidemic? *Global Health Action* **10**, 1289650 (2017).
253. Choquet, H. & Meyre, D. Genetics of Obesity: What have we Learned? *CG* **12**, 169–179 (2011).
254. Elmadfa, I. & Freisling, H. Fat intake, diet variety and health promotion. *Forum Nutr* 1–10 (2005).
255. Forouhi, N. G., Krauss, R. M., Taubes, G. & Willett, W. Dietary fat and cardiometabolic health: evidence, controversies, and consensus for guidance. *BMJ* k2139 (2018) doi:10.1136/bmj.k2139.
256. Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M. & Kim, C. H. Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice. *Gastroenterology* **145**, 396-406.e10 (2013).
257. Ohira, H., Tsutsui, W. & Fujioka, Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb* **24**, 660–672 (2017).
258. Cummings, J. H. & Macfarlane, G. T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 443–459 (1991).
259. Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E. & Spector, T. D. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* k2179 (2018) doi:10.1136/bmj.k2179.
260. Topping, D. L. & Clifton, P. M. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews* **81**, 1031–1064 (2001).
261. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **165**, 1332–1345 (2016).
262. Ruppin, H., Bar-Meir, S., Soergel, K. H., Wood, C. M. & Schmitt, M. G. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* **78**, 1500–1507 (1980).
263. Bloemen, J. G. *et al.* Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clin Nutr* **28**, 657–661 (2009).

264. Davie, J. R. Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *The Journal of Nutrition* **133**, 2485S-2493S (2003).
265. Ueyama, J. *et al.* Freeze-drying enables homogeneous and stable sample preparation for determination of fecal short-chain fatty acids. *Analytical Biochemistry* **589**, 113508 (2020).
266. Chen, H.-M. *et al.* Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *The American Journal of Clinical Nutrition* **97**, 1044–1052 (2013).
267. Borges Canha, M. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig* **107**, (2015).
268. Smith, P. M. *et al.* The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* **341**, 569–573 (2013).
269. Hu, Y. *et al.* Manipulation of the gut microbiota using resistant starch is associated with protection against colitis-associated colorectal cancer in rats. *CARCIN* **37**, 366–375 (2016).
270. Felice, C., Lewis, A., Armuzzi, A., Lindsay, J. O. & Silver, A. Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* **41**, 26–38 (2015).
271. Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, 451–455 (2013).
272. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–450 (2013).
273. Vernia, P. *et al.* Fecal Lactate and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **95**, 1564–1568 (1988).
274. Takaishi, H. *et al.* Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *International Journal of Medical Microbiology* **298**, 463–472 (2008).
275. Marchesi, J. R. *et al.* Rapid and Noninvasive Metabonomic Characterization of Inflammatory Bowel Disease. *J. Proteome Res.* **6**, 546–551 (2007).

276. Sokol, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 16731–16736 (2008).
277. Pierantonelli, I. *et al.* Author Correction: Lack of NLRP3-inflammasome leads to gut-liver axis derangement, gut dysbiosis and a worsened phenotype in a mouse model of NAFLD. *Sci Rep* **7**, 17568 (2017).
278. Martínez-López, M. *et al.* Microbiota Sensing by Mincle-Syk Axis in Dendritic Cells Regulates Interleukin-17 and -22 Production and Promotes Intestinal Barrier Integrity. *Immunity* **50**, 446-461.e9 (2019).
279. Macfarlane, G. T. & Macfarlane, S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol* **45 Suppl**, S120-127 (2011).
280. Jackman, J. A., Boyd, R. D. & Elrod, C. C. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. *J Animal Sci Biotechnol* **11**, 44 (2020).
281. Cera, K. R., Mahan, D. C. & Reinhart, G. A. Apparent Fat Digestibilities and Performance Responses of Postweaning Swine Fed Diets Supplemented with Coconut Oil, Corn Oil or Tallow. *Journal of Animal Science* **67**, 2040 (1989).
282. Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J., Vicha, R. & Mlcek, J. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *IJMS* **16**, 12871–12890 (2015).
283. Gardner, A. *et al.* Changes in Fatty Acid Composition of Human Milk in Response to Cold-Like Symptoms in the Lactating Mother and Infant. *Nutrients* **9**, 1034 (2017).
284. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 799–809 (2009).

285. Martínez-Vallespín, B., Vahjen, W. & Zentek, J. Effects of medium-chain fatty acids on the structure and immune response of IPEC-J2 cells. *Cytotechnology* **68**, 1925–1936 (2016).
286. Zhang, M. S., Sandouk, A. & Houtman, J. C. D. Glycerol Monolaurate (GML) inhibits human T cell signaling and function by disrupting lipid dynamics. *Sci Rep* **6**, 30225 (2016).
287. Zhang, M. S. *et al.* Glycerol monolaurate induces filopodia formation by disrupting the association between LAT and SLP-76 microclusters. *Sci. Signal.* **11**, eaam9095 (2018).
288. Yoon, B., Jackman, J., Valle-González, E. & Cho, N.-J. Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *IJMS* **19**, 1114 (2018).
289. Jackman, J. A., Shi, P.-Y. & Cho, N.-J. Targeting the Achilles Heel of Mosquito-Borne Viruses for Antiviral Therapy. *ACS Infect. Dis.* **5**, 4–8 (2019).
290. Seaton, T. B., Welle, S. L., Warenko, M. K. & Campbell, R. G. Thermic effect of medium-chain and long-chain triglycerides in man. *The American Journal of Clinical Nutrition* **44**, 630–634 (1986).
291. Aoyama, T., Nosaka, N. & Kasai, M. Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids. *J. Med. Invest.* **54**, 385–388 (2007).
292. Zentek, J., Buchheit-Renko, S., Männer, K., Pieper, R. & Vahjen, W. Intestinal concentrations of free and encapsulated dietary medium-chain fatty acids and effects on gastric microbial ecology and bacterial metabolic products in the digestive tract of piglets. *Archives of Animal Nutrition* **66**, 14–26 (2012).
293. Lee, S. I. & Kang, K. S. Function of capric acid in cyclophosphamide-induced intestinal inflammation, oxidative stress, and barrier function in pigs. *Sci Rep* **7**, 16530 (2017).
294. Wang, J. *et al.* Caprylic acid and nonanoic acid upregulate endogenous host defense peptides to enhance intestinal epithelial immunological barrier function via histone deacetylase inhibition. *International Immunopharmacology* **65**, 303–311 (2018).
295. Zhou, S. *et al.* Effects of Medium- and Long-Chain Triacylglycerols on Lipid Metabolism and Gut Microbiota Composition in C57BL/6J Mice. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 6599–6607 (2017).

296. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023 (2006).
297. Mathur, R. & Barlow, G. M. Obesity and the microbiome. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* **9**, 1087–1099 (2015).
298. Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host & Microbe* **3**, 213–223 (2008).
299. Fukuda, S. *et al.* Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543–547 (2011).
300. Ossa, J. C. *et al.* Intestinal Inflammation in Chilean Infants Fed With Bovine Formula vs. Breast Milk and Its Association With Their Gut Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 190 (2018).
301. Azad, Md. A. K., Sarker, M., Li, T. & Yin, J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed Research International* **2018**, 1–8 (2018).
302. Zhang, Y.-J. *et al.* Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *IJMS* **16**, 7493–7519 (2015).
303. Ma, C., Vasu, R. & Zhang, H. The Role of Long-Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of Inflammation* **2019**, 1–10 (2019).
304. Lundman, P. *et al.* A high-fat meal is accompanied by increased plasma interleukin-6 concentrations. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **17**, 195–202 (2007).
305. Ghezzal, S. *et al.* Palmitic acid damages gut epithelium integrity and initiates inflammatory cytokine production. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1865**, 158530 (2020).
306. Kim, K.-A., Gu, W., Lee, I.-A., Joh, E.-H. & Kim, D.-H. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. *PLoS ONE* **7**, e47713 (2012).

307. Huang, E. Y. *et al.* Composition of Dietary Fat Source Shapes Gut Microbiota Architecture and Alters Host Inflammatory Mediators in Mouse Adipose Tissue. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **37**, 746–754 (2013).
308. Rioux, V., Pédrone, F. & Legrand, P. Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations. *Biochim Biophys Acta* **1811**, 1–8 (2011).
309. Piccinin, E. *et al.* Role of Oleic Acid in the Gut-Liver Axis: From Diet to the Regulation of Its Synthesis via Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1). *Nutrients* **11**, 2283 (2019).
310. Bermudez, B. *et al.* Oleic Acid in Olive Oil: From a Metabolic Framework Toward a Clinical Perspective. *Current Pharmaceutical Design* **17**, 831–843 (2011).
311. Sansone, A. *et al.* Hexadecenoic Fatty Acid Isomers in Human Blood Lipids and Their Relevance for the Interpretation of Lipidomic Profiles. *PLoS One* **11**, e0152378 (2016).
312. Ramakers, J. D., Mensink, R. P., Schaart, G. & Plat, J. Arachidonic Acid but not Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Oleic Acid Activates NF- κ B and Elevates ICAM-1 Expression in Caco-2 Cells. *Lipids* **42**, 687–698 (2007).
313. Verlengia, R. *et al.* Effect of arachidonic acid on proliferation, cytokines production and pleiotropic genes expression in Jurkat cells—A comparison with oleic acid. *Life Sciences* **73**, 2939–2951 (2003).
314. Martins de Lima-Salgado, T., Coccuzzo Sampaio, S., Fernanda Cury-Boaventura, M. & Curi, R. Modulatory effect of fatty acids on fungicidal activity, respiratory burst and TNF- α and IL-6 production in J774 murine macrophages. *Br J Nutr* **105**, 1173–1179 (2011).
315. Padovese, R. & Curi, R. Modulation of rat neutrophil function in vitro by cis- and trans-MUFA. *BJN* **101**, 1351 (2009).
316. Harvey, K. A. *et al.* Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *Journal of Lipid Research* **51**, 3470–3480 (2010).

317. Nishida, T. *et al.* Increased arachidonic acid composition of phospholipids in colonic mucosa from patients with active ulcerative colitis. *Gut* **28**, 1002–1007 (1987).
318. Lands, B. Historical perspectives on the impact of n-3 and n-6 nutrients on health. *Progress in Lipid Research* **55**, 17–29 (2014).
319. Ajabnoor, S. M., Thorpe, G., Abdelhamid, A. & Hooper, L. Long-term effects of increasing omega-3, omega-6 and total polyunsaturated fats on inflammatory bowel disease and markers of inflammation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Nutr* **60**, 2293–2316 (2021).
320. Harwood, J. L. *et al.* *Lipids: biology and health*. (John Wiley & Sons Inc, 2016).
321. Scaioli, E., Liverani, E. & Belluzzi, A. The Imbalance between n-6/n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review and Future Therapeutic Perspectives. *IJMS* **18**, 2619 (2017).
322. Harwood, J. Algae: Critical Sources of Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Biomolecules* **9**, 708 (2019).
323. Serhan, C. N. *et al.* Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 15–23 (2009).
324. Hassan, A. *et al.* An α -Linolenic Acid-Rich Formula Reduces Oxidative Stress and Inflammation by Regulating NF- κ B in Rats with TNBS-Induced Colitis. *The Journal of Nutrition* **140**, 1714–1721 (2010).
325. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors and. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 4318–4323 (1997).
326. Ghosh, S. *et al.* Fish Oil Attenuates Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid-Induced Dysbiosis and Infectious Colitis but Impairs LPS Dephosphorylation Activity Causing Sepsis. *PLoS ONE* **8**, e55468 (2013).

327. McCALL, T. B., O'Leary, D., Bloomfield, J. & Ó'Moráin, C. A. Therapeutic potential of fish oil in the treatment of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **3**, 415–424 (2007).
328. The IBD in EPIC Study Investigators. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* **58**, 1606–1611 (2009).
329. Ananthakrishnan, A. N. *et al.* Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **63**, 776–784 (2014).
330. Costea, I. *et al.* Interactions Between the Dietary Polyunsaturated Fatty Acid Ratio and Genetic Factors Determine Susceptibility to Pediatric Crohn's Disease. *Gastroenterology* **146**, 929-931.e3 (2014).
331. Higashimura, Y. *et al.* Trans-unsaturated fatty acid activates NLRP3 inflammasome in macrophages and exacerbates intestinal inflammation in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **529**, 243–250 (2020).
332. Shimazaki, A., Sakamoto, J. J., Furuta, M. & Tsuchido, T. Antifungal Activity of Diglycerin Ester of Fatty Acids against Yeasts and Its Comparison with Those of Sucrose Monopalmitate and Sodium Benzoate. *Biocontrol Sci.* **21**, 123–130 (2016).
333. Hayama, K., Takahashi, M., Yui, S. & Abe, S. Inhibitory effects of several saturated fatty acids and their related fatty alcohols on the growth of *Candida albicans*. *Drug Discov Ther* **9**, 386–390 (2015).
334. Lynch, S. V. & Pedersen, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med* **375**, 2369–2379 (2016).
335. Calderone, R. A. & Clancy, C. *Candida and candidiasis*. (ASM Press, 2012).
336. Nobile, C. J. & Johnson, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 71–92 (2015).
337. McManus, B. A. & Coleman, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, Genetics and Evolution* **21**, 166–178 (2014).

338. Bottone, E. J., Horga, M. & Abrams, J. "Giant" blastoconidia of *Candida albicans*: morphologic presentation and concepts regarding their production. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **34**, 27–32 (1999).
339. Polke, M., Hube, B. & Jacobsen, I. D. *Candida* Survival Strategies. in *Advances in Applied Microbiology* vol. 91 139–235 (Elsevier, 2015).
340. Kollef, M. H., Torres, A., Shorr, A. F., Martin-Loeches, I. & Micek, S. T. Nosocomial Infection. *Crit Care Med* **49**, 169–187 (2021).
341. Singh, D. K., Tóth, R. & Gácsér, A. Mechanisms of Pathogenic *Candida* Species to Evade the Host Complement Attack. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 94 (2020).
342. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133–163 (2007).
343. Silva, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* : biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 288–305 (2012).
344. Peman, J. *et al.* Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Bloodstream Fungal Isolates in Pediatric Patients: a Spanish Multicenter Prospective Survey. *Journal of Clinical Microbiology* **49**, 4158–4163 (2011).
345. Rasheed, M., Battu, A. & Kaur, R. Host–pathogen interaction in *Candida glabrata* infection: current knowledge and implications for antifungal therapy. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **18**, 1093–1103 (2020).
346. Berberi, A., Noujeim, Z. & Aoun, G. Epidemiology of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome Patients and CD4+ Counts. *J Int Oral Health* **7**, 20–23 (2015).
347. Bassetti, M., Molinari, M. P., Mussap, M., Viscoli, C. & Righi, E. Candidaemia in internal medicine departments: the burden of a rising problem. *Clinical Microbiology and Infection* **19**, E281–E284 (2013).

348. Arendrup, M. C. & Patterson, T. F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases* **216**, S445–S451 (2017).
349. Mayer, F. L., Wilson, D. & Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**, 119–128 (2013).
350. Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M. & Corbellino, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine* **34**, 21–28 (2016).
351. Galocha, M. *et al.* Divergent Approaches to Virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: Two Sides of the Same Coin. *IJMS* **20**, 2345 (2019).
352. Du, H. *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog* **16**, e1008921 (2020).
353. Arendrup, M. C. *et al.* Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin Microbiol Infect* **19**, E343–353 (2013).
354. Cleveland, A. A. *et al.* Declining Incidence of Candidemia and the Shifting Epidemiology of *Candida* Resistance in Two US Metropolitan Areas, 2008–2013: Results from Population-Based Surveillance. *PLoS ONE* **10**, e0120452 (2015).
355. Sheppard, D. C. *et al.* Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 30480–30489 (2004).
356. Liu, Y. & Filler, S. G. *Candida albicans* Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. *Eukaryot Cell* **10**, 168–173 (2011).
357. Phan, Q. T. *et al.* Als3 Is a *Candida albicans* Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells. *PLoS Biol* **5**, e64 (2007).
358. Lionakis, M. S., Iliev, I. D. & Hohl, T. M. Immunity against fungi. *JCI Insight* **2**, 93156 (2017).
359. Nobile, C. J. *et al.* Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol* **18**, 1017–1024 (2008).

360. Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wächtler, B. & Hube, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* **13**, 963–976 (2011).
361. Sun, J. N. *et al.* Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog* **6**, e1001181 (2010).
362. Modrzewska, B. & Kurnatowski, P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol* **61**, 3–9 (2015).
363. Niewerth, M. & Korting, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* **44**, 361–367 (2001).
364. Naglik, J. R., Challacombe, S. J. & Hube, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 400–428 (2003).
365. Villar, C. C., Kashleva, H., Nobile, C. J., Mitchell, A. P. & Dongari-Bagtzoglou, A. Mucosal Tissue Invasion by *Candida albicans* Is Associated with E-Cadherin Degradation, Mediated by Transcription Factor Rim101p and Protease Sap5p. *Infect Immun* **75**, 2126–2135 (2007).
366. Goyer, M. *et al.* Intestinal Cell Tight Junctions Limit Invasion of *Candida albicans* through Active Penetration and Endocytosis in the Early Stages of the Interaction of the Fungus with the Intestinal Barrier. *PLoS ONE* **11**, e0149159 (2016).
367. Li, L., Kashleva, H. & Dongari-Bagtzoglou, A. Cytotoxic and cytokine-inducing properties of *Candida glabrata* in single and mixed oral infection models. *Microbial Pathogenesis* **42**, 138–147 (2007).
368. Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L. & Cormack, B. P. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 378–384 (2005).
369. Valotteau, C., Prystopiuk, V., Cormack, B. P. & Dufrêne, Y. F. Atomic Force Microscopy Demonstrates that *Candida glabrata* Uses Three Epa Proteins To Mediate Adhesion to Abiotic Surfaces. *mSphere* **4**, (2019).
370. López-Fuentes, E. *et al.* *Candida glabrata*'s Genome Plasticity Confers a Unique Pattern of Expressed Cell Wall Proteins. *JoF* **4**, 67 (2018).

371. de Groot, P. W. J. *et al.* The Cell Wall of the Human Pathogen *Candida glabrata* : Differential Incorporation of Novel Adhesin-Like Wall Proteins. *Eukaryot Cell* **7**, 1951–1964 (2008).
372. Kaur, R., Ma, B. & Cormack, B. P. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *PNAS* **104**, 7628–7633 (2007).
373. Timmermans, B., De Las Peñas, A., Castaño, I. & Van Dijck, P. Adhesins in *Candida glabrata*. *JoF* **4**, 60 (2018).
374. Desai, C., Mavrianos, J. & Chauhan, N. *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells: *Candida glabrata* adhesins. *FEMS Yeast Res* **11**, 595–601 (2011).
375. Tati, S. *et al.* *Candida glabrata* Binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS Pathog* **12**, e1005522 (2016).
376. Castaño, I. *et al.* Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*: Regulation of *Candida* adherence by silencing. *Molecular Microbiology* **55**, 1246–1258 (2004).
377. Vale-Silva, L., Beaudoin, E., Tran, V. D. T. & Sanglard, D. Comparative Genomics of Two Sequential *Candida glabrata* Clinical Isolates. *G3 Genes/Genomes/Genetics* **7**, 2413–2426 (2017).
378. Nami, S., Aghebati-Maleki, A., Morovati, H. & Aghebati-Maleki, L. Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **110**, 857–868 (2019).
379. Brown, G. D. & Gordon, S. A new receptor for β -glucans. *Nature* **413**, 36–37 (2001).
380. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819–826 (2007).
381. Gow, N. A. R., Latge, J.-P. & Munro, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).

