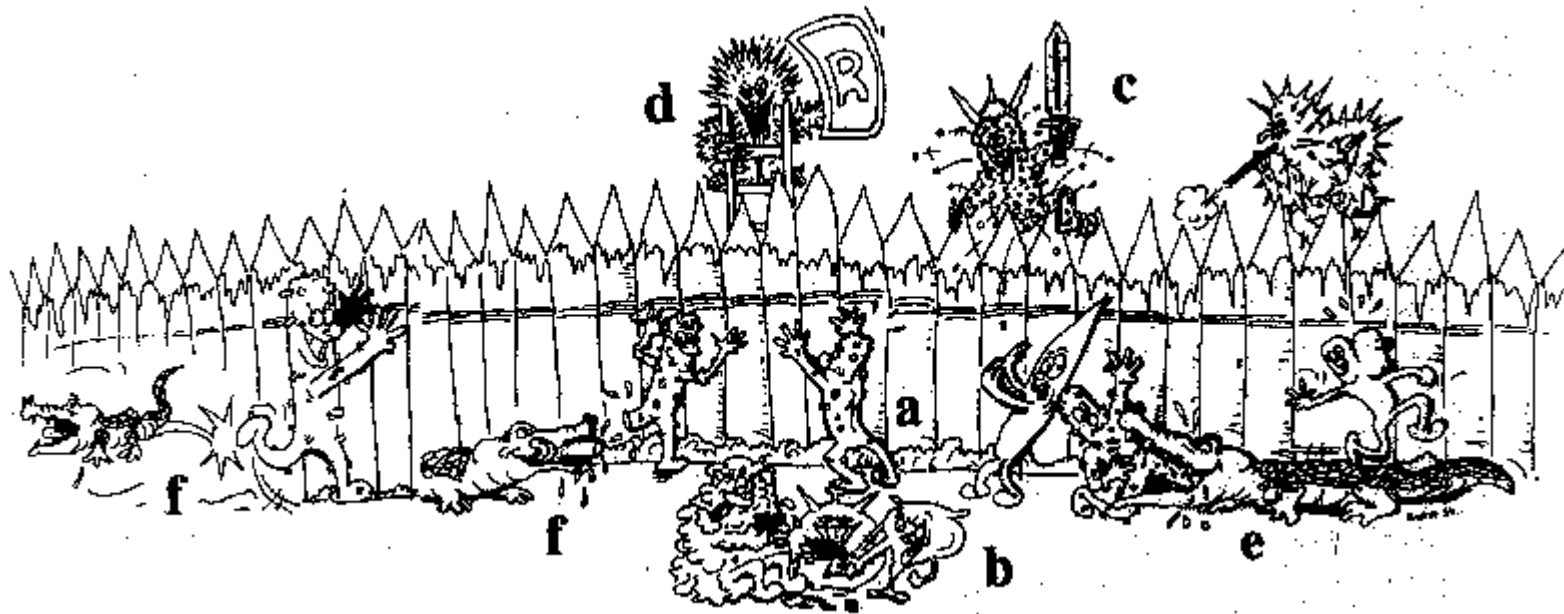


# Leçon No2

Philippe Sansonetti

Passage de la barrière intestinale par les bactéries (1)