382. Moyes, D. L. *et al.* A Biphasic Innate Immune MAPK Response Discriminates between the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* in Epithelial Cells. *Cell Host & Microbe* **8**, 225–235 (2010).
383. Eyerich, S. *et al.* IL-22 and TNF- α represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*: Cellular immune response. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1894–1901 (2011).
384. Li, M., Chen, Q., Tang, R., Shen, Y. & Liu, W. D. The expression of β -defensin-2, 3 and LL-37 induced by *Candida albicans* phospholipomannan in human keratinocytes. *Journal of Dermatological Science* **61**, 72–75 (2011).
385. Järvå, M. *et al.* Human β -defensin 2 kills *Candida albicans* through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-mediated membrane permeabilization. *Sci. Adv.* **4**, eaat0979 (2018).
386. Weindl, G., Wagener, J. & Schaller, M. Interaction of the mucosal barrier with accessory immune cells during fungal infection. *International Journal of Medical Microbiology* **301**, 431–435 (2011).
387. Shukla, M., Chandley, P. & Rohatgi, S. The Role of B-Cells and Antibodies against *Candida* Vaccine Antigens in Invasive Candidiasis. *Vaccines* **9**, 1159 (2021).
388. Cheng, S.-C., Joosten, L. A. B., Kullberg, B.-J. & Netea, M. G. Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. *Infect. Immun.* **80**, 1304–1313 (2012).
389. Wout, J. W., Linde, I., Leijh, P. C. J. & Furth, R. Contribution of granulocytes and monocytes to resistance against experimental disseminated *Candida albicans* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 736–741 (1988).
390. Balish, E. *et al.* Mucosal and systemic candidiasis in IL-8R α ^{-/-} BALB/c mice. *J Leukoc Biol* **66**, 144–150 (1999).
391. Netea, M. G. *et al.* Increased susceptibility of TNF- α lymphotoxin- α double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol* **163**, 1498–1505 (1999).

392. Van Enckevort, F. H. J. *et al.* Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice 1. *Med Mycology* **37**, 419–426 (1999).
393. Schwarzenberger, P. *et al.* IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol* **161**, 6383–6389 (1998).
394. Vonk, A. G., Netea, M. G., van der Meer, J. W. & Kullberg, B. J. Host defence against disseminated *Candida albicans* infection and implications for antifungal immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* **6**, 891–903 (2006).
395. Cao, M. *et al.* Dectin-1-induced RIPK1 and RIPK3 activation protects host against *Candida albicans* infection. *Cell Death Differ* **26**, 2622–2636 (2019).
396. Hardison, S. E. & Brown, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* **13**, 817–822 (2012).
397. Netea, M. G. & Maródi, L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends in Immunology* **31**, 346–353 (2010).
398. Chen, S. M. *et al.* Dectin-1 plays an important role in host defense against systemic *Candida glabrata* infection. *Virulence* **8**, 1643–1656 (2017).
399. Taylor, P. R. *et al.* Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* **8**, 31–38 (2007).
400. Chen, S. M. *et al.* The critical role of Dectin-1 in host controlling systemic *Candida krusei* infection. *Am J Transl Res* **11**, 721–732 (2019).
401. Kaplan, M. J. & Radic, M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* **189**, 2689–2695 (2012).
402. Urban, C. F. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**, e1000639 (2009).
403. Aratani, Y. *et al.* Severe Impairment in Early Host Defense against *Candida albicans* in Mice Deficient in Myeloperoxidase. *Infect Immun* **67**, 1828–1836 (1999).

404. Richardson, M. D., Brownlie, C. E. & Shankland, G. S. Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by GM-CSF-activated human neutrophils. *J Med Vet Mycol* **30**, 433–441 (1992).
405. van de Veerdonk, F. L., Kullberg, B.-J. & Netea, M. G. Adjunctive immunotherapy with recombinant cytokines for the treatment of disseminated candidiasis. *Clinical Microbiology and Infection* **18**, 112–119 (2012).
406. Lechner, A. J., Lamprech, K. E., Potthoff, L. H., Tredway, T. L. & Matuschak, G. M. Recombinant GM-CSF reduces lung injury and mortality during neutropenic *Candida* sepsis. *Am J Physiol* **266**, L561-568 (1994).
407. Qian, Q., Jutila, M. A., Van Rooijen, N. & Cutler, J. E. Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* **152**, 5000–5008 (1994).
408. Joly, S. *et al.* Cutting Edge: *Candida albicans* Hyphae Formation Triggers Activation of the Nlrp3 Inflammasome. *J Immunol* **183**, 3578–3581 (2009).
409. Cheng, S.-C. *et al.* The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *Journal of Leukocyte Biology* **90**, 357–366 (2011).
410. van de Veerdonk, F. L. *et al.* Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1beta production by the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Infect Dis* **199**, 1087–1096 (2009).
411. Galès, A. *et al.* PPAR γ controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**, e1000714 (2010).
412. Cambi, A. *et al.* The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **33**, 532–538 (2003).
413. Cambi, A. *et al.* Dendritic Cell Interaction with *Candida albicans* Critically Depends on N-Linked Mannan. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 20590–20599 (2008).

414. d'Ostiani, C. F. *et al.* Dendritic Cells Discriminate between Yeasts and Hyphae of the Fungus *Candida albicans*. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 1661–1674 (2000).
415. Quintin, J. *et al.* Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice: Immunity to infection. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2405–2414 (2014).
416. Schmidt, S., Zimmermann, S.-Y., Tramsen, L., Koehl, U. & Lehrnbecher, T. Natural Killer Cells and Antifungal Host Response. *Clin Vaccine Immunol* **20**, 452–458 (2013).
417. Voigt, J. *et al.* Proteome analysis of human CD56^{neg} NK cells reveals a homogeneous phenotype surprisingly similar to CD56^{dim} NK cells. *Eur. J. Immunol.* **48**, 1456–1469 (2018).
418. Zhang, M. X., Lupan, D. M. & Kozel, T. R. Mannan-specific immunoglobulin G antibodies in normal human serum mediate classical pathway initiation of C3 binding to *Candida albicans*. *Infect Immun* **65**, 3822–3827 (1997).
419. Zhang, M. X. & Kozel, T. R. Mannan-Specific Immunoglobulin G Antibodies in Normal Human Serum Accelerate Binding of C3 to *Candida albicans* via the Alternative Complement Pathway. *Infect Immun* **66**, 4845–4850 (1998).
420. Harpf, V., Rambach, G., Würzner, R., Lass-Flörl, C. & Speth, C. *Candida* and Complement: New Aspects in an Old Battle. *Front. Immunol.* **11**, 1471 (2020).
421. Bagasra, O., Howeedy, A. & Kajdacsy-Balla, A. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology* **65**, 405–409 (1988).
422. Tsoni, S. V. *et al.* Complement C3 Plays an Essential Role in the Control of Opportunistic Fungal Infections. *Infect Immun* **77**, 3679–3685 (2009).
423. Cheng, S.-C. *et al.* Complement plays a central role in *Candida albicans*-induced cytokine production by human PBMCs: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.* **42**, 993–1004 (2012).
424. Mullick, A. *et al.* Dysregulated Inflammatory Response to *Candida albicans* in a C5-Deficient Mouse Strain. *Infect Immun* **72**, 5868–5876 (2004).

425. Huang, W., Na, L., Fidel, P. L. & Schwarzenberger, P. Requirement of Interleukin-17A for Systemic Anti-*Candida albicans* Host Defense in Mice. *J INFECT DIS* **190**, 624–631 (2004).
426. Valand, N. & Girija, U. V. Candida Pathogenicity and Interplay with the Immune System. *Adv Exp Med Biol* **1313**, 241–272 (2021).
427. Coker, L. A., Mercadal, C. M., Rouse, B. T. & Moore, R. N. Differential effects of CD4⁺ and CD8⁺ cells in acute, systemic murine candidosis. *J Leukoc Biol* **51**, 305–306 (1992).
428. Mencacci, A. *et al.* Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists. *Blood* **97**, 1483–1490 (2001).
429. Farah, C. S. *et al.* T Cells Augment Monocyte and Neutrophil Function in Host Resistance against Oropharyngeal Candidiasis. *Infect Immun* **69**, 6110–6118 (2001).
430. Conti, H. R. *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 299–311 (2009).
431. van de Veerdonk, F. L. *et al.* STAT1 Mutations in Autosomal Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis. *N Engl J Med* **365**, 54–61 (2011).
432. Hernández-Santos, N. & Gaffen, S. L. Th17 Cells in Immunity to *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe* **11**, 425–435 (2012).
433. Sinha, B. K., Prasad, S. & Monga, D. P. Studies of the role of B-cells in the resistance of mice to experimental candidiasis. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* **266**, 316–322 (1987).
434. Carrow, E. W., Hector, R. F. & Domer, J. E. Immunodeficient CBA/N mice respond effectively to *Candida albicans*. *Clinical Immunology and Immunopathology* **33**, 371–380 (1984).
435. Wagner, R. D., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Warner, T. & Balish, E. B Cell Knockout Mice Are Resistant to Mucosal and Systemic Candidiasis of Endogenous Origin but Susceptible to Experimental Systemic Candidiasis. *Journal of Infectious Diseases* **174**, 589–597 (1996).

436. Santoni, G. *et al.* Immune Cell-Mediated Protection against Vaginal Candidiasis: Evidence for a Major Role of Vaginal CD4⁺ T Cells and Possible Participation of Other Local Lymphocyte Effectors. *Infect Immun* **70**, 4791–4797 (2002).
437. De Bernardis, F. *et al.* Protection against rat vaginal candidiasis by adoptive transfer of vaginal B lymphocytes: B lymphocytes protect against candidal vaginitis. *FEMS Yeast Research* **10**, 432–440 (2010).
438. Pathakumari, B., Liang, G. & Liu, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **130**, 110550 (2020).
439. Vudhichamnong, K., Walker, D. M. & Ryley, H. C. The effect of secretory immunoglobulin A on the in-vitro adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. *Archives of Oral Biology* **27**, 617–621 (1982).
440. De Bernardis, F. *et al.* Human Domain Antibodies against Virulence Traits of *Candida albicans* Inhibit Fungus Adherence to Vaginal Epithelium and Protect against Experimental Vaginal Candidiasis. *J INFECT DIS* **195**, 149–157 (2007).
441. Han, Y. & Cutler, J. E. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect Immun* **63**, 2714–2719 (1995).
442. Xin, H., Dziadek, S., Bundle, D. R. & Cutler, J. E. Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13526–13531 (2008).
443. Luo, S. *et al.* The secreted *Candida albicans* protein Pra1 disrupts host defense by broadly targeting and blocking complement C3 and C3 activation fragments. *Molecular Immunology* **93**, 266–277 (2018).
444. Vylkova, S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. *PLoS Pathog* **13**, e1006149 (2017).

445. Miramón, P. & Lorenz, M. C. The SPS amino acid sensor mediates nutrient acquisition and immune evasion in *Candida albicans*: Nutrient sensing and immune evasion in *C. albicans*. *Cellular Microbiology* **18**, 1611–1624 (2016).
446. Reales-Calderón, J. A., Aguilera-Montilla, N., Corbí, Á. L., Molero, G. & Gil, C. Proteomic characterization of human proinflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages and their response to *Candida albicans*. *Proteomics* **14**, 1503–1518 (2014).
447. Miao, E. A., Rajan, J. V. & Aderem, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death: Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews* **243**, 206–214 (2011).
448. Wellington, M., Koselny, K., Sutterwala, F. S. & Krysan, D. J. *Candida albicans* Triggers NLRP3-Mediated Pyroptosis in Macrophages. *Eukaryotic Cell* **13**, 329–340 (2014).
449. Dadar, M. *et al.* *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis* **117**, 128–138 (2018).
450. Kasper, L. *et al.* The fungal peptide toxin Candidalysin activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes. *Nat Commun* **9**, 4260 (2018).
451. Rogiers, O. *et al.* Candidalysin Crucially Contributes to Nlrp3 Inflammasome Activation by *Candida albicans* Hyphae. *mBio* **10**, (2019).
452. Han, K.-H. Immunological Features of Macrophages Induced by Various Morphological Structures of *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1031–1040 (2013).
453. Gantner, B. N., Simmons, R. M. & Underhill, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* **24**, 1277–1286 (2005).
454. Lopes, J. P. *et al.* Evasion of Immune Surveillance in Low Oxygen Environments Enhances *Candida albicans* Virulence. *mBio* **9**, e02120-18 (2018).
455. Ballou, E. R. *et al.* Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. *Nat Microbiol* **2**, 16238 (2017).
456. Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P. & SchÄ¼ller, C. Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cellular Microbiology* **12**, 199–216 (2010).

457. Seider, K. *et al.* The Facultative Intracellular Pathogen *Candida glabrata* Subverts Macrophage Cytokine Production and Phagolysosome Maturation. *J.I.* **187**, 3072–3086 (2011).
458. Dementhon, K., El-Kirat-Chatel, S. & Noël, T. Development of an In Vitro Model for the Multi-Parametric Quantification of the Cellular Interactions between *Candida* Yeasts and Phagocytes. *PLoS ONE* **7**, e32621 (2012).
459. Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J. & Trevijano-Contador, N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front. Microbiol.* **10**, 2993 (2020).
460. Lenardon, M. D., Munro, C. A. & Gow, N. A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 416–423 (2010).
461. Shibata, N., Suzuki, A., Kobayashi, H. & Okawa, Y. Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochemical Journal* **404**, 365–372 (2007).
462. Mille, C. *et al.* Inactivation of CaMIT1 Inhibits *Candida albicans* Phospholipomannan β -Mannosylation, Reduces Virulence, and Alters Cell Wall Protein β -Mannosylation. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47952–47960 (2004).
463. Mille, C. *et al.* Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology* **22**, 1332–1342 (2012).
464. Fabre, E. *et al.* Characterization of the recombinant *Candida albicans* β -1,2-mannosyltransferase that initiates the β -mannosylation of cell wall phosphopeptidomannan. *Biochemical Journal* **457**, 347–360 (2014).
465. Kobayashi, H. *et al.* Structural and immunochemical characterization of β -1,2-linked mannosyl phosphate residue in the cell wall mannan of *Candida glabrata*. *Archives of Microbiology* **169**, 188–194 (1998).
466. Bowman, S. M. & Free, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **28**, 799–808 (2006).

467. Lackner, M. *et al.* Positions and numbers of FKS mutations in *Candida albicans* selectively influence in vitro and in vivo susceptibilities to echinocandin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 3626–3635 (2014).
468. Beyda, N. D. *et al.* FKS mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis* **59**, 819–825 (2014).
469. Patel, S. & Goyal, A. Chitin and chitinase: Role in pathogenicity, allergenicity and health. *Int J Biol Macromol* **97**, 331–338 (2017).
470. Younes, I. & Rinaudo, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs* **13**, 1133–1174 (2015).
471. Chattaway, F. W., Holmes, M. R. & Barlow, A. J. E. Cell Wall Composition of the Mycelial and Blastospore Forms of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* **51**, 367–376 (1968).
472. Brown, H. E., Esher, S. K. & Alspaugh, J. A. Chitin: A ‘Hidden Figure’ in the Fungal Cell Wall. *Curr Top Microbiol Immunol* **425**, 83–111 (2020).
473. Munro, C. A. *et al.* Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity: CaChs1p is essential for growth and septum formation. *Molecular Microbiology* **39**, 1414–1426 (2004).
474. B. R. Da Silva, L., P. Taborda, C. & D. Nosanchuk, J. Advances in Fungal Peptide Vaccines. *JoF* **6**, 119 (2020).
475. Cassone, A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. *Lancet Infect Dis* **8**, 114–124 (2008).
476. Casadevall, A. & Pirofski, L. Polysaccharide-containing conjugate vaccines for fungal diseases. *Trends in Molecular Medicine* **12**, 6–9 (2006).
477. Dan, J. M. & Levitz, S. M. Prospects for development of vaccines against fungal diseases. *Drug Resist Updat* **9**, 105–110 (2006).
478. Spellberg, B. J. *et al.* Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *J Infect Dis* **194**, 256–260 (2006).

479. Ibrahim, A. S., Spellberg, B. J., Avanesian, V., Fu, Y. & Edwards, J. E. The Anti- *Candida* Vaccine Based on the Recombinant N-Terminal Domain of Als1p Is Broadly Active against Disseminated Candidiasis. *Infect Immun* **74**, 3039–3041 (2006).
480. Luo, G., Ibrahim, A. S., French, S. W., Edwards, J. E. & Fu, Y. Active and Passive Immunization with rHyr1p-N Protects Mice against Hematogenously Disseminated Candidiasis. *PLoS ONE* **6**, e25909 (2011).
481. De Bernardis, F. *et al.* A virosomal vaccine against candidal vaginitis: Immunogenicity, efficacy and safety profile in animal models. *Vaccine* **30**, 4490–4498 (2012).
482. Cassone, A., Boccanera, M., Adriani, D., Santoni, G. & De Bernardis, F. Rats clearing a vaginal infection by *Candida albicans* acquire specific, antibody-mediated resistance to vaginal reinfection. *Infect Immun* **63**, 2619–2624 (1995).
483. Torosantucci, A. *et al.* A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 597–606 (2005).
484. Pietrella, D. *et al.* A β -glucan-conjugate vaccine and anti- β -glucan antibodies are effective against murine vaginal candidiasis as assessed by a novel in vivo imaging technique. *Vaccine* **28**, 1717–1725 (2010).
485. Huang, H., Ostroff, G. R., Lee, C. K., Specht, C. A. & Levitz, S. M. Robust Stimulation of Humoral and Cellular Immune Responses following Vaccination with Antigen-Loaded β -Glucan Particles. *mBio* **1**, (2010).
486. Liao, G. *et al.* Synthesis and Immunological Studies of Linear Oligosaccharides of β -Glucan As Antigens for Antifungal Vaccine Development. *Bioconjugate Chem.* **26**, 466–476 (2015).
487. Read, R. C. *et al.* Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine* **23**, 4367–4374 (2005).
488. Gong, Y. *et al.* Chitosan as an adjuvant for a *Helicobacter pylori* therapeutic vaccine. *Molecular Medicine Reports* **12**, 4123–4132 (2015).
489. Sun, B. *et al.* Polysaccharides as vaccine adjuvants. *Vaccine* **36**, 5226–5234 (2018).

490. Charlet, R. *et al.* Intravenous Immunoglobulin Therapy Eliminates *Candida albicans* and Maintains Intestinal Homeostasis in a Murine Model of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Int J Mol Sci* **20**, E1473 (2019).
491. Enjalbert, B. *et al.* A multifunctional, synthetic *Gaussia princeps* luciferase reporter for live imaging of *Candida albicans* infections. *Infect Immun* **77**, 4847–4858 (2009).
492. Netea, M. G., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Kullberg, B.-J. & van de Veerdonk, F. L. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol* **15**, 630–642 (2015).
493. Mentella, M. C., Scaldaferrri, F., Pizzoferrato, M., Gasbarrini, A. & Miggianno, G. A. D. Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients* **12**, E944 (2020).
494. Prosberg, M., Bendtsen, F., Vind, I., Petersen, A. M. & Gluud, L. L. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol* **51**, 1407–1415 (2016).
495. Zhou, Y. & Zhi, F. Lower Level of *Bacteroides* in the Gut Microbiota Is Associated with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int* **2016**, 5828959 (2016).
496. Zhang, S. *et al.* Short Chain Fatty Acids Modulate the Growth and Virulence of Pathosymbiont *Escherichia coli* and Host Response. *Antibiotics (Basel)* **9**, E462 (2020).
497. Shi, J. *et al.* Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of mixed lactobacilli in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Food Funct* **12**, 5130–5143 (2021).
498. Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E. & Vázquez-Carrera, M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab* **29**, 178–190 (2018).
499. Nicholas, D. A. *et al.* Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β . *PLoS One* **12**, e0176793 (2017).
500. Gonçalves-de-Albuquerque, C. F. *et al.* Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. *PLoS One* **11**, e0153607 (2016).

501. Carrillo, C., Cavia, M. del M. & Alonso-Torre, S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. *Nutr Hosp* **27**, 978–990 (2012).
502. Mena, S. J. *et al.* Differential free fatty acid receptor-1 (FFAR1/GPR40) signalling is associated with gene expression or gelatinase granule release in bovine neutrophils. *Innate Immun* **22**, 479–489 (2016).
503. Miyamoto, J. *et al.* Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *Int J Mol Sci* **17**, 450 (2016).
504. Miyamoto, J. *et al.* A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. *J Biol Chem* **290**, 2902–2918 (2015).
505. Maslowski, K. M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282–1286 (2009).
506. Banskota, S. *et al.* Salicylates Ameliorate Intestinal Inflammation by Activating Macrophage AMPK. *Inflamm Bowel Dis* **27**, 914–926 (2021).
507. Salvadó, L. *et al.* Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* **56**, 1372–1382 (2013).
508. Finucane, O. M. *et al.* Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes* **64**, 2116–2128 (2015).
509. Oliveira, V. *et al.* Diets Containing α -Linolenic (ω 3) or Oleic (ω 9) Fatty Acids Rescues Obese Mice From Insulin Resistance. *Endocrinology* **156**, 4033–4046 (2015).
510. Müller, A. K. *et al.* Olive Oil Extracts and Oleic Acid Attenuate the LPS-Induced Inflammatory Response in Murine RAW264.7 Macrophages but Induce the Release of Prostaglandin E2. *Nutrients* **13**, 4437 (2021).

511. Francescone, R., Hou, V. & Grivennikov, S. I. Cytokines, IBD, and Colitis-associated Cancer: *Inflammatory Bowel Diseases* **21**, 409–418 (2015).
512. Fukata, M. *et al.* Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm Bowel Dis* **17**, 1464–1473 (2011).
513. Muthamil, S., Prasath, K. G., Priya, A., Precilla, P. & Pandian, S. K. Global proteomic analysis deciphers the mechanism of action of plant derived oleic acid against *Candida albicans* virulence and biofilm formation. *Sci Rep* **10**, 5113 (2020).
514. Prasath, K. G., Tharani, H., Kumar, M. S. & Pandian, S. K. Palmitic Acid Inhibits the Virulence Factors of *Candida tropicalis*: Biofilms, Cell Surface Hydrophobicity, Ergosterol Biosynthesis, and Enzymatic Activity. *Front Microbiol* **11**, 864 (2020).
515. Buthelezi, S., Southway, C., Govinden, U., Bodenstein, J. & du Toit, K. An investigation of the antimicrobial and anti-inflammatory activities of crocodile oil. *J Ethnopharmacol* **143**, 325–330 (2012).
516. Reddy, K. V. K. & Naidu, K. A. Oleic acid, hydroxytyrosol and n-3 fatty acids collectively modulate colitis through reduction of oxidative stress and IL-8 synthesis; in vitro and in vivo studies. *Int Immunopharmacol* **35**, 29–42 (2016).
517. Araki, A. *et al.* MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol* **40**, 16–23 (2005).
518. Zou, J. & Shankar, N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF- κ B Signaling Pathways in the Regulation of Phagocytosis and Proinflammatory Cytokine Expression in Response to *E. faecalis* Infection. *PLoS One* **10**, e0136947 (2015).
519. Benson, J. M. & Shepherd, D. M. Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicol Sci* **120**, 68–78 (2011).

520. Zorlu, N., Hoffjan, S., Haghikia, A., Deyneko, I. V. & Epplen, J. T. Evaluation of variation in genes of the arylhydrocarbon receptor pathway for an association with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **334**, 576979 (2019).
521. Chaves Filho, A. J. M. *et al.* IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **80**, 234–249 (2018).
522. Yi, T. *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int* **2018**, 6058784 (2018).
523. Pernomian, L., Duarte-Silva, M. & de Barros Cardoso, C. R. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) as a Potential Target for the Control of Intestinal Inflammation: Insights from an Immune and Bacteria Sensor Receptor. *Clin Rev Allergy Immunol* **59**, 382–390 (2020).
524. Marshall, N. B., Vorachek, W. R., Steppan, L. B., Mourich, D. V. & Kerkvliet, N. I. Functional characterization and gene expression analysis of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells generated in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Immunol* **181**, 2382–2391 (2008).
525. Natividad, J. M. *et al.* Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab* **28**, 737-749.e4 (2018).
526. Ngo, D.-H. & Kim, S.-K. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Adv Food Nutr Res* **73**, 15–31 (2014).
527. Khan, F. I. *et al.* Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**, 3513–3536 (2017).
528. Singh, A., Dutta, P. K., Kumar, H., Kureel, A. K. & Rai, A. K. Synthesis of chitin-glucan-aldehyde-quercetin conjugate and evaluation of anticancer and antioxidant activities. *Carbohydr Polym* **193**, 99–107 (2018).
529. Hafsa, J. *et al.* Antioxidant and antimicrobial proprieties of chitin and chitosan extracted from *Parapenaeus Longirostris* shrimp shell waste. *Ann Pharm Fr* **74**, 27–33 (2016).

530. Mami, S. *et al.* Oral chitin treatment improved demyelination in murine autoimmune encephalomyelitis model by inhibition of inflammatory responses. *Int Immunopharmacol* **84**, 106536 (2020).
531. Azuma, K. *et al.* α -Chitin nanofibrils improve inflammatory and fibrosis responses in inflammatory bowel disease mice model. *Carbohydr Polym* **90**, 197–200 (2012).
532. Wagener, J. *et al.* Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation. *PLoS Pathog* **10**, e1004050 (2014).
533. Koller, B., Müller-Wiefel, A. S., Rupec, R., Korting, H. C. & Ruzicka, T. Chitin modulates innate immune responses of keratinocytes. *PLoS One* **6**, e16594 (2011).
534. Pace, F., Pace, M. & Quartarone, G. Probiotics in digestive diseases: focus on Lactobacillus GG. *Minerva Gastroenterol Dietol* **61**, 273–292 (2015).
535. Amer, M. *et al.* Probiotics and Their Use in Inflammatory Bowel Disease. *Altern Ther Health Med* **24**, 16–23 (2018).
536. Ribeiro, F. C. *et al.* Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. *J Appl Microbiol* **129**, 175–185 (2020).
537. Allonsius, C. N. *et al.* Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Sci Rep* **9**, 2900 (2019).
538. Dela Cruz, C. S. *et al.* Chitinase 3-like-1 promotes *Streptococcus pneumoniae* killing and augments host tolerance to lung antibacterial responses. *Cell Host Microbe* **12**, 34–46 (2012).
539. Koch, B. E. V., Stougaard, J. & Spaink, H. P. Keeping track of the growing number of biological functions of chitin and its interaction partners in biomedical research. *Glycobiology* **25**, 469–482 (2015).
540. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. V. & Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv* **29**, 322–337 (2011).
541. Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y.-Y. & Hamblin, M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* **9**, 857–879 (2011).

542. Weindl, G. *et al.* Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J Clin Invest* **117**, 3664–3672 (2007).
543. Hoseini, M. H. M. *et al.* Immunotherapeutic effects of chitin in comparison with chitosan against *Leishmania major* infection. *Parasitol Int* **65**, 99–104 (2016).
544. Zhang, Y. *et al.* Immune complex/Ig negatively regulate TLR4-triggered inflammatory response in macrophages through Fc gamma RIIb-dependent PGE2 production. *J Immunol* **182**, 554–562 (2009).
545. Rios, F. J. O., Jancar, S., Melo, I. B., Ketelhuth, D. F. J. & Gidlund, M. Role of PPAR-gamma in the modulation of CD36 and Fc gamma RII induced by LDL with low and high degrees of oxidation during the differentiation of the monocytic THP-1 cell line. *Cell Physiol Biochem* **22**, 549–556 (2008).
546. Vargas-Hernández, O. *et al.* THP-1 cells increase TNF- α production upon LPS + soluble human IgG co-stimulation supporting evidence for TLR4 and Fc γ receptors crosstalk. *Cell Immunol* **355**, 104146 (2020).
547. Charlet, R., Le Danvic, C., Sendid, B., Nagnan-Le Meillour, P. & Jawhara, S. Oleic Acid and Palmitic Acid from *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus johnsonii* Exhibit Anti-Inflammatory and Antifungal Properties. *Microorganisms* **10**, 1803 (2022).

Annexes

1. Annexe 1 : Communications

Posters

Charlet R, Bortolus C, Barbet M, Sendid B, Jawhara S. A Decrease in Anaerobic Bacteria Promotes *Candida glabrata* Overgrowth While β -glucan Treatment Restores the Gut Microbiota and Attenuates Colitis. 30th JGM (Joint Glycobiology Meeting), Lille, France, 27-29 october 2019.

Charlet R, Bortolus C, Sendid B, Jawhara S. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus johnsonii* modulate intestinal inflammation and eliminate fungi via enzymatic hydrolysis of the fungal cell wall. Journée André Verbert, Lille, France, 27 november 2020.

Mena L, **Charlet R**, Billamboz M, Bortolus C, Despres B, Ghinet A, Jawhara S. New two aromatic compounds have antifungal properties against *Candida albicans*. 31st ECCMID (European congress of clinical microbiology and infectious diseases), Online, 9-12 July 2021.

Charlet R, Lecointe K, Bortolus C, Sendid B, Jawhara S. Effect of fungal chitin as a curative or preventive treatment on *C. glabrata* elimination and modulation of intestinal inflammation in a dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis mouse model. 32th JGM (Joint Glycobiology Meeting), Utrecht, The Netherlands, 19-20 september 2022.

Communication orale

Charlet R, Le Danvic C, Sendid B, Nagnan-Le-Meillour P, Jawhara S. Rôle du microbiote intestinal dans la clairance digestive de *Candida glabrata*. Journée nationale thématique de la SFMM (Société Française de Mycologie Médicale) : *Candida* & invasive candidiasis : diagnosis, antifungal susceptibility, *Candida*-host interaction, Lyon, France, 07 october 2022. Obtention du prix de la meilleure communication.

2. Annexe 2 : Article publié dans *Microorganisms*⁵⁴⁷ :

Oleic acid and palmitic acid from *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus johnsonii* exhibit anti-inflammatory and antifungal properties

Rogation Charlet ^{1,2,3}, Chrystelle Le Danvic ⁴, Boualem Sendid ^{1,2,3}, Patricia Nagnan-Le Meillour ¹ and Samir Jawhara ^{1,2,3,*}

¹UMR 8576—UGSF—Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Centre National de la Recherche Scientifique, F-59000 Lille, France ; charlet-rogation@hotmail.fr (R.C.); boualem.sendid@univ-lille.fr (B.S.); patricia.nagnan@univ-lille.fr (P.N.-L.M.)

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1285, University of Lille, F-59000 Lille, France

³Medicine Faculty, University of Lille, F-59000 Lille, France

⁴Eliance, R&D, 149 rue de Bercy, F-75012 Paris, France ; chrystelleld@gmail.com

*Correspondence : samir.jawhara@univ-lille.fr ; Tel.: +33 (0)3-20-62-35-46; Fax: +33 (0)3-20-62-34-16

Abstract : A decrease in populations of *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus johnsonii* is observed during the development of colitis and fungal overgrowth, while restoration of these populations reduces inflammatory parameters and fungal overgrowth in mice. This study investigated the effect of two fatty acids from *B. thetaiotaomicron* and *L. johnsonii* on macrophages and Caco-2 cells, as well as their impact on the inflammatory immune response and on *Candida glabrata* overgrowth in a murine model of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. Oleic acid (OA) and palmitic acid (PA) from *L. johnsonii* and *B. thetaiotaomicron* were detected during their interaction with epithelial cells from colon samples. OA alone or OA combined with PA (FAs) reduced the expression of proinflammatory mediators in intestinal epithelial Caco-2 cells challenged with DSS. OA alone or FAs increased FFAR1, FFAR2, AMPK, and IL-10 expression in macrophages. Additionally, OA alone or FAs decreased COX-2, TNF α , IL-6, and IL-12 expression in LPS-stimulated macrophages. In the DSS murine model, oral administration of FAs reduced inflammatory parameters, decreased *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* populations, and eliminated *C. glabrata* from the gut. Overall, these findings provide evidence that OA combined with PA exhibits anti-inflammatory and antifungal properties.

Keywords: colitis; fatty acids; oleic acid; palmitic acid; inflammatory response; dextran sulfate sodium; *Candida glabrata*; *Bacteroides thetaiotaomicron*; *Lactobacillus johnsonii*; fungal overgrowth

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis, is a chronic disorder resulting from deregulation of the immune response to the gut microbiota in genetically susceptible individuals [1,2]. Alteration of the intestinal microbiota, including *Candida* spp., plays an important role in IBD [3]. *Candida albicans* and *Candida glabrata* are opportunistic fungal pathogens that can cause invasive fungal infections [4,5]. Systemic *C. glabrata* infections are associated with higher mortality than *C. albicans* infections [5]. Anti-fungal-glycan antibodies, known as ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies), ALCA (anti-laminaribioside carbohydrate antibodies), and ACCA (anti-chitobioside carbohydrate antibodies), were recognized as serological markers of CD, but subsequent studies established that they can also be generated during

Candida infection, suggesting a link between CD gut dysbiosis and endogenous opportunistic fungal species [6,7]. In addition, experimental studies have shown that intestinal inflammation increases *C. albicans* overgrowth, and that *C. albicans* in turn accentuates inflammation in a murine model of DSS-induced colitis [8,9]. It has been reported that intestinal inflammation and fungal overgrowth promote a change in the biodiversity of the gut microbiota, including *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus johnsonii* populations. These were both highly affected during the development of colitis and overgrowth of *C. glabrata* [10]. Restoration of these two anaerobic bacteria attenuated the development of colitis and *C. glabrata* growth in mice with DSS-induced colitis [11].

Changes in microbial metabolites have been implicated in IBD, such as short-chain fatty acids (SCFAs), which are produced by microbial fermentation of dietary fiber and are significantly reduced in IBD [12,13]. Stool samples from IBD patients typically had less acetate, butyrate, and propionate, while lactate and pyruvate were increased [12]. Further evidence of imbalanced host–microbe interactions in IBD are dietary and environmental factors that are implicated in the perpetuation of IBD [14]. A diet high in processed foods and fatty foods has been implicated in the recent increase in incidence of IBD, particularly in the Western world [15]. A mouse model mimicking a Western-style diet high in fat and sugar revealed the overgrowth of proinflammatory Proteobacteria such as *Escherichia coli*, a decrease in protective bacteria, and a significant reduction in SCFA concentrations [16]. Furthermore, colonocyte metabolism of SCFA, in particular butyrate, was impaired in DSS-induced colitis, while in vitro supplementation of the microbiota of CD patients with butyrate-producing bacteria resulted in higher butyrate production, supporting an improvement in the integrity of the intestinal epithelial barrier [17,18]. SCFA and medium-chain fatty acids (FAs) displayed not only anti-inflammatory properties, but also antimicrobial activities, including against *Candida* spp. [19,20].

This study investigated the effects of two FAs (oleic acid and palmitic acid) detected from *B. thetaiotaomicron* and *L. johnsonii* on intestinal epithelial Caco-2 cells challenged with DSS and on macrophages. Additionally, the impact of these two FAs on *Candida* spp. was also investigated in terms of viability, adhesion, fungal growth, and biofilm formation, and on modulation of the inflammatory immune response in a murine model of DSS-induced colitis.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal and Bacterial Cultures

The fungal strains used were *C. glabrata* wild-type (ATCC; Cg), *C. albicans* SC5314, and *C. albicans* bioluminescent strain [21,22]. These yeasts were grown in YPD medium (1% yeast extract, 1% peptone, 1% dextrose) on a rotary shaker for 18 h at 37 °C [23]. The fungal culture obtained was then centrifuged at 2500 rpm for 5 min and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS; Gibco; 14200-067). Bacterial strains of *B. thetaiotaomicron* and *L. johnsonii* were isolated from mouse stools on *Bacteroides* bile esculin agar and De Man, Rogosa, and Sharpe culture medium at 37 °C for 48 h under anaerobic conditions (Anaeroben™ 3.5L; ref: AN0035A; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The bacteria isolated were identified using MALDI-TOF (Microflex-Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) [11].

2.2. Ex Vivo Detection of Bacterial Metabolites Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)

The colons were removed from C57BL/6 mice and washed with PBS followed by RPMI supplemented with 10% fetal calf serum and 1% antibiotics (penicillin G + streptomycin, 0.1 mg/mL) [24]. Coincubation of these two bacteria was then carried out for 12 h under different conditions: colon alone; colon + Cg (as a control); colon + *B. thetaiotaomicron* + *L. johnsonii* (BtLj; 10⁷ cells); and colon + BtLj + Cg (10⁷ cells). After incubation, the colons were collected, and 1 mL of each supernatant was extracted with CHCl₃/MeOH (2:1). The extract was then centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4 °C, and the chloroform phase was recovered and evaporated in a Speedvac to concentrate the sample

and obtain the FAs. To facilitate their identification, FAs were derivatized by transesterification to obtain the fatty acid methyl esterified (FAME). Chloroform (100 μ L) was added to the tube containing the dry sample, then 1.5 mL of MeOH/HCl (0.5 N) was added, followed by a dry bath at 80 °C for 18 h. Once the tubes had cooled, three successive extractions were performed using heptane before analysis using GC-MS (ThermoFisher Scientific). Following this analysis, the two FAs were identified using GC-MS (oleic acid (OA) and palmitic acid (PA)).

2.3. Expression of Proinflammatory Cytokines and Innate Immune Receptors by Macrophages

THP-1 cells were differentiated into macrophages by adding phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich, France) at a concentration of 200 ng/mL for 72 h. The macrophages were then plated at a concentration of 10^6 cells/well for 24 h in RPMI medium [23]. Lipopolysaccharide (LPS) was then added to the macrophages at a concentration of 250 ng/mL (LPS from *E. coli* O111: B4; Sigma-Aldrich, France) for 6 h. In parallel, OA (TCI; Tokyo, Japan) and PA (TCI; Japan) were added at a concentration of 25 μ g/mL. Macrophages alone were used as a control. Subsequently, macrophages were harvested in RA1 buffer to perform mRNA extraction followed by RT-PCR and q-PCR. For quantitative PCR reactions, cDNA products were amplified using SYBR green real-time PCR master mix reagent. The SYBR green dye intensity was determined using one-step software. The used primers are provided in Table S1 in the Supplementary Materials. The mRNA levels were normalized to the reference gene (GAPDH (mRNA)) and are reported as fold-change in expression over the control (macrophages alone). For the measurement of proinflammatory cytokines using ELISA, 10^6 THP-1 cells were differentiated into macrophages by adding PMA at a concentration of 200 ng/mL for 72 h. The macrophages were then incubated for 24 h in RPMI medium. LPS was then added to the macrophages at a concentration of 250 ng/mL for 16 h, and FAs were added at a concentration of 25 μ g/mL. The supernatants were collected from each well. The concentrations of TNF α (Invitrogen™ Novex™ Human TNF alpha ELISA Kit), IL-6 (ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6; 430504; BioLegend, San Diego, CA, USA), and IL-1 β (ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-1 β ; 437004; BioLegend) in the supernatants were measured using ELISA according to the manufacturer's instructions. The concentrations of TNF α , IL-6, and IL-1 β were then determined based on standard curves provided in the ELISA kits, and the results were expressed as "Fold Release" by normalizing with the positive control (macrophages + LPS).

2.4. Migration of Macrophages through Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells Treated with DSS and Fatty Acids

Caco-2 cells (10^6 cells) were added to inserts (HTS Transwell 96-well; Corning; 3387) in the presence of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) for 24 h [25]. Dextran sulfate sodium (DSS; 1.5%; MP Biomedicals, LLC, Eschwege, Germany) was then added to each well for 24 h. Caco-2 cells were then treated with FA at a concentration of 25 μ g/mL. In parallel, THP-1 cells were differentiated into macrophages using PMA at a concentration of 200 ng/mL for 72 h. After different washings with PBS, the macrophages were maintained in RPMI for 24 h. They were then labeled with fluorescent calcein (Invitrogen; France) and added to each insert at a concentration of 10^5 macrophages/insert. RPMI (150 μ L) containing 10^5 *C. albicans* yeast cells was then added to the lower chamber, and the plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ overnight. After overnight migration, the upper chamber of the Transwell inserts containing nonmigrated macrophages was removed from the plate, and migrated macrophages present on *C. albicans* cells were determined by measuring fluorescence using a fluorometer (FLUOstar® Omega; BMG Labtech, Saitama, Japan). Macrophage migration through Caco-2 cells untreated with DSS was assigned a value of 100%, corresponding to a healthy intestinal barrier, while the value 200% corresponded to a destroyed intestinal barrier.

2.5. Adhesion of *C. glabrata* to Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells Treated with Fatty Acids

Caco-2 cells (150 μ L containing 5×10^5 cells) were added to each well of a 96-well plate (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). The plate was incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Once the Caco-2 cells were confluent, the intestinal cells were treated with FA at

a concentration of 25 µg/mL. *C. glabrata* yeast cells (100 µL containing 10⁵ cells) labeled with calcein (Invitrogen; France) were added to each well. After 2 h of incubation and different washings with PBS, fluorescence was measured using a fluorometer (FLUOstar Omega; BMG Labtech).