De la physiologie à la pathologie



# Passage de la barrière intestinale par les bactéries et / ou les produits bactériens

## 2 situations principales:

Translocation bactérienne ou de produits bactériens

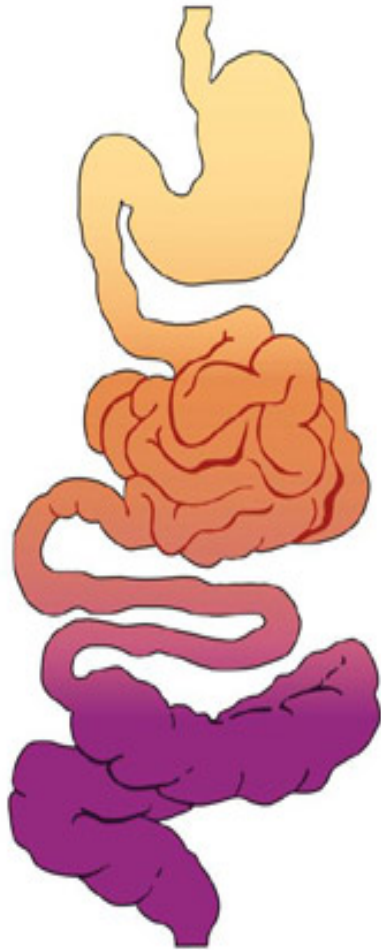
- Physiologique
- Pathologique

Invasion bactérienne de l'épithélium/muqueuse de l'intestin avec ou sans dissémination systémique

« Translocateurs professionnels »: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes*...

# Man is a primate-microbes hybrid

## Concept of HOLOGENOME / SUPERORGANISM



Stomach:  $10^3$ - $10^8$  bact./ml,  
*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, Entérobactéries,  
*Helicobacter*, levures

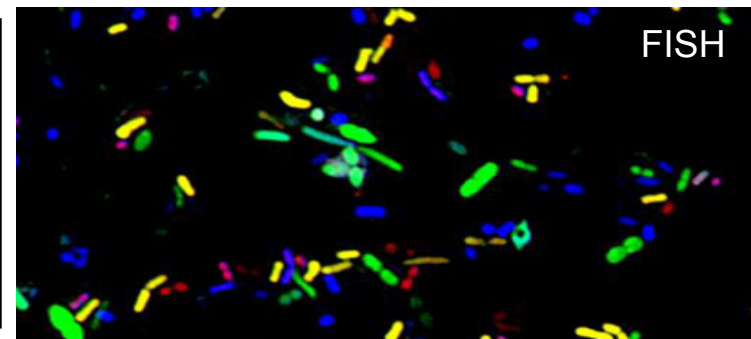
Duodenum et jejunum:  $10^2$ - $10^5$  bact./ml,  
*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, Entérobactéries,  
*Staphylococcus*, levures

Ileum et caecum:  $10^3$ - $10^9$  bact./ml,  
*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, Entérobactéries,  
*Staphylococcus*, *Clostridium*

Colon (500-1000 species, possibly more ?):  $10^{10}$ - $10^{12}$  bact./g,  
*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*,  
*Fusobacterium*, *Lactobacillus*, Entérobactéries, *Staphylococcus*, levures

Resident bacteria outnumber human somatic and germinal cells tenfold and represent a combined microbial genome well in excess (x150) of the human genome (Qin J, et al., Nature, 2010)).

The intestinal flora has a collective metabolic activity equal to a virtual extra « organ » (Bocci, 1992).



La connaissance de l'organisation structurale de la barrière épithéliale intestinale et des mécanismes en assurant la perméabilité / imperméabilité est essentielle à la compréhension de BT (Madara JL. 1990. Am. J. Pathol., 137:1273-1281)

Couche de mucus

Apex / bordure en brosse

Jonctions / cellules épithéliales

Tissu conjonctif sous-épithélial

Endothélium capillaire

Cellules immunitaires de la *lamina propria*



Marian Neutra



Jean-Pierre Kraehenbuhl



Daniel Louvard

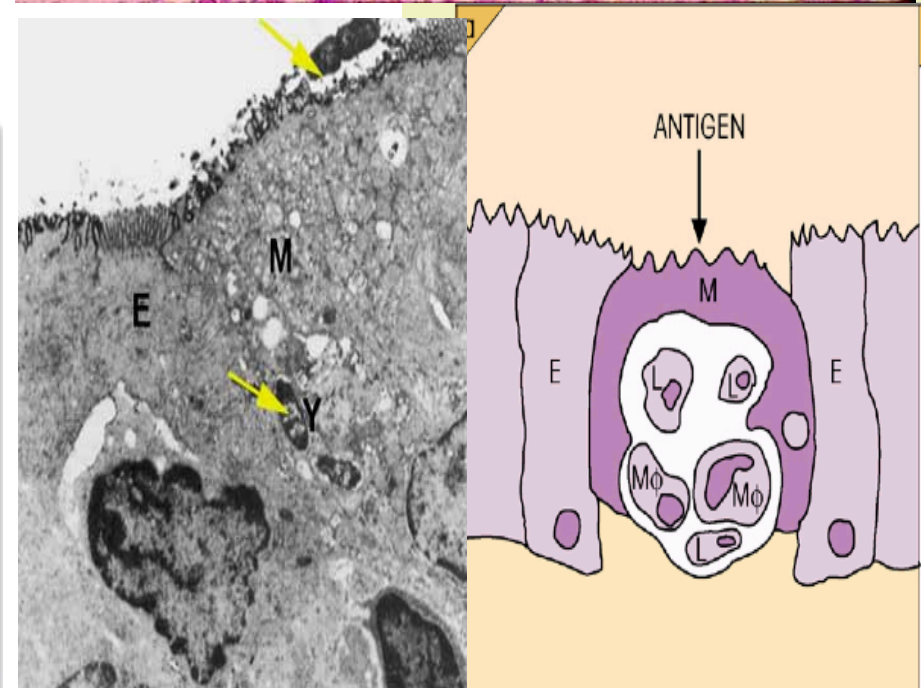
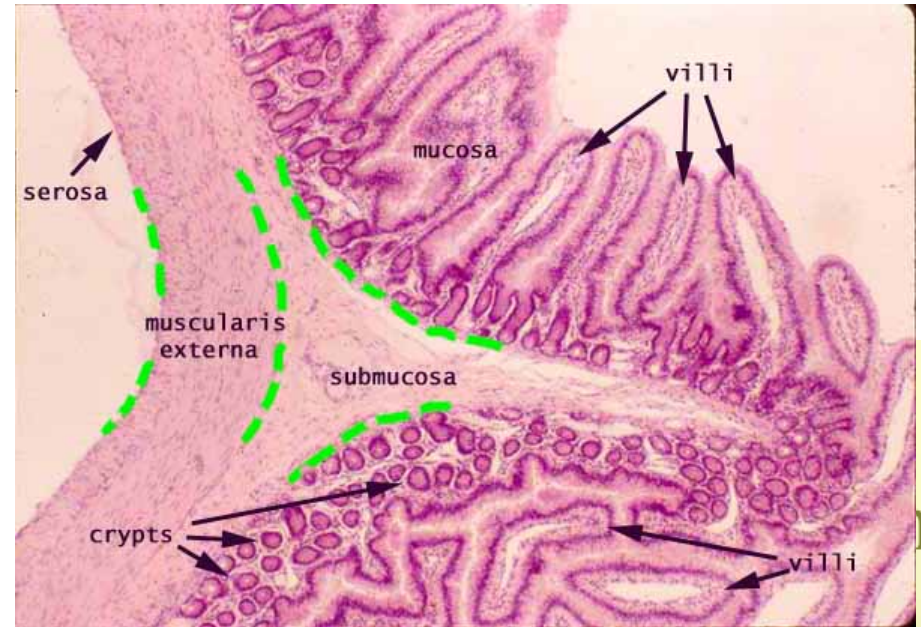
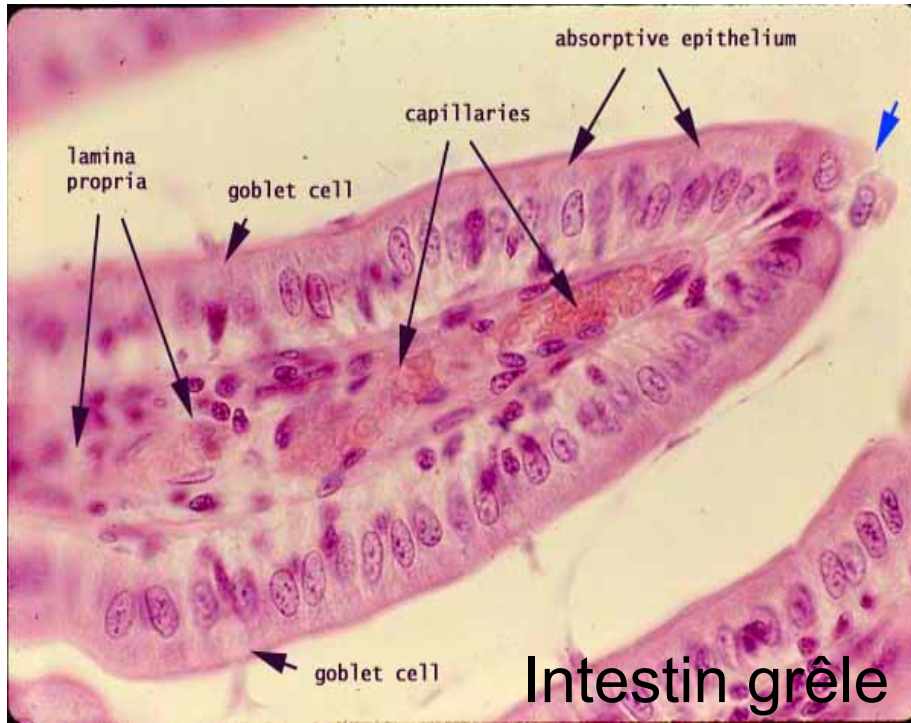