2.6. Effect of Fatty Acids on *Candida* spp.

The *C. albicans* bioluminescent strain (100 µL containing 10⁶ cells) was added to each well of a 96-well plate (Greiner Bio-One) [26]. OA and PA were added at various concentrations (250, 100, 50, 25, and 10 µg/mL). Finally, coelenterazine was added at a concentration of 2 µM (Coelenterazine, Biosciences). After 0, 1, and 2 h incubation, bioluminescence was measured using a fluorometer (FLUOstar Omega; BMG Labtech). *C. albicans* viability was considered to be 100% when the fungal cells were unchallenged with any FA treatment (100% corresponding to a control group receiving PBS only). We then normalized all of the results obtained under the various conditions according to this control. To test the viability of *C. glabrata* in the presence of FA, 1 mL RPMI containing 10⁵ *C. glabrata* cells in the presence or absence of FA (250 or 25 µg/mL) was used. Kinetics were carried out after coincubation for different times (0, 1, and 2 h) at 37 °C. Different dilutions were then performed in order to obtain a volume of 100 µL per Sabouraud agar Petri dish. The number of fungal colonies was determined in each Petri dish after 24 h of incubation at 37 °C. In parallel, caspofungin (50 mg; OHRE Pharma, Tours, France) at a concentration of 100 µg/mL was used as a control.

2.7. Effect of Fatty Acids on Fungal Biofilm Formation

RPMI (200 µL) containing 10⁷ *C. albicans* SC5314 or *C. glabrata* ATCC 2001 cells was added to each well of a 96-well plate (Greiner Bio-One; 655101). After 1.5 h of incubation at 37 °C, different washings with PBS were performed. RPMI (200 µL) containing the FAs was added to each well. The biofilm was then measured after 0, 4, 8, and 24 h of incubation. The plate was washed with PBS and left to dry for 2 h at 37 °C before adding 110 µL of crystal violet (0.4%; Fluka, Gillingham, UK; 61135) for 45 min. The plate was then washed four times with 300 µL water before adding 200 µL of ethanol. Absorbance of the decolorization solution was measured at 550 nm using a spectrophotometer (FLUOstar; BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). Caspofungin at a concentration of 100 µg/mL was used as a control. The biofilm analyzed at T0 represented the basal rate for each condition and corresponded to a rate of 100%. Thus, each condition assessed at T4, T8, and T24 was normalized according to that of the biofilm observed at T0.

2.8. Animal Model

Female C57BL/6 mice aged 3–4 months and certified free from infection were used (Janvier Laboratories, Le Genest-Saint-Isle, France). The mice were kept at 21 °C with free access to water and food and a 12/12 h light/dark cycle in the animal facility of the Faculty of Medicine, Lille University. We used hermetically sealed and filtered single-use plastic cages that were only opened in rooms containing no other animals and were disinfected between each series of experiments. All experiments were performed in accordance with the decrees relating to the ethics of animal experimentation (Decree 86/609/EC), as well as according to Protocol 00550.05.

On day 0, a single oral gavage of 300 µL PBS containing 5 × 10⁷ cells of *C. glabrata* was given to each mouse. The animals received an oral gavage of 250 µL PBS containing the FA (OA and PA) at a concentration of 1 mg/kg/mouse during the first 5 days. To induce chemical colitis in the mice, DSS at a concentration of 1.5% was added to water for the entire duration of the experiment. The optimal effect of DSS was reached on the sixth day. The animals were separated into several groups with free access to water containing 1.5% DSS. The control group (CTL) represented mice receiving water. The groups *C. glabrata* (Cg) alone or FAs alone represented control groups without DSS treatment. D corresponded to mice receiving DSS to induce chemical colitis, DCg to mice receiving DSS and *C. glabrata*, and DCgFA to mice treated with FA and challenged with DSS and *C. glabrata*.

During the experiments, the animals were weighed, and stool samples were collected every 2 days. The stool samples were weighed, homogenized in 1 mL PBS, and then serially diluted in 1 mL 1X PBS

[22,27]. A volume of 100 μL was then added to Petri dishes containing Sabouraud agar. A bacterial culture was performed on MacConkey and bile esculin azide medium for Enterobacteriaceae and Enterococci, respectively. After 24 h of incubation at 37 °C fungal growth was recorded as number of colony-forming units (CFU)/mg of stool. To identify bacterial colonies in the Petri dishes, 1.5 μL of matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; Bruker Daltonics) dissolved in 50% acetonitrile, 47.5% water, and 2.5% trifluoroacetic acid was added to the bacterial colonies, and they were then analyzed using mass spectrometry (MALDI-TOF; Microflex-Bruker Daltonics). On day 14, the mice were sacrificed by cervical dislocation and the colon, stomach, and caecum were collected to determine the fungal load. After different washings with PBS, the colon, stomach, and caecum were weighed and homogenized in 1 mL PBS (TURRAX, T10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA®). Each sample (100 μL) was plated on Sabouraud agar for 24 h at 37 °C. The result was noted as number of CFU/mg of the organ.

2.9. Clinical and Histologic Scores for Inflammation

Clinical scores were assessed independently by two investigators blinded to the study protocol, as described previously [28,29]. Four scores (behavior, body weight, stool consistency, and bleeding) were added together, resulting in a total clinical score ranging from 0 (healthy) to 6 (maximum colitis activity). For analysis of the histologic score, the colon sample from each animal was fixed overnight in 4% paraformaldehyde-acid at 4 °C. The colon samples were then embedded in paraffin at 60 °C overnight. The samples were fixed, cut in a microtome (4 μm thick; RM2245, Leica, Wetzlar, Germany), and scanned with an Axio-Scan.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Germany). For the histologic score, 0 = no epithelial lesion and no leukocyte infiltrates; 3 = presence of epithelial lesion, edema, or leukocyte infiltrates; 6 = presence of epithelial lesions, edema, and leukocyte infiltrates.

2.10. Real-Time mRNA Quantification of Proinflammatory Cytokines and Innate Immune Receptors

RNA was extracted from the colon samples using the NucleoSpin RNA® protocol (Macherey-Nagel, Düren, Germany). For each sample, mRNA (in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was measured with a spectrophotometer (Nanodrop 1000; Thermo Scientific). The ratio of each of our samples was >2.0 , which was a sign of pure RNA. The cDNA synthesis was performed using a high-capacity DNAc reverse-transcription (RT) master mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). For a final volume of 10 μL /sample, the mix contained 2 μL 10X RT buffer, 2 μL 10X RT random primers, 0.8 μL 25X dNTP mix, 1 μL reverse transcriptase, and 4.2 μL RNase-free H₂O. PCR was performed in a 96-well microplate (MicroAmp Fast Optical 96-well; Applied Biosystems). For a final volume of 12 μL /well of each sample, a mix was made containing 0.25 μL of forward and reverse primer, 6 μL of SYBR green (Applied Biosystems), 3 μL of RNase-free H₂O, and 2.5 μL of cDNA from the samples. SYBR green dye intensity was determined using one-step software. The used primers are provided in Table S2 in the Supplementary Materials. The mRNA levels were normalized to the reference gene (POLR2A (mRNA)) and are reported as fold-change in expression over the control group (CTL).

2.11. Statistical Analysis

The data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) of the individual experimental groups. Statistical comparisons were performed using the nonparametric Mann–Whitney test or ANOVA,

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism® 7.0 software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). The *p*-values < 0.05 , 0.01, or 0.001 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization and Identification of Two Fatty Acids from *B. Thetaitaomicron* and *L. johnsonii* by GC-MS

Two FAs were identified from *B. thetaiotaomicron* and *L. johnsonii* during their interaction with epithelial cells from mouse colons (Figure 1). In contrast to the controls (RPMI, colon alone, or colon incubated with *C. glabrata*), two FAs were detected using GC-MS in colon extract incubated with these two anaerobic bacteria. The first FA was detected at a peak of 37.4 min, corresponding to palmitic acid methyl ester (PAME); while the second was observed at 41.4 min, corresponding to oleic acid methyl ester (OAME). This GC-MS analysis indicated the presence of PA and OA following bacterial interaction with the colon samples.

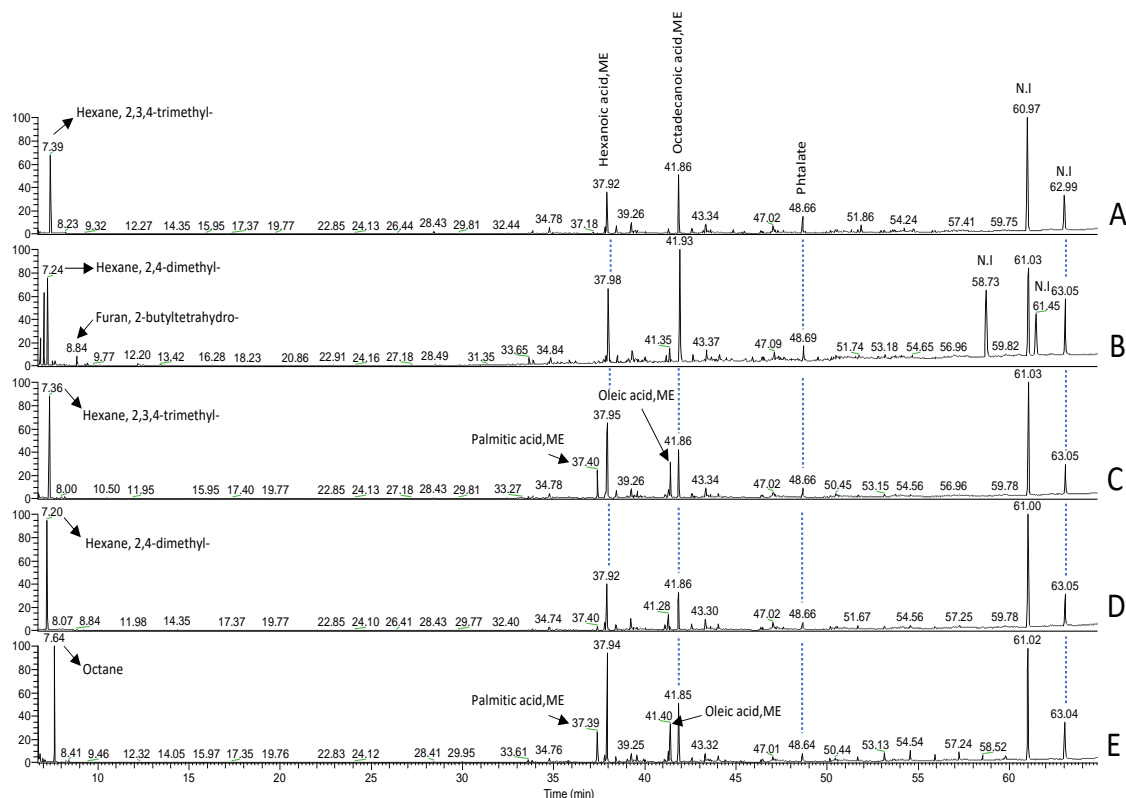


Figure 1. Representative data of the analysis obtained using GC-MS. (A) Analysis of RPMI medium. **(B)** Analysis of a control mouse colon sample. **(C)** Analysis of a mouse colon sample incubated with *L. johnsonii* and *B. thetaiotaomicron*. **(D)** Analysis of a mouse colon sample incubated with *C. glabrata*. **(E)** Analysis of a mouse colon sample incubated with *L. johnsonii*, *B. thetaiotaomicron*, and *C. glabrata*. The retention time (RT) peak of 6.85 min corresponded to tetrahydrofuran, 2-methyl-5-methyl; while the RT peak of 7.04 min was not identified in chromatogram B.

3.2. Effect of These Two Fatty Acids on the Modulation of Proinflammatory Cytokine Expression in Caco-2 Cells Challenged with DSS and on the Migration of Macrophages through DSS-Challenged Caco-2 Cells

Caco-2 cells treated with the fatty acids did not show a significant variation in the expression of TNF α , IL-8, and CCL2 when compared to untreated cells (Figure 2). A significant increase in the expression of these cytokines was seen when the intestinal cells were challenged with 1.5% DSS for 24 h (Figure 2). However, Caco-2 cells treated with FAs and challenged with DSS showed a significant decrease in the expression of these proinflammatory mediators when compared to untreated Caco-2 cells challenged with DSS (Figure 2). The migration of macrophages through Caco-2 cells unchallenged with DSS (CTL-) was assigned a value of 100%, while the positive control corresponded to easy migration of macrophages without Caco-2 cells. Macrophage migration through Caco-2 cells with DSS was assigned a value of 200% (D). Treatment of epithelial cells with either OA or PA did not reduce macrophage migration when compared to untreated Caco-2 cells challenged with DSS (Figure 3). Interestingly, treatment of intestinal cells with both FAs significantly reduced the migration of

macrophages through Caco-2 cells challenged with DSS, indicating that a combination of these two FAs improved the intestinal epithelial barrier (Figure 3).

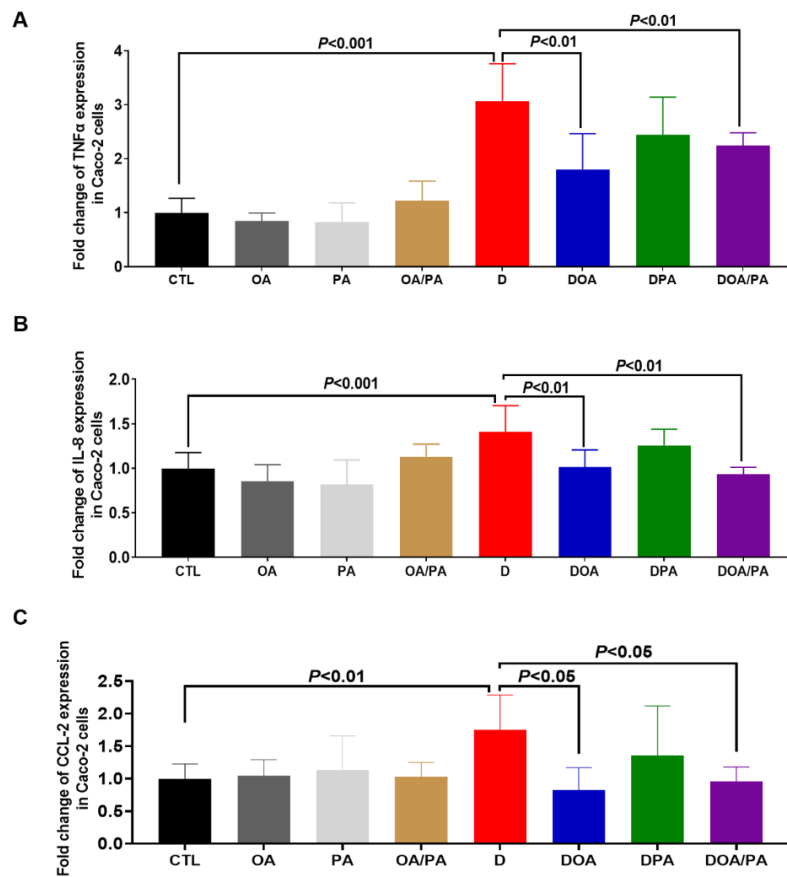


Figure 2. Effect of fatty acids on the modulation of proinflammatory cytokine expression in DSS-treated Caco-2 cells. Relative expression levels of (A) TNF α , (B) IL-8, and (C) CCL-2 mRNA in Caco-2 cells challenged with 1.5% DSS. CTL: control group (Caco-2 cells alone); OA: Caco-2 cells treated with OA; PA: Caco-2 cells treated with PA; OA/PA: Caco-2 cells treated with PA and OA; D: Caco-2 cells challenged with 1.5% DSS; DOA: Caco-2 cells challenged with 1.5% DSS and treated with OA; DPA: Caco-2 cells challenged with 1.5% DSS and treated with PA; DOA/PA: Caco-2 cells challenged with 1.5% DSS and treated with PA and OA. The results were obtained from three independent experiments.

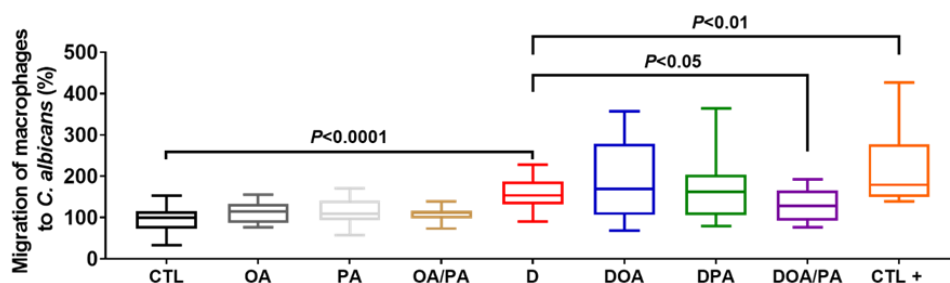


Figure 3. Migration of macrophages to *C. albicans* through Caco-2 cells challenged with DSS and treated with fatty acids (FAs). CTL: control (migration of macrophages through Caco-2 cells untreated with DSS); OA: migration of macrophages through Caco-2 cells treated with OA only and unchallenged with DSS; PA: migration of macrophages through Caco-2 cells treated with PA only and unchallenged with DSS; OA/PA: migration of macrophages through Caco-2 cells treated with both FAs and unchallenged with DSS; D: migration of

macrophages through Caco-2 cells challenged with DSS; DOA: migration of macrophages through Caco-2 cells challenged with DSS and treated with OA; DPA: migration of macrophages through Caco-2 cells challenged with DSS and treated with PA; DOA/PA: migration of macrophages through Caco-2 cells challenged with DSS and treated with both FAs; CTL+: positive control (migration of macrophages without Caco-2 cells). The results were obtained from three independent experiments.

3.3. Effect of Fatty Acids on the Modulation of Proinflammatory Mediators and Receptors in Macrophages

Regarding the receptors mediating FAs as signaling molecules, OA or OA+PA (FAs) increased the expression of FFAR1 and FFAR2 in macrophages. The addition of OA or FAs to macrophages significantly increased the expression of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK), TLR2, AhR, and IL-10, while there was no change in proinflammatory cytokines except for IL-12 expression, which was decreased significantly in macrophages treated with FAs (Figure 4). PA increased FFAR2, TLR2, TNF α , and IL-1 β expression in macrophages.

In LPS-stimulated macrophages, OA, PA, or FAs increased the expression of FFAR3, whereas the expression of FFAR2 was observed only in the presence of OA. LPS-stimulated macrophages resulted in the expression of TLR2, TLR4, TLR8, AhR, COX-2, MyD88, NF- κ B, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2, and CCL5 (Figure 4 and Supplementary Materials Figure S1). Treatment of LPS-stimulated macrophages with FAs significantly decreased COX-2, TNF α , IL-6, IL-12, CCL2, and CCL5, while the expression of FFAR1 was not affected in LPS-stimulated macrophages treated with FAs (Figure 4 and Supplementary Materials Figure S1). Additionally, a high expression of AhR was observed in LPS-stimulated macrophages treated with OA or FAs. Protein expression levels of TNF α and IL-6 revealed the anti-inflammatory effect of FAs in macrophages treated with LPS (Supplementary Materials Figure S2).