Jim Madara

La cohésion épithéliale assurée par les jonctions cellulaires (TJ) établit le principe de perméabilité paracellulaire sélective. **En théorie:**

Exclusion quasi absolue du mouvement passif de grandes particules hydrophiles, non chargées comme les bactéries et des macromolécules issues des bactéries (LPS, peptidoglycane)

Restriction limitée / partielle de la diffusion des micromolécules.



terminal a

- induct
- follicu
- epithe
- cells –
- entero
- micro
- By en
- particl
- the op

## Mécanismes protecteurs de l'épithélium intestinal

**Flore intestinale:** elle assure elle-même un puissant effet de barrière par compétition avec les bactéries allogènes / pathogènes, en induisant la maturation de l'épithélium et du système immunitaire muqueux (voir cours 2009-2010).

**Mucines:** sécrétées en grande quantité par les cellules caliciformes (3l/j), elles forment une couche « épaisse » (400-500 nm) de glycoprotéines chargées négativement, certaines ancrées dans la membrane, prévenant entre autre le contact direct des bactéries avec l'apex des cellules épithéliales (Aranow JS & Fink MP.1996. B.J.Anaest., 77:71-81).

**Molécules antimicrobiennes:** NO, ROS et un large spectre de molécules antimicrobiennes est enchassé dans la couche de mucus, particulièrement les peptides antimicrobiens (défensines et cathélicidine), des lectines (Reg $\gamma$ ), des lipases et phospholipases (**barrière chimique**).

**IgA:** les sécrétions muqueuses sont riches en immunoglobulines A (sIgA = 70 % des Ig totales !) capables de fixer et agréger les bactéries donc de bloquer leur adhésion et de neutraliser toxines et produits bactériens toxiques (Spaeth G et coll. 1994. Ann. Surg., 220:798-808). Les IgA représentent plus de 70 % de la production des immunoglobulines totales (**barrière immunologique** = « exclusion immune »).

**Bile:** inhibe la croissance bactérienne et a un effet trophique sur la muqueuse intestinale (Levi AC et coll. 1991. Ital. J. Gastroenterol., 23:202-207).