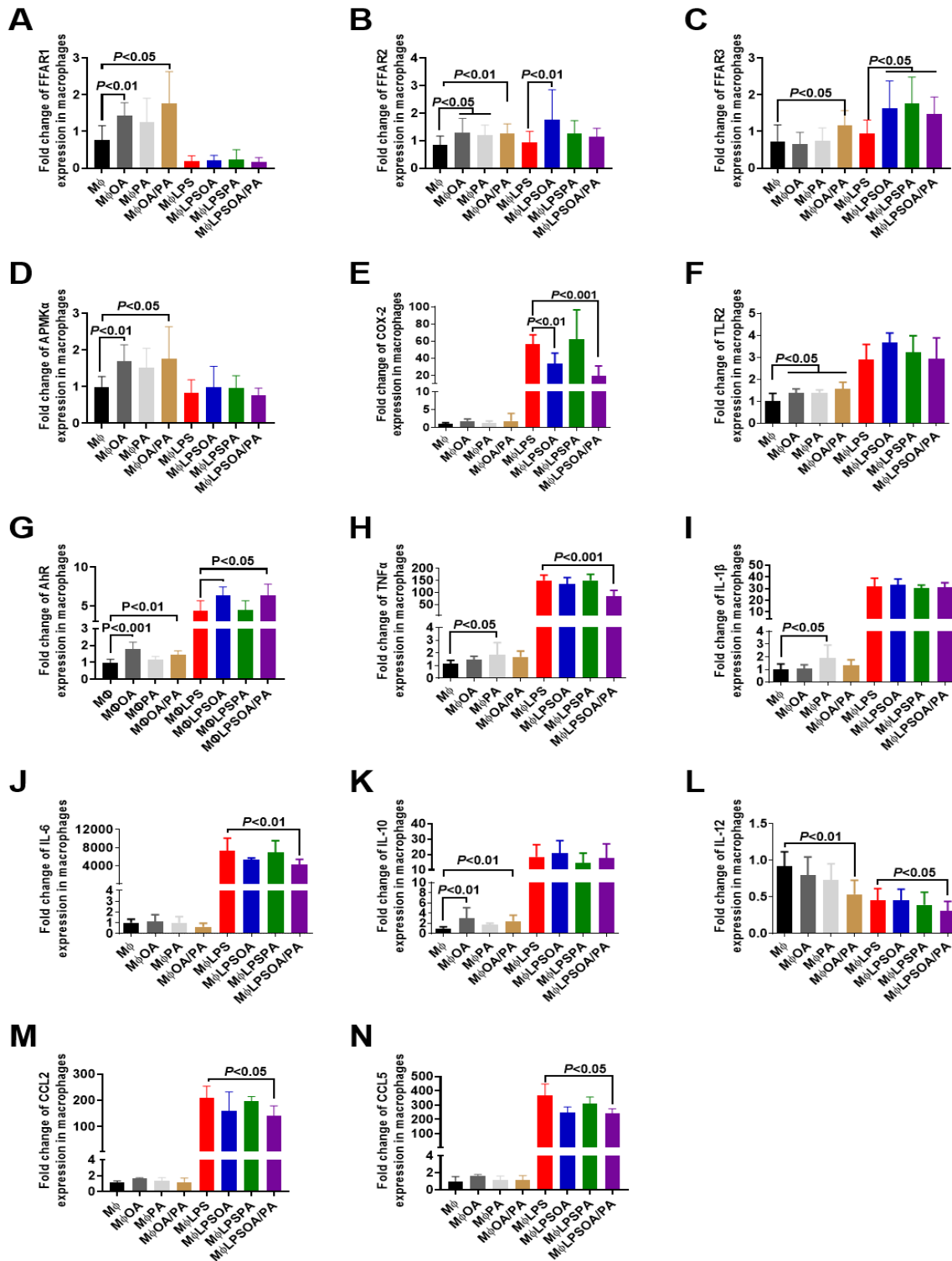


Figure 4. Expression of proinflammatory mediators and receptors in macrophages treated with fatty acids and challenged with lipopolysaccharide (LPS). (A–N) Relative expression levels of FFAR1, FFAR2, FFAR3, AMPK α , COX-2, TLR2, AhR, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, CCL2, and CCL5 mRNA, respectively, in macrophages. M Φ : control group (macrophages alone); M Φ OA, M Φ PA, and M Φ OA/PA: macrophages treated with OA, PA, or FAs (OA/PA), respectively; M Φ LPS: positive control (macrophages exposed to LPS); M Φ LPSOA, M Φ LPSPA, and M Φ LPSOA/PA: macrophages challenged with LPS and treated with OA, PA, or FAs (OA/PA), respectively. The results were obtained from three independent experiments.

3.4. Role of these Two Fatty Acids in Pathogen–Epithelial Cell Interactions

To evaluate whether these two FAs could reduce the adhesion of pathogens, in particular *Candida* spp., to Caco-2 cells, FAs at a concentration of 25 µg/mL were added to Caco-2 cells, and the epithelial cells were then challenged with *C. glabrata*. A decrease in the adhesion of *C. glabrata* to intestinal cells treated with OA, PA, or FAs was observed, indicating that these two FAs protected the intestinal epithelial barrier from pathogen adhesion (Figure 5).

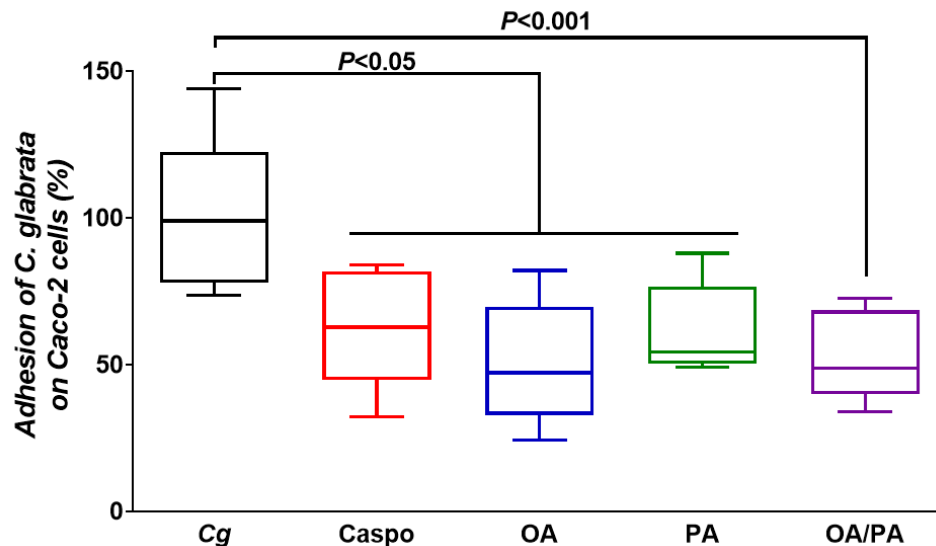


Figure 5. Effect of fatty acids on the adhesion of *C. glabrata* to Caco-2 cells. Cg: control (Caco-2 cells challenged with *C. glabrata*); Caspo: standard control (Caco-2 cells challenged with *C. glabrata* and treated with caspofungin); OA, PA, OA/PA: Caco-2 cells challenged with *C. glabrata* and treated with OA, PA, or FAs (OA/PA), respectively. The results were obtained from two independent experiments.

B. thetaiotaomicron and *L. johnsonii* are known to produce chitinase-like and mannosidase-like activities that promote digestion of the *Candida* cell wall, but the question arose whether these two FAs from these bacteria would have a direct effect on *Candida* viability. The effect of these FAs on *Candida* viability was assessed at various concentrations (10, 25, 50, 100, and 250 µg/mL; Figure 6 and Supplementary Materials Figure S3). In parallel, caspofungin, which is an antifungal drug indicated in the treatment of invasive candidiasis, was used as a standard control. At T0, no variation was observed in the bioluminescence of *C. albicans* treated with FAs at different concentrations when compared to untreated *C. albicans* (Figure 6A). However, a significant decrease in the bioluminescence of *C. albicans* was observed after 1 h of coinubation with OA, PA, or FAs at various concentrations. This significant decrease in the bioluminescence of *C. albicans* was only effective for OA or FAs after 2 h of coinubation at a concentration ≥ 25 µg/mL, indicating that OA exerted a direct antifungal effect against *Candida* when compared to PA. The formation of biofilms, which contain dense yeast cells and hyphae, is an important virulence factor for fungal infection, and correlates strongly with fungal resistance to different antifungal treatments. The effect of FAs on fungal biofilm formation was also determined. Based on the *Candida* viability experiments, FAs at a concentration of 25 µg/mL were used in this biofilm assay. FA treatment significantly decreased biofilm formation by *C. glabrata* and *C. albicans* after 4, 8, or 24 h of incubation (Figure 6B,C), showing that FAs interacted with *Candida* biofilms and affected their formation.

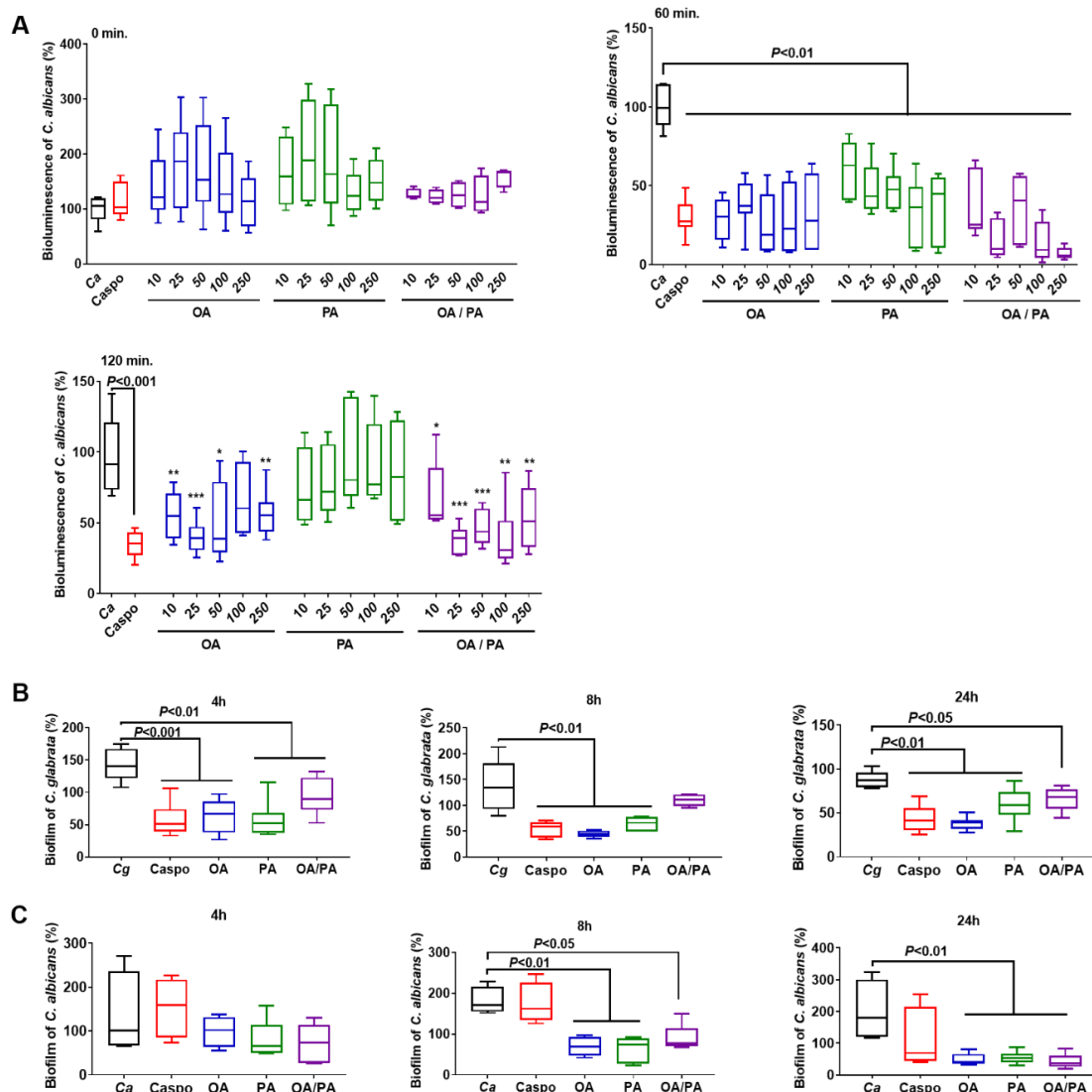


Figure 6. Effect of fatty acids on *Candida* spp. (A) Bioluminescence of *C. albicans* treated with OA, PA, or OA/PA at a concentration of 10, 25, 50, 100, or 250 µg/mL after 0, 60, and 120 min. * $p < 0.05$ OA, PA, or OA/PA vs. *C. albicans*; ** $p < 0.01$ OA, PA, or OA/PA vs. *C. albicans*; *** $p < 0.001$ OA, PA, or OA/PA vs. *C. albicans*. **(B)** Biofilm of *C. glabrata* challenged with OA, PA, or OA/PA at a concentration of 25 µg/mL after 4, 8, and 24 h. **(C)** Biofilm of *C. albicans* challenged with OA, PA, or OA/PA at a concentration of 25 µg/mL after 4, 8, and 24 h. *C. glabrata* (Cg) and *C. albicans* (Ca): control groups; Caspo: standard control, challenge with caspofungin; OA, PA, OA/PA: *C. glabrata* or *C. albicans* challenged with OA, PA, or FAs (OA/PA), respectively. The results were obtained from three independent experiments.

3.5. Effect of Fatty Acids on Modulation of the Inflammatory Immune Response and Fungal Overgrowth in a Murine Model of DSS-Induced Colitis

To assess whether FAs could eliminate *C. glabrata* from the gut during intestinal inflammation, mice were administered an oral inoculum of *C. glabrata* on a day 1, and every mouse was tagged and followed daily in terms of body weight, clinical score for inflammation, and fungal and bacterial load in stool samples. During the experiment, mice received an oral dose of OA and PA at a concentration of 1 mg/kg/mouse daily for 5 days. With regards to inflammatory parameters, control groups corresponding to mice receiving water (CTL), FA alone, and *C. glabrata* (Cg) did not show any signs of inflammation in terms of clinical and histologic scores (Figure 7A,B). Furthermore, FA prevented the increase in clinical scores for inflammation for DFA (DSS + FA) and DCgFA (DSS + Cg + FA) when compared to groups D (DSS only) and DCg (DSS + Cg) (Figure 7A). With regard to the histologic

score for inflammation, colon sections from D and DCg mice showed greater leukocyte infiltrate, edema, and epithelial lesions, while FA treatment significantly decreased the signs of inflammation in colons from DFA and DCgFA mice, showing that FA prevented epithelial damage by exerting an anti-inflammatory effect during the development of colitis (Figure 7B,C).

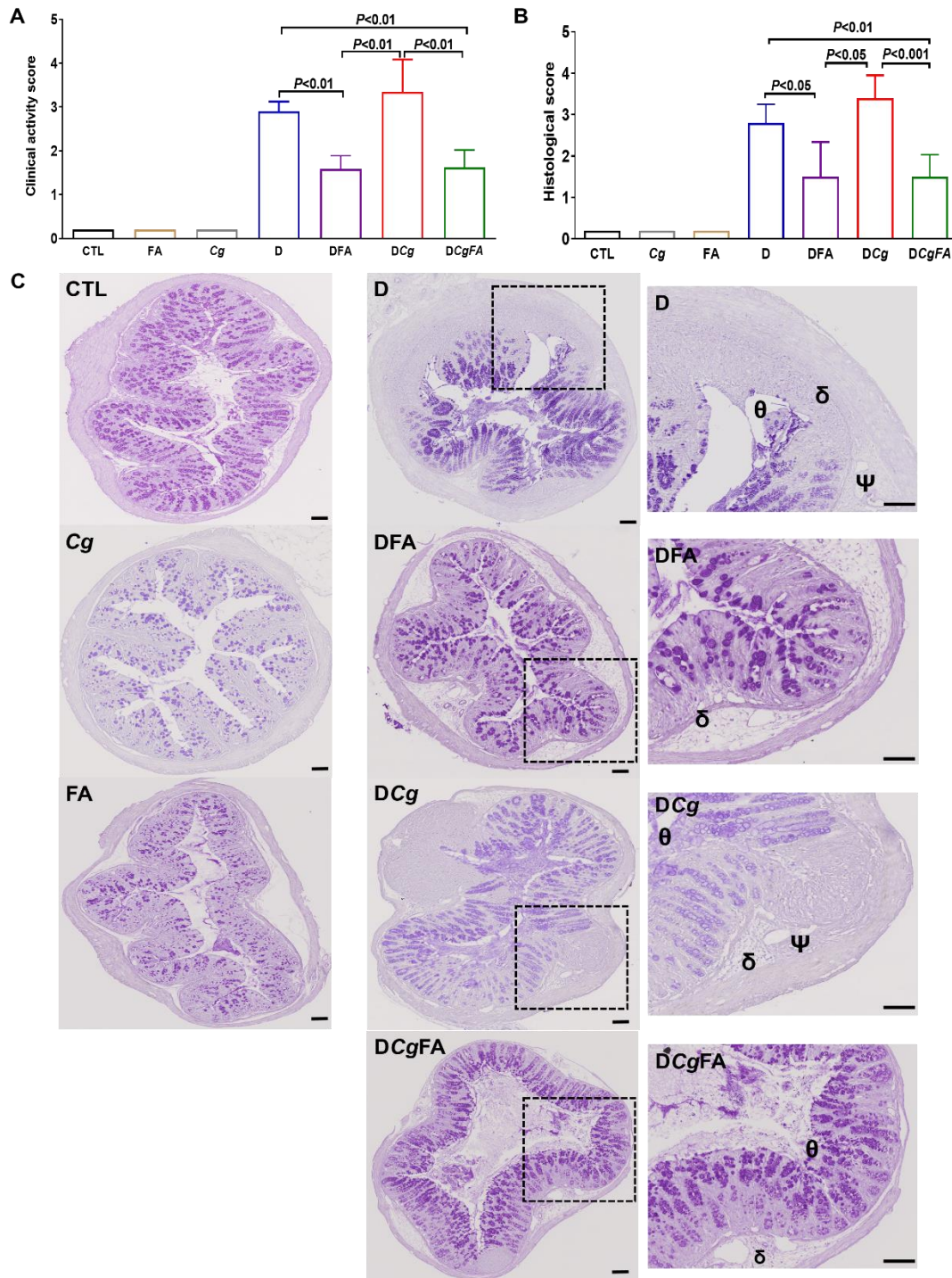


Figure 7. Effect of fatty acids (FAs) on inflammatory parameters in the DSS-induced colitis mouse model. (A) Clinical analysis of DSS-induced colitis in mice. Control groups correspond to CTL (water), Cg (*C. glabrata*), and FAs (OA and PA). Experimental groups correspond to D (DSS), DCg (DSS and *C. glabrata*), DFA (DSS + OA/PA), and DCgFA (DSS + *C. glabrata* + OA/PA). (B) Histologic scores for inflammation. (C) Histologic analysis of colon sections from DSS-induced colitis. Scale bar corresponds to 50 μ m.

3.6. Fungal Load in the Stools and Gut Was Investigated Every 2 Days and in the Digestive Tract on Day 14 (Colon, Cecum, and Stomach)

No *C. glabrata* was observed in stools or the gut of the CTL group receiving water. For Cg, DCg, or DCgFA mice, on day 1, after *C. glabrata* challenge, a significant fungal load in stools was observed in all groups, while a rapid decrease in *C. glabrata* CFU was recorded on day 2 in all groups, indicating that the mice were not natural hosts for *C. glabrata*. This fungal decrease continued until day 6, when elimination of *C. glabrata* was observed in the Cg group (control group untreated with DSS) and in mice treated with FAs (DCgFA), while the DCg group had a significant increase in fungal load from day 12, correlating with significant signs of inflammation (Figure 8A). In addition, FA treatment significantly decreased *C. glabrata* in the stomach, indicating that FAs promoted the elimination of *C. glabrata* from the gut (Figure 8B).

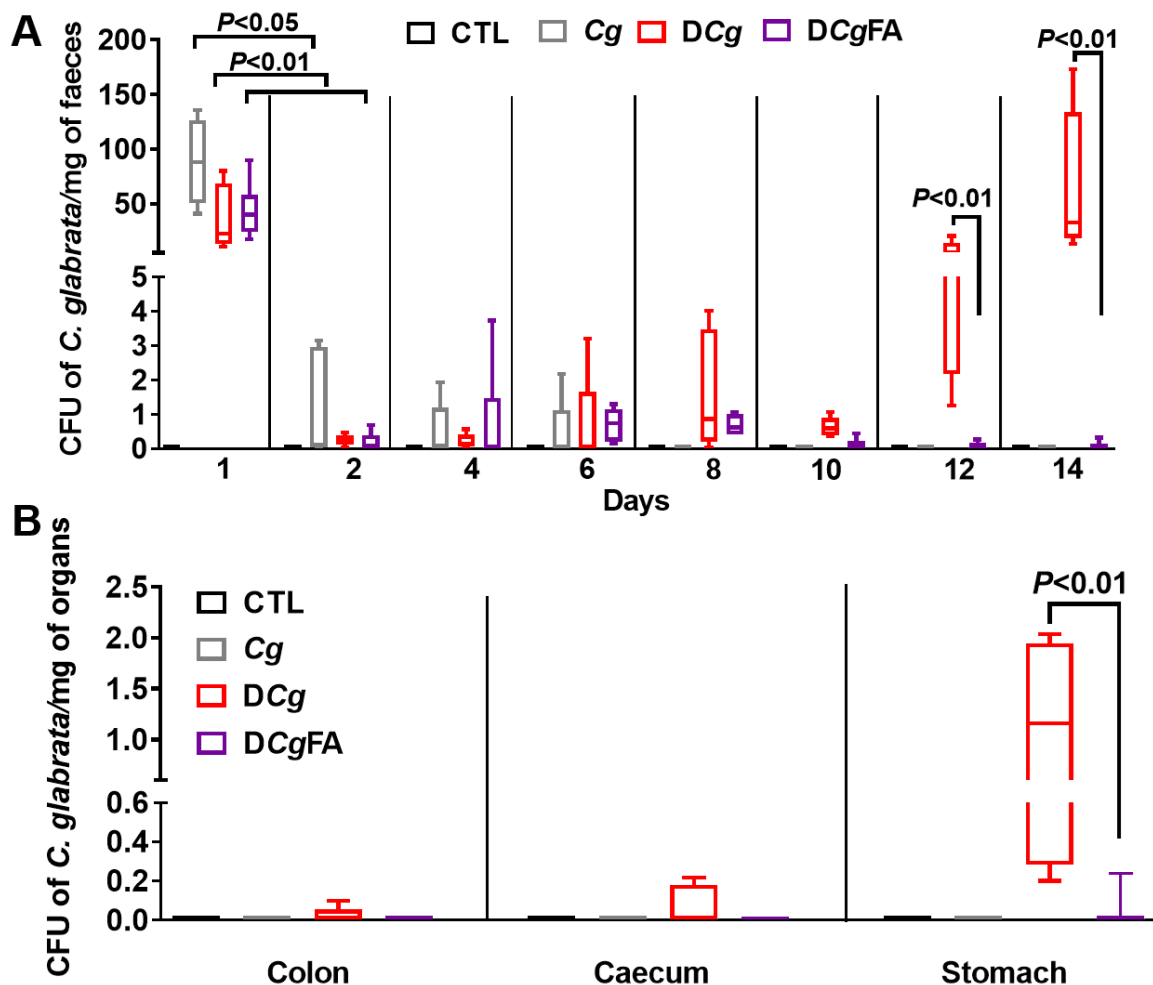


Figure 8. Effect of fatty acids (FAs) on *C. glabrata* elimination from the gut in mice with DSS-induced colitis. (A) Determination of the number of *C. glabrata* colonies recovered from stools. **(B)** Number of *C. glabrata* colonies recovered from the stomach, caecum, and colon. The four groups consisted of controls (CTL; water), *C. glabrata* alone (Cg), DSS + *C. glabrata* (DCg), and DSS + *C. glabrata* + FAs (DCgFA). Data are the mean \pm SD of six mice per group.

In terms of the effect of FAs on modulating pathogenic bacteria, in particular *E. coli* and *Enterococcus faecalis*, which are involved in the pathogenesis of IBD, populations of *E. coli* and *E. faecalis* increased significantly during the development of colitis in D and DCg mice when compared to control mice (Figure 9A,B). These bacterial populations significantly decreased in mice treated with FAs (DFA

and DCgFA), indicating that FAs affected not only the *Candida* populations, but also the *E. coli* and *E. faecalis* populations.

The expression levels of MyD88, FOXP3, and proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α , and INF γ) were assessed in the colons (Figure 10D–E,G–J). In contrast to FOXP3, expression of MyD88, IL-1 β , IL-6, TNF α , and INF γ was significantly lower in the colons of DCgFA mice than in DCg mice, indicating that FAs attenuated the inflammatory response caused by *C. glabrata* overgrowth (Figure 10D–E,G–J). In addition, the expression levels of TLR-8 were significantly decreased, while dectin-1, aryl hydrocarbon receptor (AhR), and IL-10 expression increased in DFA and DCgFA mice (Figure 10A–C,F).

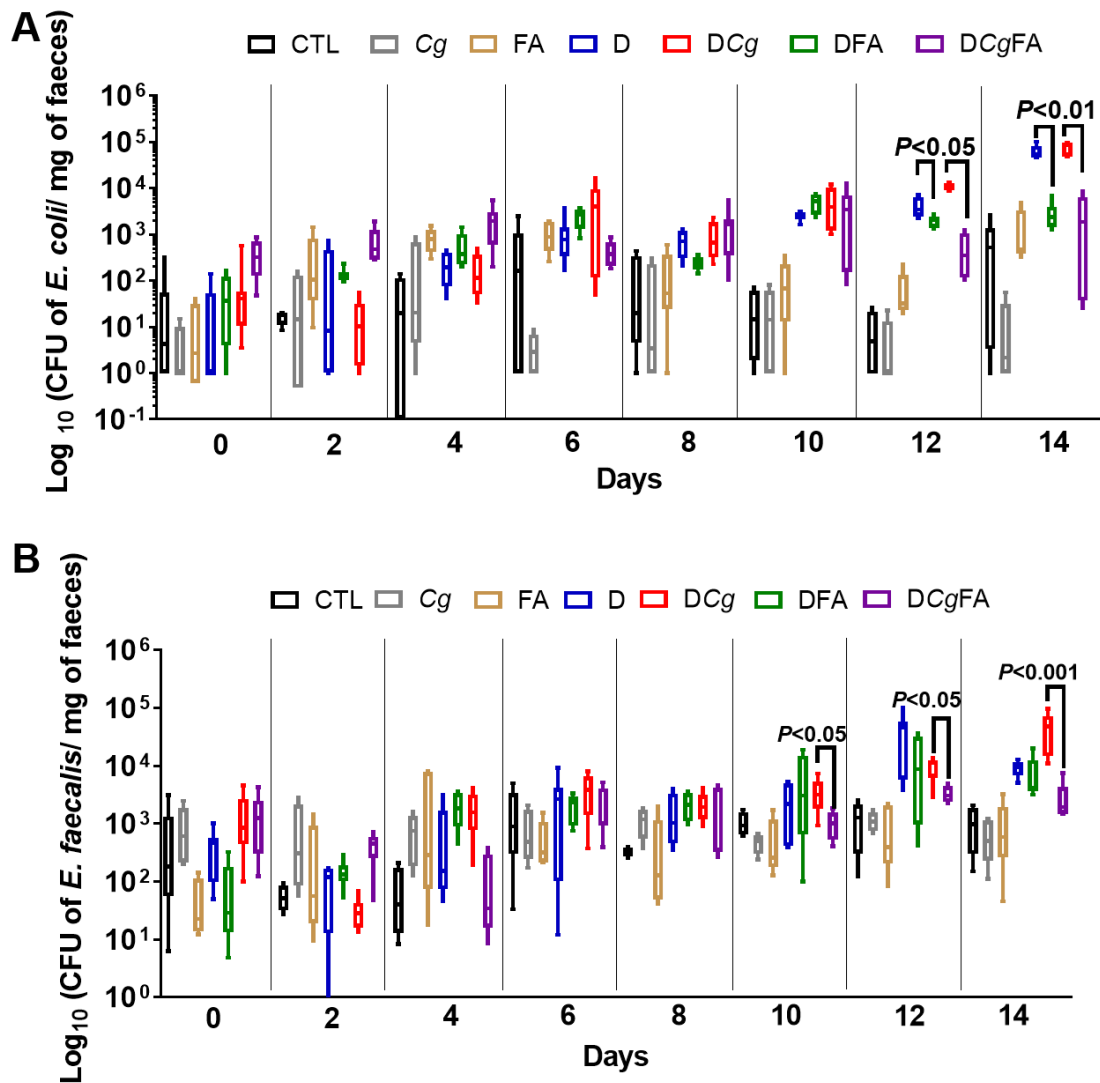


Figure 9. Cultivable *E. faecalis* and *E. coli* after fatty acid (FA) treatment in mice with DSS-induced colitis. (A) Number of *E. coli* colony-forming units (CFUs) recovered from stool samples. (B) Number of *E. faecalis* CFUs recovered from stool samples. Stool bacteria were isolated from mice on day 0 before *C. glabrata*, DSS challenge, and FA treatment. The seven groups consisted of controls (CTL; water), *C. glabrata* alone (Cg), oleic and palmitic acids alone (FA), DSS alone (D), DSS + oleic and palmitic acids (DFA), DSS + *C. glabrata* (DCg), and DSS + *C. glabrata* + oleic and palmitic acids (DCgFA). Data are the mean \pm SD of six mice per group.

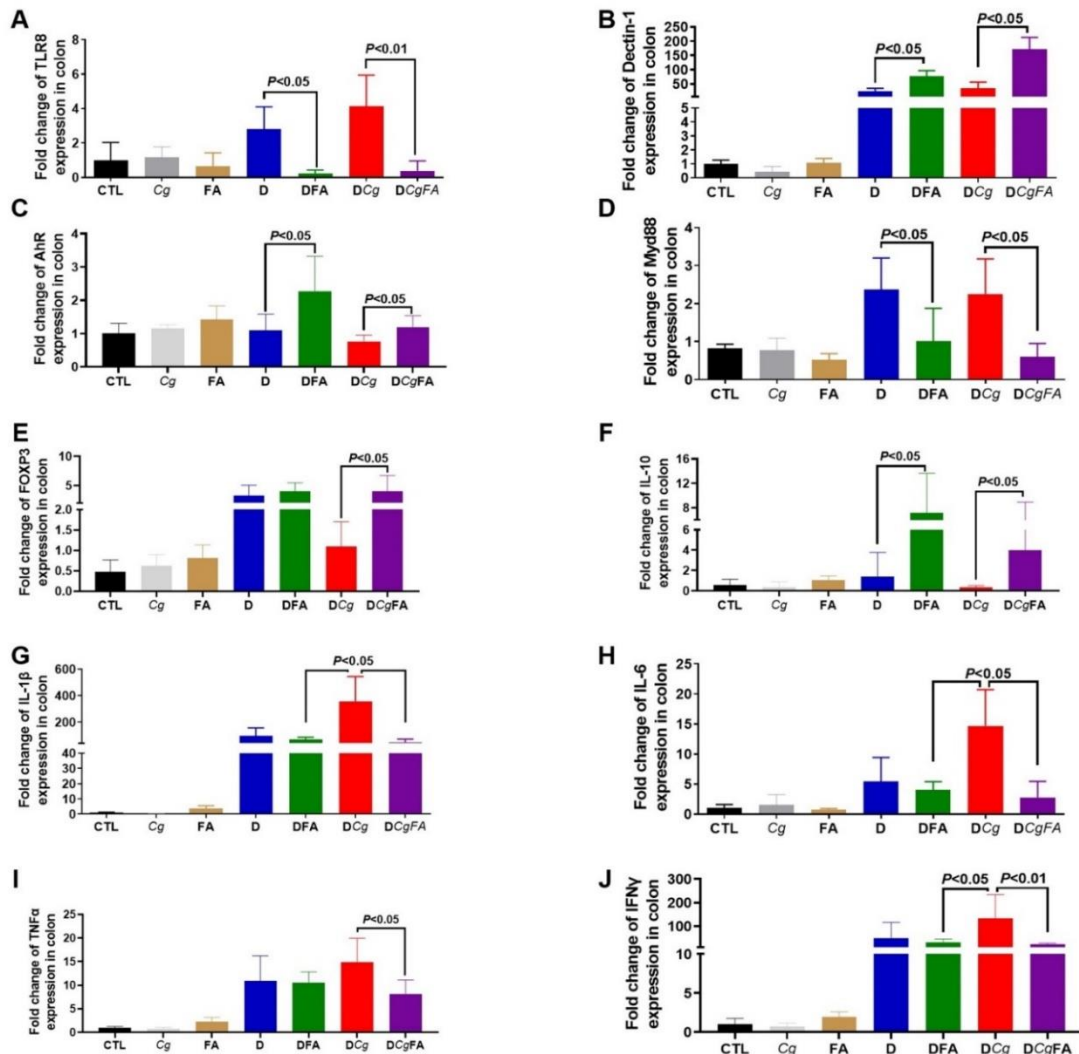


Figure 10. Cytokine and receptor expression after FA treatment. (A–E) Relative expression levels of TLR8, dectin-1, AhR, Myd88, FXP3, IL-10, IL-1β, IL-6, TNFα, and IFNγ mRNA in mouse colons. Data are the mean ±SD of six per group.

4. Discussion

Alteration of the gut microbiota plays a crucial role in many human diseases, including IBD [3,14,30]. Microbial changes in IBD show a decrease in biodiversity of the gut microbiota, in particular strict anaerobic species within the Firmicutes and Actinobacteria phyla [31]. Reduced *Bacteroides* spp. are also observed in IBD, more so in active disease than during remission [32]. The gut microbiota is critical to health and is essential for healthy immune development. Furthermore, some microbial metabolites are key regulators of the host–gut environment, including FAs produced by microbial fermentation [33]. In the murine model of DSS-induced colitis, it has been shown that intestinal inflammation in the gut increased the aerobic bacterial population, in particular *E. coli* and *E. faecalis*, but decreased the population of anaerobic bacteria such as *L. johnsonii* and *B. thetaiotaomicron* [10]. Restoration of these two anaerobic bacteria alleviated the development of colitis in mice, mediated by the modulation of proinflammatory cytokine and TLR expression [11]. Since *L. johnsonii* and *B. thetaiotaomicron* exert a beneficial effect on intestinal inflammation, the present study identified two FAs from these two anaerobic bacteria during their interaction with colonic epithelial cells. A GC-MS analysis revealed that PA and OA from these two anaerobic bacteria could be detected during their interaction

with colonic epithelial cells. PA (16:0) is a saturated fatty acid that is known to modulate the immune system by inducing monocyte activation and stimulating proinflammatory responses in human immune cells [34]. OA (18:1) is an unsaturated fatty acid that exhibits anti-inflammatory properties in humans [35]. Both PA and OA are found in animals, plants, and microorganisms. In the present study, OA alone or OA combined with PA reduced the expression of proinflammatory mediators in Caco-2 cells challenged with DSS. Additionally, OA alone or OA combined with PA improved intestinal epithelial Caco-2 cells through a reduction in macrophage migration during inflammation. PA alone did not exhibit any anti-inflammatory properties on epithelial cells or macrophages when compared to OA. In line with these data, Finucane et al. showed that OA inhibited ATP-induced IL-1 β production through an AMPK-dependent mechanism in LPS- and PA-exposed macrophages [36].

OA and PA are mediated through FFAR1, FFAR2, and FFA3 [37,38]. FFARs are critical for metabolic functions and contribute to energy homeostasis and modulation of inflammation [39]. In terms of the role of FFAR in inflammation, FFAR1 signaling induced by a gut microbial metabolite of linoleic acid restored intestinal epithelial barrier impairment [40]. Different studies have demonstrated the role of FFAR2 in modulation of the inflammatory response [38,40]. Activation of FFAR2 inhibited colitis and inflammation, while mice deficient in FFAR2 showed a severe inflammatory response in colitis that was related to an increase in the recruitment of immune cells [41]. In the current study, OA alone or FAs (OA/PA) increased FFAR1, FFAR2, AMPK, and IL-10 expression in macrophages. Impaired AMPK in macrophages has been shown to be associated with greater production of proinflammatory cytokines [42]. Savado et al. reported that the beneficial effect of OA was dependent on the activation of AMPK, a metabolic sensor that modulates inflammation [43]. Additionally, Howe et al. showed that OA and PA differently modulated TLR2-mediated inflammatory responses in macrophages [44]. We observed that OA increased IL-10 expression in macrophages. These observations were consistent with experimental studies, which showed that the anti-inflammatory effects of an OA-enriched diet improved whole-body insulin resistance by reducing the inflammatory response and increasing IL-10 levels in an animal model of diet-induced obesity [45]. The addition of OA alone or FAs to LPS-stimulated macrophages decreased COX-2, TNF α , IL-6, and IL-12 production. In line with these observations, Muller et al. showed that the addition of OA to LPS-stimulated macrophages significantly reduced LPS-induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNos), COX-2, and IL-6 expression [46].

In addition to the effect of FAs on modulation of the inflammatory response in macrophages and intestinal epithelial Caco-2 cells, these two FAs have also been shown to exhibit antibacterial and antifungal activity. In the present study, FA treatment significantly decreased *Candida* viability and *Candida* spp. biofilm formation. Muthami et al. showed, using proteomic analysis of *C. albicans*, that OA exerted stress conditions such as heat stress and targeted the proteins implicated in glucose metabolism, ergosterol biosynthesis, lipase production, iron homeostasis, and amino acid biosynthesis [47]. Like OA, PA inhibited the virulence factors of *Candida* spp. such as ergosterol biosynthesis, enzymatic activity, and mature biofilm formation at various time points [48].

Given that OA and PA were detected during the interaction of *L. johnsonii* and *B. thetaiotaomicron* with colonic epithelial cells, and the combination of OA and PA had anti-inflammatory and antifungal properties in vitro, these FAs were evaluated in the murine model of DSS-induced colitis. FA prevented the increase in clinical and histologic scores for inflammation and allowed the elimination of *C. glabrata* from the gut. This observation was supported by a reduction in the *E. coli* and *E. faecalis* populations in mice treated with FAs, indicating that these FAs were not only able to decrease *C. albicans* colonization, but also attenuated intestinal inflammation. Reddy et al. showed that the antioxidant activity of OA inhibited mucosal damage, as evidenced by lower crypt distortion, edema, and abundant goblet cells in the mucosa [49]. In this animal model, increased expression of IL-1 β and IL-6 was associated with the development of inflammation and *C. glabrata* overgrowth in mice, while FA attenuated the expression of these cytokines. Ben-Dror et al. showed that the combination of OA and PA significantly alleviated cellular stress and inflammation marker levels [50]. Additionally, the expression of TLR8 and MyD88 decreased in mice treated with FAs. This reduction was correlated

with the reduction in *C. glabrata*, *E. coli*, and *E. faecalis* populations in mice treated with FAs, showing that the effect of FAs on pathogens modulated the inflammatory response mediated via TLR/MyD88. In contrast, FA treatment increased dectin-1 expression in the colons of DCg mice. This observation was in line with a previous study showing that dectin-1 expression was increased during the elimination of *C. glabrata* in mice with DSS-induced colitis [10]. Expression of AhR, which is a receptor for aromatic hydrocarbons, was suppressed in the intestines of patients with IBD [51,52]. AhR $-/-$ mice exhibited severe inflammatory parameters in DSS-induced colitis and produced high levels of proinflammatory cytokines, suggesting that the function of AhR in the intestine is protective [53]. In the present study, we observed that FAs increased the expression of AhR in mice treated with DSS or DSS+*C. glabrata*, and this increase in AhR expression was correlated with the increase in IL-6, TNF α , and IFN γ . Lamas et al. showed that the administration of three *Lactobacillus* strains to mice promoted the activation of AhR by rescuing impaired IL-22 production and allowed the attenuation of intestinal inflammation [54].

In conclusion, OA and PA were detected during the interaction of *L. johnsonii* and *B. thetaiotaomicron* with colonic epithelial cells. OA alone or FAs reduced the expression of proinflammatory mediators in Caco-2 cells challenged with DSS. OA alone or FAs increased FFAR1, FFAR2, AMPK, and IL-10 expression in macrophages. Additionally, OA alone or FAs decreased COX-2, TNF α , IL-6, and IL-12 expression in LPS-stimulated macrophages. In the DSS-induced colitis model, oral administration of FAs prevented the increase in clinical and histologic scores for inflammation, reduced the *E. coli* and *E. faecalis* populations, and eliminated *C. glabrata* from the gut. Overall, these findings provided evidence that FAs have anti-inflammatory and antifungal properties. These two FAs decreased the inflammatory response in macrophages mediated via FFAR1, FFAR2, FFAR3, and AMPK; attenuated the development of colitis; and were involved in the elimination of *C. glabrata* from the gut. This study emphasized the importance of adding unsaturated FAs, in particular OA, to the human diet to promote the attenuation of intestinal inflammation and fungal elimination from the gut. In addition, the current work offers new perspectives for exploring the effect of polysaturated and trans isomers of both OA and PA on fungal overgrowth, as well as how these FAs can modulate the microbiota biodiversity and intestinal inflammation.

Author Contributions: R.C., C.L.D. and S.J. performed the experiments; R.C., C.L.D., B.S., P.N.-L.M. and S.J. analyzed the data; R.C., C.L.D., B.S. and S.J. interpreted the results of the experiments; C.L.D. and P.N.-L.M. contributed to the reagents/materials/analysis tools; S.J. designed the experiments and drafted the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) in the setting of the “InnateFun” project (promotional reference ANR-16-IFEC-0003-05) in the “Infect-ERA” program.