Diminue l'internalisation/translocation des bactéries entériques (Wells CA et al. 1995. Crit. Care Med., 23:301-307). Exerce une action détergente avec un effet anti-adhérence et de liaison-neutralisation de l'endotoxine (Van Bossuyt H et al. 1990. J. Hepatol., 10:274-279). L'absence de bile facilite BT (Slocum MM et al. 1992. Am. Surg., 58:305-310)

**Structure de l'épithélium:** jonctions serrées (TJ = **barrière physique**)

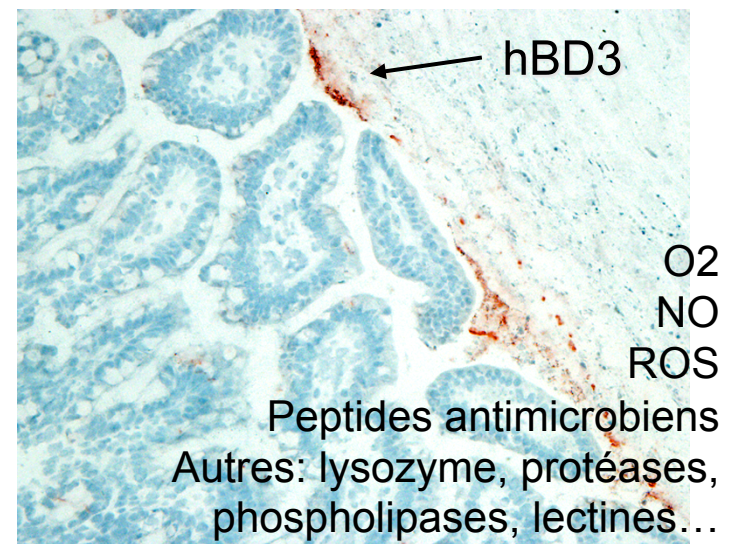
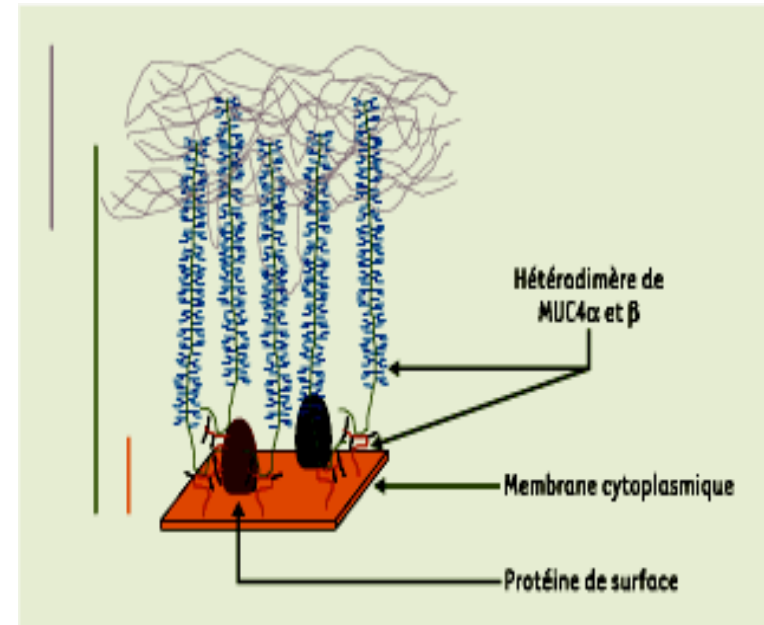
# Cellules caliciformes et couche de mucus

La muqueuse intestinale est protégée par une couche épaisse et imperméable de mucus qui augmente en épaisseur de l'estomac au colon (Atuma C et coll. 2001. Am.J.Physiol.Gastroenterol.Liver Physiol.,280:G222-229).

La mucine sécrétée dominante, MUC2, est stockée dans et sécrétée par les cellules caliciformes très nombreuses dans les cryptes coliques.