Acknowledgments: The authors thank Clovis Bortolus, Corentin Dumortier, Antonino Bongiovanni, and Nadine François for their excellent technical assistance.

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

References

- Seyed Tabib, N.S.; Madgwick, M.; Sudhakar, P.; Verstockt, B.; Korcsmaros, T.; Vermeire, S. Big data in IBD: Big progress for clinical practice. *Gut* **2020**, *69*, 1520–1532.
- Leppkes, M.; Neurath, M.F. Cytokines in inflammatory bowel diseases-Update 2020. *Pharmacol. Res.* **2020**, *158*, 104835.
- Hoarau, G.; Mukherjee, P.K.; Gower-Rousseau, C.; Hager, C.; Chandra, J.; Retuerto, M.A.; Neut, C.; Vermeire, S.; Clemente, J.; Colombel, J.F.; et al. Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease. *mBio* **2016**, *7*, e01250-16.
- Jawhara, S. How Fungal Glycans Modulate Platelet Activation via Toll-Like Receptors Contributing to the Escape of *Candida albicans* from the Immune Response. *Antibiotics* **2020**, *9*, 385.
- Poulain, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *41*, 208–217.
- Frank, D.N.; St Amand, A.L.; Feldman, R.A.; Boedeker, E.C.; Harpaz, N.; Pace, N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13780–13785.
- Standaert-Vitse, A.; Sendid, B.; Joossens, M.; François, N.; Vandewalle-El Khoury, P.; Branche, J.; Van Kruiningen, H.; Jouault, T.; Rutgeerts, P.; Gower-Rousseau, C.; et al. *Candida albicans* colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* **2009**, *104*, 1745–1753.
- Jawhara, S.; Thuru, X.; Standaert-Vitse, A.; Jouault, T.; Mordon, S.; Sendid, B.; Desreumaux, P.; Poulain, D. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J. Infect Dis.* **2008**, *197*, 972–80.
- Jawhara, S.; Poulain, D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med. Mycol.* **2007**, *45*, 691–700.
- Charlet, R.; Pruvost, Y.; Tumba, G.; Istel, F.; Poulain, D.; Kuchler, K.; Sendid, B.; Jawhara, S. Remodeling of the *Candida glabrata* cell wall in the gastrointestinal tract affects the gut microbiota and the immune response. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3316.
- Charlet, R.; Bortolus, C.; Sendid, B.; Jawhara, S. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus johnsonii* modulate intestinal inflammation and eliminate fungi via enzymatic hydrolysis of the fungal cell wall. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11510.
- Huda-Faujan, N.; Abdulmir, A.S.; Fatimah, A.B.; Anas, O.M.; Shuhaimi, M.; Yazid, A.M.; Loong, Y.Y. The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *Open Biochem. J.* **2010**, *4*, 53–58.
- Schicho, R.; Shaykhutdinov, R.; Ngo, J.; Nazzyrova, A.; Schneider, C.; Panaccione, R.; Kaplan, G.G.; Vogel, H.J.; Storr, M. Quantitative metabolomic profiling of serum, plasma, and urine by (1)H NMR spectroscopy discriminates between patients with inflammatory bowel disease and healthy individuals. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 3344–57.
- Mentella, M.C.; Scaldaferrri, F.; Pizzoferrato, M.; Gasbarrini, A.; Miggiano, G.A.D. Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients* **2020**, *12*, E944.
- Hou, J.K.; Abraham, B.; El-Serag, H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* **2011**, *106*, 563–573.
- Agus, A.; Denizot, J.; Thevenot, J.; Martinez-Medina, M.; Massier, S.; Sauvanet, P.; Bernalier-Donadille, A.; Denis, S.; Hofman, P.; Bonnet, R.; et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19032.
- Geirnaert, A.; Calatayud, M.; Grootaert, C.; Laukens, D.; Devriese, S.; Smagge, G.; De Vos, M.; Boon, N.; Van de Wiele, T. Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11450.
- Ahmad, M.S.; Krishnan, S.; Ramakrishna, B.S.; Mathan, M.; Pulimood, A.B.; Murthy, S.N. Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. *Gut* **2000**, *46*, 493–499.
- Huang, C.B.; Alimova, Y.; Myers, T.M.; Ebersole, J.L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral. Biol.* **2011**, *56*, 650–654.
- Hayama, K.; Takahashi, M.; Yui, S.; Abe, S. Inhibitory effects of several saturated fatty acids and their related fatty alcohols on the growth of *Candida albicans*. *Drug Discov. Ther.* **2015**, *9*, 386–390.
- Mena, L.; Billamboz, M.; Charlet, R.; Despres, B.; Sendid, B.; Ghinet, A.; Jawhara, S. Two New Compounds Containing Pyridinone or Triazine Heterocycles Have Antifungal Properties against *Candida albicans*. *Antibiotics* **2022**, *11*, 72.

Jawhara, S.; Mogensen, E.; Maggiotto, F.; Fradin, C.; Sarazin, A.; Dubuquoy, L.; Maes, E.; Guerardel, Y.; Janbon, G.; Poulain, D. Murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis reveals *Candida glabrata* virulence and contribution of beta-mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 11313–11324.

Dumortier, C.; Charlet, R.; Bettaieb, A.; Jawhara, S. H89 Treatment Reduces Intestinal Inflammation and *Candida albicans* Overgrowth in Mice. *Microorganisms* **2020**, *8*, 2039.

Choteau, L.; Parny, M.; Francois, N.; Bertin, B.; Fumery, M.; Dubuquoy, L.; Takahashi, K.; Colombel, J.F.; Jouault, T.; Poulain, D.; et al. Role of mannose-binding lectin in intestinal homeostasis and fungal elimination. *Mucosal Immunol.* **2016**, *9*, 767–776.

Dufrenoy, P.; Charlet, R.; Hechelski, M.; Daich, A.; Waterlot, C.; Jawhara, S.; Ghinet, A. New Efficient Eco-Friendly Supported Catalysts for the Synthesis of Amides with Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 459–467.

Kavanaugh, N.L.; Zhang, A.Q.; Nobile, C.J.; Johnson, A.D.; Ribbeck, K. Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. *mBio* **2014**, *5*, e01911.

Charlet, R.; Sendid, B.; Kaveri, S.V.; Poulain, D.; Bayry, J.; Jawhara, S. Intravenous Immunoglobulin Therapy Eliminates *Candida albicans* and Maintains Intestinal Homeostasis in a Murine Model of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1473.

Hartmann, G.; Bidlingmaier, C.; Siegmund, B.; Albrich, S.; Schulze, J.; Tschoep, K.; Eigler, A.; Lehr, H.A.; Endres, S. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 22–30.

Jawhara, S.; Habib, K.; Maggiotto, F.; Pignede, G.; Vandekerckove, P.; Maes, E.; Dubuquoy, L.; Fontaine, T.; Guerardel, Y.; Poulain, D. Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: Strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40648.

Zhuang, Z.-Q.; Shen, L.-L.; Li, W.-W.; Fu, X.; Zeng, F.; Gui, L.; Lü, Y.; Cai, M.; Zhu, C.; Tan, Y.-L.; et al. Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis. JAD* **2018**, *63*, 1337–1346.

Prosberg, M.; Bendtsen, F.; Vind, I.; Petersen, A.M.; Gluud, L.L. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: A systematic review and meta-analysis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2016**, *51*, 1407–1415.

Zhou, Y.; Zhi, F. Lower Level of Bacteroides in the Gut Microbiota Is Associated with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 5828959.

Zhang, S.; Dogan, B.; Guo, C.; Herlekar, D.; Stewart, K.; Scherl, E.J.; Simpson, K.W. Short Chain Fatty Acids Modulate the Growth and Virulence of Pathosymbiont *Escherichia coli* and Host Response. *Antibiotics* **2020**, *9*, E462.

Palomer, X.; Pizarro-Delgado, J.; Barroso, E.; Vázquez-Carrera, M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **2018**, *29*, 178–190.

Gonçalves-de-Albuquerque, C.F.; Medeiros-de-Moraes, I.M.; Oliveira, F.M.d.J.; Burth, P.; Bozza, P.T.; Castro Faria, M.V.; Silva, A.R.; Castro-Faria-Neto, H.C.d. Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153607>

Burth, P.; Bozza, P.T.; Castro Faria, M.V.; Silva, A.R.; Castro-Faria-Neto, H.C.d. Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153607>

Finucane, O.M.; Lyons, C.L.; Murphy, A.M.; Reynolds, C.M.; Klinger, R.; Healy, N.P.; Cooke, A.A.; Coll, R.C.; McAllan, L.; Nilaweera, K.N.; et al. Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes* **2015**, *64*, 2116–28.

Mena, S.J.; Manosalva, C.; Carretta, M.D.; Teuber, S.; Olmo, I.; Burgos, R.A.; Hidalgo, M.A. Differential free fatty acid receptor-1 (FFAR1/GPR40) signalling is associated with gene expression or gelatinase granule release in bovine neutrophils. *Innate Immun.* **2016**, *22*, 479–489.

Kimura, I.; Ichimura, A.; Ohue-Kitano, R.; Igarashi, M. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2020**, *100*, 171–210.

Miyamoto, J.; Hasegawa, S.; Kasubuchi, M.; Ichimura, A.; Nakajima, A.; Kimura, I. Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 450.

Miyamoto, J.; Mizukure, T.; Park, S.-B.; Kishino, S.; Kimura, I.; Hirano, K.; Bergamo, P.; Rossi, M.; Suzuki, T.; Arita, M.; et al. A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 2902–2918.

Maslowski, K.M.; Vieira, A.T.; Ng, A.; Kranich, J.; Sierro, F.; Yu, D.; Schilter, H.C.; Rolph, M.S.; Mackay, F.; Artis, D.; et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **2009**, *461*, 1282–1286.

Banskota, S.; Wang, H.; Kwon, Y.H.; Gautam, J.; Gurung, P.; Haq, S.; Hassan, F.M.N.; Bowdish, D.M.; Kim, J.-A.; Carling, D.; et al. Salicylates Ameliorate Intestinal Inflammation by Activating Macrophage AMPK. *Inflamm. Bowel Dis.* **2021**, *27*, 914–926.

- Salvadó, L.; Coll, T.; Gómez-Foix, A.M.; Salmerón, E.; Barroso, E.; Palomer, X.; Vázquez-Carrera, M. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* **2013**, *56*, 1372–1382.
- Howe, A.M.; Burke, S.; O'Reilly, M.E.; McGillicuddy, F.C.; Costello, D.A. Palmitic Acid and Oleic Acid Differently Modulate TLR2-Mediated Inflammatory Responses in Microglia and Macrophages. *Mol. Neurobiol.* **2022**, *59*, 2348–2362.
- Oliveira, V.; Marinho, R.; Vitorino, D.; Santos, G.A.; Moraes, J.C.; Dragano, N.; Sartori-Cintra, A.; Pereira, L.; Catharino, R.R.; Da Silva, A.S.R.; et al. Diets Containing α -Linolenic (ω 3) or Oleic (ω 9) Fatty Acids Rescues Obese Mice from Insulin Resistance. *Endocrinology* **2015**, *156*, 4033–4046.
- Müller, A.K.; Albrecht, F.; Rohrer, C.; Koeberle, A.; Werz, O.; Schlörmann, W.; Glei, M.; Lorkowski, S.; Wallert, M. Olive Oil Extracts and Oleic Acid Attenuate the LPS-Induced Inflammatory Response in Murine RAW264.7 Macrophages but Induce the Release of Prostaglandin E2. *Nutrients* **2021**, *13*, 4437.
- Muthamil, S.; Prasath, K.G.; Priya, A.; Precilla, P.; Pandian, S.K. Global proteomic analysis deciphers the mechanism of action of plant derived oleic acid against *Candida albicans* virulence and biofilm formation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5113.
- Prasath, K.G.; Tharani, H.; Kumar, M.S.; Pandian, S.K. Palmitic Acid Inhibits the Virulence Factors of *Candida tropicalis*: Biofilms, Cell Surface Hydrophobicity, Ergosterol Biosynthesis, and Enzymatic Activity. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 864.
- Reddy, K.V.K.; Naidu, K.A. Oleic acid, hydroxytyrosol and n-3 fatty acids collectively modulate colitis through reduction of oxidative stress and IL-8 synthesis; in vitro and in vivo studies. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *35*, 29–42.
- Ben-Dror, K.; Birk, R. Oleic acid ameliorates palmitic acid-induced ER stress and inflammation markers in naive and cerulein-treated exocrine pancreas cells. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20190054.
- Monteleone, I.; Pallone, F.; Monteleone, G. Th17-related cytokines: New players in the control of chronic intestinal inflammation. *BMC Med.* **2011**, *9*, 122.
- Arsenescu, R.; Arsenescu, V.; Zhong, J.; Nasser, M.; Melinte, R.; Dingle, R.W.; Swanson, H.; De Villiers, W.J. Role of the xenobiotic receptor in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2011**, *17*, 1149–1162.
- Furumatsu, K.; Nishiumi, S.; Kawano, Y.; Ooi, M.; Yoshie, T.; Shiomi, Y.; Kutsumi, H.; Ashida, H.; Fujii-Kuriyama, Y.; Azuma, T.; et al. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis. *Dig. Dis. Sci.* **2011**, *56*, 2532–2544.
- Lamas, B.; Richard, M.L.; Sokol, H. [CARD9 is involved in the recovery of colitis by promoting the production of AhR ligands by the intestinal microbiota]. *Med. Sci.* **2016**, *32*, 933–936.

Supplementary Materials :

We checked for additional pro-inflammatory cytokines using the qRT-PCR approach. OA did not have any effect on the expression of IFN γ , IL8, IL-17, or IL-18 while PA increased the expression of IFN γ and IL-17 in LPS-stimulated macrophages (Fig. 1). For the protein level approach, the combination OA with PA reduced the expression of TNF α and IL-6 (Fig. 2).

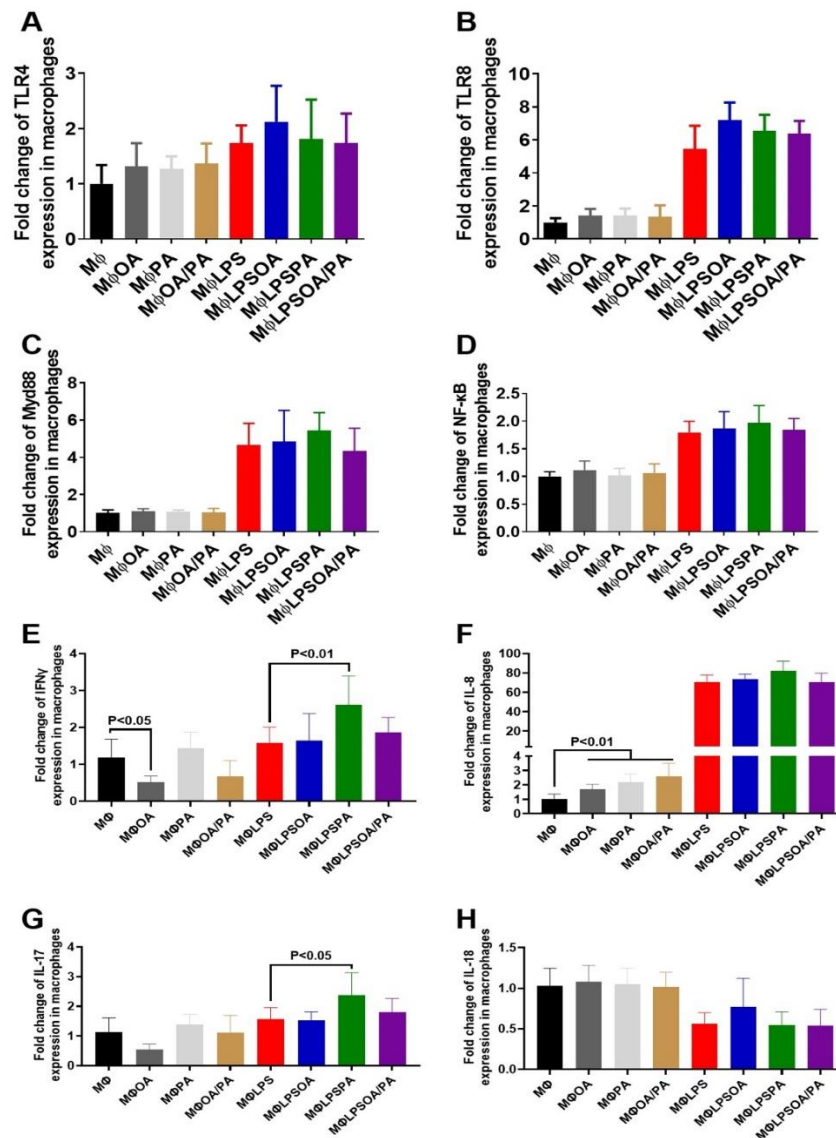


Figure S1. Expression of pro-inflammatory mediators and receptors in macrophages treated with fatty acids and challenged with LPS. (A-H) Relative expression levels of TLR4, TLR8, Myd88, NF- κ B, IFN γ , IL-8, IL-17 and IL-18 mRNA, respectively in macrophages. M Φ represents a control group (macrophages alone); M Φ OA, M Φ PA and M Φ OA/PA correspond to macrophages treated with oleic acid, palmitic acid or with these two fatty acids, respectively. M Φ LPS represents a positive control (macrophages exposed to lipopolysaccharide). M Φ LPSOA, M Φ LPSPA and M Φ LPSOA/PA correspond to macrophages challenged with LPS and treated with oleic acid, palmitic acid or with these two fatty acids, respectively. The results were obtained from three independent experiments.

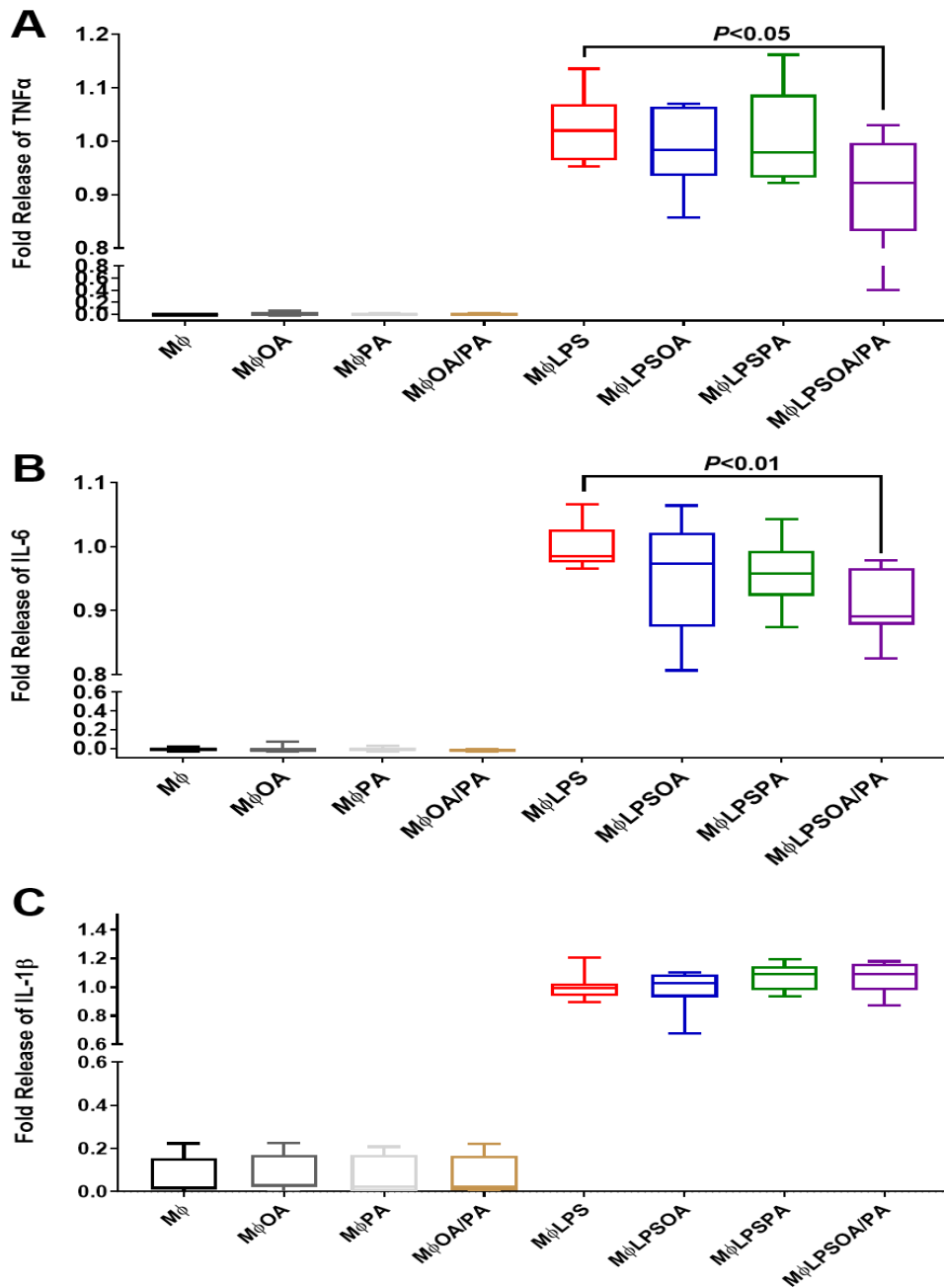


Figure S2. Protein levels of TNF α , IL-6 and IL-1 β in macrophages treated with fatty acids and exposed to LPS. (A) Fold release of TNF α in macrophages. (B) Fold release of IL-6 in macrophages. (C) Fold release of IL-1 β . M Φ represents a control group (macrophages alone); M Φ OA, M Φ PA and M Φ OA/PA correspond to macrophages treated with oleic acid, palmitic acid or with these two fatty acids, respectively. M Φ LPS represents a positive control (macrophages exposed to lipopolysaccharide). M Φ LPSOA, M Φ LPSPA and M Φ LPSOA/PA correspond to macrophages challenged with LPS and treated with oleic acid, palmitic acid or with these two fatty acids, respectively. The results were obtained from three independent experiments.

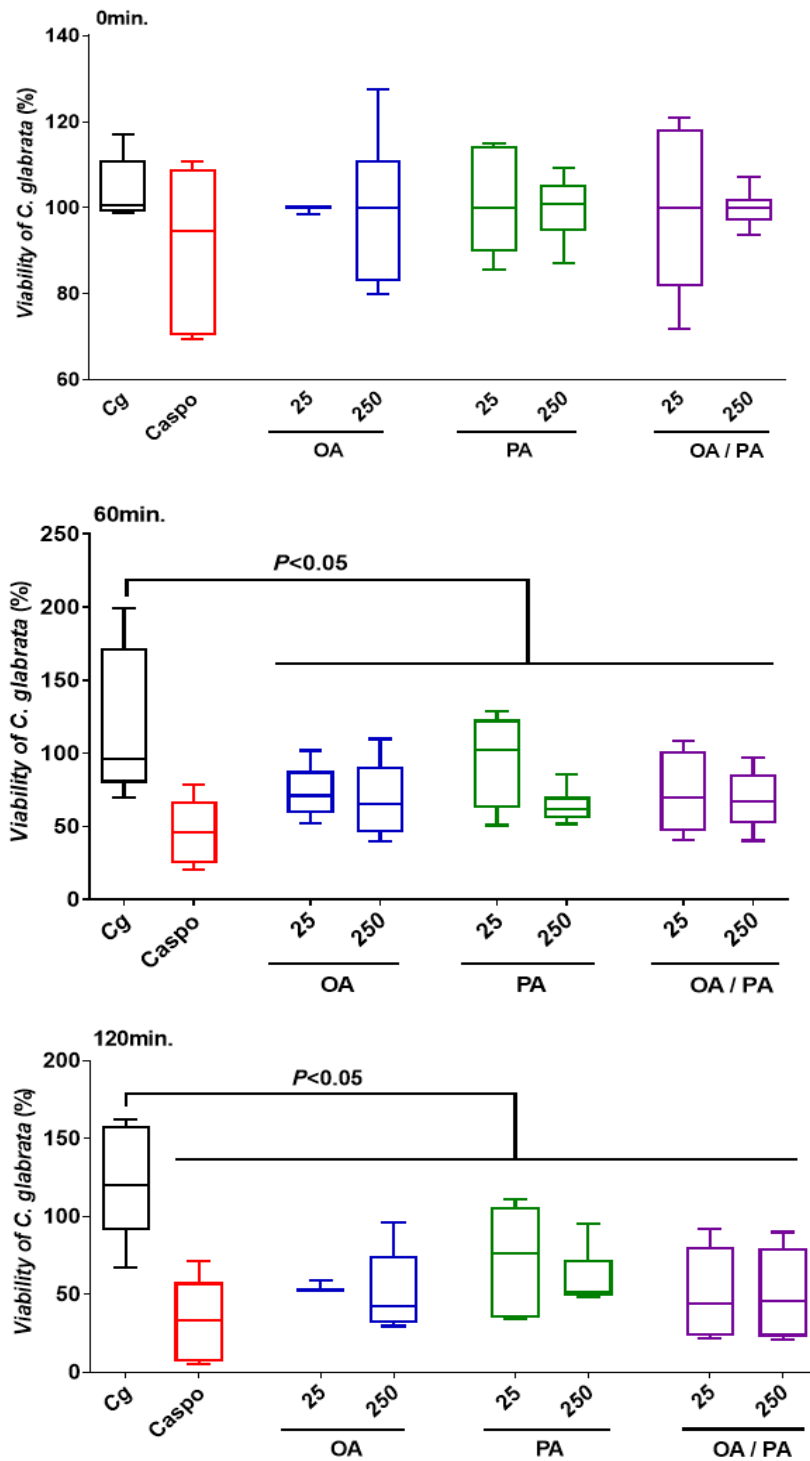


Figure S3. Effect of fatty acids on viability of *C. glabrata* by culture plate assay. *C. glabrata* challenged with OA, PA, OA/PA at a concentration of 25 and 250 μ g/mL after 0, 60 and 120 min. Cg represents a control. Caspo represents a standard control (*C. glabrata* challenged with caspofungin). OA, PA and OA/PA correspond to *C. glabrata* challenged with oleic acid, palmitic acid or these two FA, respectively. The results were obtained from two independent experiments.

Table S1. Quantitative real-time RT-PCR primer sequences for human genes used in the study.

Gene		Primer sequence (5'-3')
GAPDH	Forward	GAC-ACC-CAC-TCC-TCC-ACC-TTT
	Reverse	TTG-CTG-TAG-CCA-AAT-TCG-TTG-T
TLR2	Forward	GCC-AAA-GCT-TTG-ATT-GAT-TGG
	Reverse	TTG-AAG-TTC-AGC-TCC-TG
TLR4	Forward	CAG-GGC-TTT-TCT-GAG-TCG-TC
	Reverse	TGA-GCA-GTC-GTG-CTG-GTA-TC
TLR8	Forward	TCC-TTC-AGT-CGT-CAA-TGC-TG
	Reverse	CGT-TTG-GGG-AAC-TTC-CTG-TA
FFAR1	Forward	CCG-GCA-TTC-TAG-CTC-AGG-AG
	Reverse	CAC-TCT-GCC-CCT-TCC-GAA-TT
FFAR2	Forward	TGC-CTT-TTT-GAT-GTG-CTC-TG
	Reverse	TTG-CTT-TCC-CCT-GTA-TGA-GG
FFAR3	Forward	TCT-CAG-CAC-CCT-GAA-CTC-CT
	Reverse	TTC-TGC-TCC-TTC-AGC-TCC-AT
AMPKα	Forward	AAC-AAG-TTG-TGG-CTC-ACC-CA
	Reverse	AGA-ATC-AGG-TGG-GCT-TGT-CG
COX-2	Forward	TGA-AAC-CCA-CTC-CAA-ACA-CA
	Reverse	GAG-AAG-GCT-TCC-CAG-CTT-TT
NF-κB	Forward	AGT-GAA-CCG-AAA-CTC-TGG-CA
	Reverse	CCT-GGT-CCC-GTG-AAA-TAC-A
Myd88	Forward	GGA-ATG-TGA-CTT-CCA-GAC-CAA
	Reverse	GAT-GGG-GAT-CAG-TCG-CTT-C
AhR	Forward	GCA-CCG-ATG-GGA-AAT-GAT-ACT-ATC
	Reverse	GGT-GAC-CTC-CAG-CAA-ATG-AGT-T
TNFα	Forward	ATC-AAT-CGG-CCC-GAC-TAT-CTC
	Reverse	ACA-GGG-CAA-TGA-TCC-CAA-AGT
IFNγ	Forward	TCC-CAT-GGG-TTG-TGT-GTT-TA
	Reverse	AAG-CAC-CAG-GCA-TGA-AAT-CT
IL-1β	Forward	GAT-GCA-CCT-GTA-CGA-TCA-CT
	Reverse	GAC-ATG-GAG-AAC-ACC-ACT-TG
IL-6	Forward	AGT-GAG-GAA-CAA-GCC-AGA-GC
	Reverse	GTC-AGG-GGT-GGT-TAT-TGC-AT
IL-8	Forward	AAA-TCA-GGA-AGG-CTG-CCA-AGA
	Reverse	AAG-GAA-CCA-TCT-CAC-TGT-GTG-TAA-AC
IL-10	Forward	ACT-TTA-AGG-GTT-ACC-TGG-GTT-GC
	Reverse	TCA-CAT-GCG-CCT-TGA-TGT-CTG
IL-12	Forward	CCT-GAC-CAT-CCA-AGT-CAA-AGA-GT
	Reverse	AGG-AGC-GAA-TGG-CTT-AGA-ACC-T
IL-17	Forward	TCC-CAC-GAA-ATC-CAG-GAT-GC
	Reverse	GGA-TGT-TCA-GGT-TGA-CCA-TCA-C
IL-18	Forward	AGT-CAG-CAA-GGA-ATT-GTC-TCC
	Reverse	GAA-GCG-ATC-TGG-AAG-GTC-TG
CCL2	Forward	CCC-CAG-TCA-CCT-GCT-GTT-AT
	Reverse	TGG-AAT-CCT-GAA-CCC-ACT-TC
CCL5	Forward	CGC-TGT-CAT-CCT-CAT-TGC-TA
	Reverse	CCA-GAC-TTG-CTG-TCC-CTC-TC

Table S2. Mouse primers used for PCR analysis, related to experimental procedures.

Gene		Primer sequence (5'-3')
<i>Polr2a</i>	Forward	CCC-ACA-ACC-AGC-TAT-CCT-CAA
	Reverse	GGT-GCT-GTG-GGT-ACG-GAT-ACA
<i>TLR8</i>	Forward	GGC-ACA-ACT-CCC-TTG-TGA-TT
	Reverse	CAT-TTG-GGT-GCT-GTT-GTT-TG
<i>Dectin-1</i>	Forward	GGG-CTC-TCA-AGA-ACA-ATG-GA
	Reverse	AGC-ACA-CGA-TCC-TTT-CTC-TG
<i>Myd88</i>	Forward	ACT-GGC-CTG-AGC-AAC-TAG-GA
	Reverse	CGT-GCC-ACT-ACC-TGT-AGC-AA
<i>Ahr</i>	Forward	TGC-TGG-TGT-CTG-CCA-TTG-TC
	Reverse	ACA-GAT-CCA-GGA-CCA-CAT-CCT-T
<i>FOXP3</i>	Forward	CAA-CAT-GGA-CTA-CTT-CAA-GTA-CCA-CAA-TA
	Reverse	GAT-GGC-CCA-TCG-GAT-AAG-G
<i>TNFα</i>	Forward	CCA-CCA-CGC-TCT-TCT-GTC-TA
	Reverse	GAG-GCC-ATT-TGG-GAA-CTT-CT
<i>IL-1β</i>	Forward	CAG-CAA-CAG-CAA-GGC-GAA-A
	Reverse	CTG-GAC-CTG-TGG-GTT-GTT-GAC
<i>IFNγ</i>	Forward	CAG-CAA-CAG-CAA-GGC-GAA-A
	Reverse	CTG-GAC-CTG-TGG-GTT-GTT-GAC
<i>IL-6</i>	Forward	TAC-ACA-TGT-TCT-CTG-GGA-AAT-CGT
	Reverse	AAG-TGC-ATC-ATC-GTT-GTT-CAT-ACA
<i>IL-10</i>	Forward	CAG-TAC-AGC-CGG-GAA-GAC-AAT-AA
	Reverse	CCG-CAG-CTC-TAG-GAG-CAT-GT

3. Annexe 3 : Séquence des amorces humaines et murines

Tableau 1 : Séquence des amorces humaines ou murines utilisées au cours de cette étude.

Human Gene	Primer Sequence (5'-3')	
<i>GAPDH</i>	Forward	GAC-ACC-CAC-TCC-TCC-ACC-TTT
	Reverse	TTG-CTG-TAG-CCA-AAT-TCG-TTG-T
<i>TLR2</i>	Forward	GCC-AAA-GCT-TTG-ATT-GAT-TGG
	Reverse	TTG-AAG-TTC-AGC-TCC-TG
<i>TLR4</i>	Forward	CAG-GGC-TTT-TCT-GAG-TCG-TC
	Reverse	TGA-GCA-GTC-GTG-CTG-GTA-TC
<i>TLR8</i>	Forward	TCC-TTC-AGT-CGT-CAA-TGC-TG
	Reverse	CGT-TTG-GGG-AAC-TTC-CTG-TA
<i>PPARγ</i>	Forward	GAC-CAC-TCC-CAC-TCC-TTT-GA
	Reverse	GAT-GCA-GGC-TCC-ACT-TTG-AT
<i>FFAR1</i>	Forward	CCG-GCA-TTC-TAG-CTC-AGG-AG
	Reverse	CAC-TCT-GCC-CCT-TCC-GAA-TT
<i>FFAR2</i>	Forward	TGC-CTT-TTT-GAT-GTG-CTC-TG
	Reverse	TTG-CTT-TCC-CCT-GTA-TGA-GG
<i>FFAR3</i>	Forward	TCT-CAG-CAC-CCT-GAA-CTC-CT
	Reverse	TTC-TGC-TCC-TTC-AGC-TCC-AT
<i>AMPKα</i>	Forward	AAC-AAG-TTG-TGG-CTC-ACC-CA
	Reverse	AGA-ATC-AGG-TGG-GCT-TGT-CG
<i>COX-2</i>	Forward	TGA-AAC-CCA-CTC-CAA-ACA-CA
	Reverse	GAG-AAG-GCT-TCC-CAG-CTT-TT
<i>NF-κB</i>	Forward	AGT-GAA-CCG-AAA-CTC-TGG-CA
	Reverse	CCT-GGT-CCC-GTG-AAA-TAC-A
<i>Myd88</i>	Forward	GGA-ATG-TGA-CTT-CCA-GAC-CAA
	Reverse	GAT-GGG-GAT-CAG-TCG-CTT-C
<i>AhR</i>	Forward	GCA-CCG-ATG-GGA-AAT-GAT-ACT-ATC
	Reverse	GGT-GAC-CTC-CAG-CAA-ATG-AGT-T
<i>TNFα</i>	Forward	ATC-AAT-CGG-CCC-GAC-TAT-CTC
	Reverse	ACA-GGG-CAA-TGA-TCC-CAA-AGT
<i>IFNγ</i>	Forward	TCC-CAT-GGG-TTG-TGT-GTT-TA
	Reverse	AAG-CAC-CAG-GCA-TGA-AAT-CT
<i>IL-1β</i>	Forward	GAT-GCA-CCT-GTA-CGA-TCA-CT
	Reverse	GAC-ATG-GAG-AAC-ACC-ACT-TG
<i>IL-6</i>	Forward	AGT-GAG-GAA-CAA-GCC-AGA-GC
	Reverse	GTC-AGG-GGT-GGT-TAT-TGC-AT
<i>IL-8</i>	Forward	AAA-TCA-GGA-AGG-CTG-CCA-AGA
	Reverse	AAG-GAA-CCA-TCT-CAC-TGT-GTG-TAA-AC
<i>IL-10</i>	Forward	ACT-TTA-AGG-GTT-ACC-TGG-GTT-GC
	Reverse	TCA-CAT-GCG-CCT-TGA-TGT-CTG
<i>IL-12</i>	Forward	CCT-GAC-CAT-CCA-AGT-CAA-AGA-GT
	Reverse	AGG-AGC-GAA-TGG-CTT-AGA-ACC-T
<i>IL-17</i>	Forward	TCC-CAC-GAA-ATC-CAG-GAT-GC
	Reverse	GGA-TGT-TCA-GGT-TGA-CCA-TCA-C
<i>IL-18</i>	Forward	AGT-CAG-CAA-GGA-ATT-GTC-TCC
	Reverse	GAA-GCG-ATC-TGG-AAG-GTC-TG
<i>CCL2</i>	Forward	CCC-CAG-TCA-CCT-GCT-GTT-AT
	Reverse	TGG-AAT-CCT-GAA-CCC-ACT-TC
<i>CCL5</i>	Forward	CGC-TGT-CAT-CCT-CAT-TGC-TA
	Reverse	CCA-GAC-TTG-CTG-TCC-CTC-TC

Tableau 1 (suite) : Séquence des amorces humaines ou murines utilisées au cours de cette étude.

Mouse Gene	Primer sequence (5'-3')	
<i>Polr2a</i>	Forward	CCC-ACA-ACC-AGC-TAT-CCT-CAA
	Reverse	GGT-GCT-GTG-GGT-ACG-GAT-ACA
<i>TLR2</i>	Forward	TGC-TTT-CCT-GCT-GGA-GAT-TT
	Reverse	TGT-AAC-GCA-ACA-GCT-TCA-GG
<i>TLR4</i>	Forward	GGC-AGC-AGG-TGG-AAT-TGT-AT
	Reverse	AGG-CCC-CAG-AGT-TTT-GTT-CT
<i>TLR8</i>	Forward	GGC-ACA-ACT-CCC-TTG-TGA-TT
	Reverse	CAT-TTG-GGT-GCT-GTT-GTT-TG
<i>TLR9</i>	Forward	GCT-TTG-GCC-TTT-CAC-TCT-TG
	Reverse	AAC-TGC-GCT-CTG-TGC-CTT-AT
<i>PPARγ</i>	Forward	CTG-TGA-GAC-CAA-CAG-CCT-GA
	Reverse	AAT-GCG-AGT-GGT-CTT-CCA-TC
<i>Dectin-1</i>	Forward	GGG-CTC-TCA-AGA-ACA-ATG-GA
	Reverse	AGC-ACA-CGA-TCC-TTT-CTC-TG
<i>NF-κB</i>	Forward	GCA-GGC-TAT-TGC-TCA-TCA-CA
	Reverse	CTG-ACC-TGA-GCC-TTC-TGG-AC
<i>Myd88</i>	Forward	ACT-GGC-CTG-AGC-AAC-TAG-GA
	Reverse	CGT-GCC-ACT-ACC-TGT-AGC-AA
<i>Chitinase like-3 protein</i>	Forward	ACT-TTG-ATG-GCC-TCA-ACC-TG
	Reverse	AAT-GAT-TCC-TGC-TCC-TGT-GG
<i>FOXP3</i>	Forward	CAA-CAT-GGA-CTA-CTT-CAA-GTA-CCA-CAA-TA
	Reverse	GAT-GGC-CCA-TCG-GAT-AAG-G
<i>AhR</i>	Forward	TGC-TGG-TGT-CTG-CCA-TTG-TC
	Reverse	ACA-GAT-CCA-GGA-CCA-CAT-CCT-T
<i>TNFα</i>	Forward	CCA-CCA-CGC-TCT-TCT-GTC-TA
	Reverse	GAG-GCC-ATT-TGG-GAA-CTT-CT
<i>IL-1β</i>	Forward	CAG-CAA-CAG-CAA-GGC-GAA-A
	Reverse	CTG-GAC-CTG-TGG-GTT-GTT-GAC
<i>IFNγ</i>	Forward	CAG-CAA-CAG-CAA-GGC-GAA-A
	Reverse	CTG-GAC-CTG-TGG-GTT-GTT-GAC
<i>IL-6</i>	Forward	TAC-ACA-TGT-TCT-CTG-GGA-AAT-CGT
	Reverse	AAG-TGC-ATC-ATC-GTT-GTT-CAT-ACA
<i>IL-10</i>	Forward	CAG-TAC-AGC-CGG-GAA-GAC-AAT-AA
	Reverse	CCG-CAG-CTC-TAG-GAG-CAT-GT