Trois fonctions principales peuvent être définies:

- Couche protectrice protéases-résistante assurant une protection physique de la surface de l'épithélium (Corazziari ES. 2009. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.,48:Suppl.2:S54-55)
- Capture des bactéries par mimiquerie des récepteurs membranaires, élimination par péristaltisme (Sajan SU & Forstner JF. 1990. Infect.Immun.,58:868-873; Smith CJ et coll. 1995. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.,21:269-276)
- Matrice maintenant et concentrant les molécules antimicrobiennes produites par l'épithélium (peptides antimicrobiens), les molécules cytoprotectives (TFF) et les sIgA (Taupin D & Podolsky DK. 2003. Nat.Rev.Cell Biol.Dev.,4:721-732)



Sperandio B et Sansonetti PJ

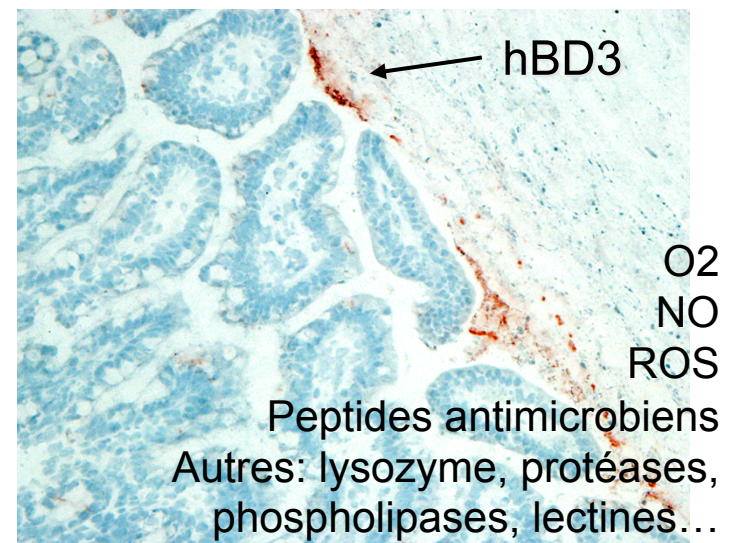
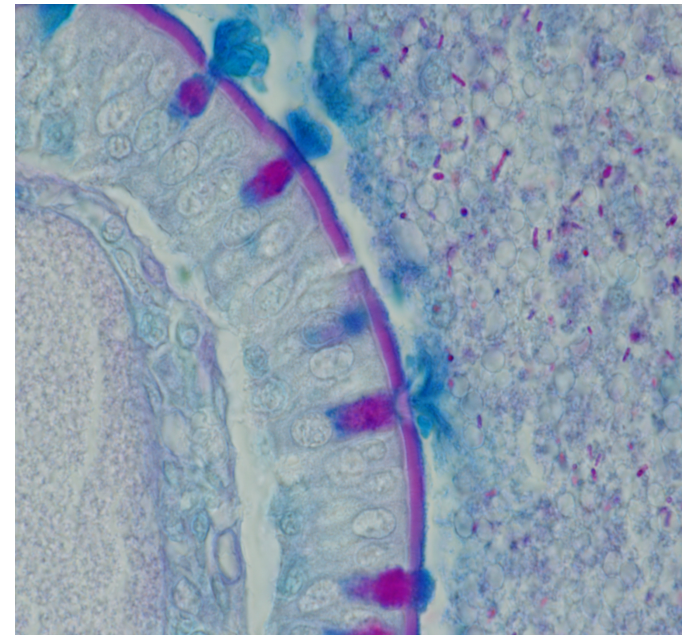
## Cellules caliciformes et couche de mucus

La muqueuse intestinale est protégée par une couche épaisse et imperméable de mucus qui augmente en épaisseur de l'estomac au colon (Atuma C et coll. 2001. Am.J.Physiol.Gastroenterol.Liver Physiol.,280:G222-229).

La mucine sécrétée dominante, MUC2, est stockée dans et sécrétée par les cellules caliciformes très nombreuses dans les cryptes coliques.

Trois fonctions principales peuvent être définies:

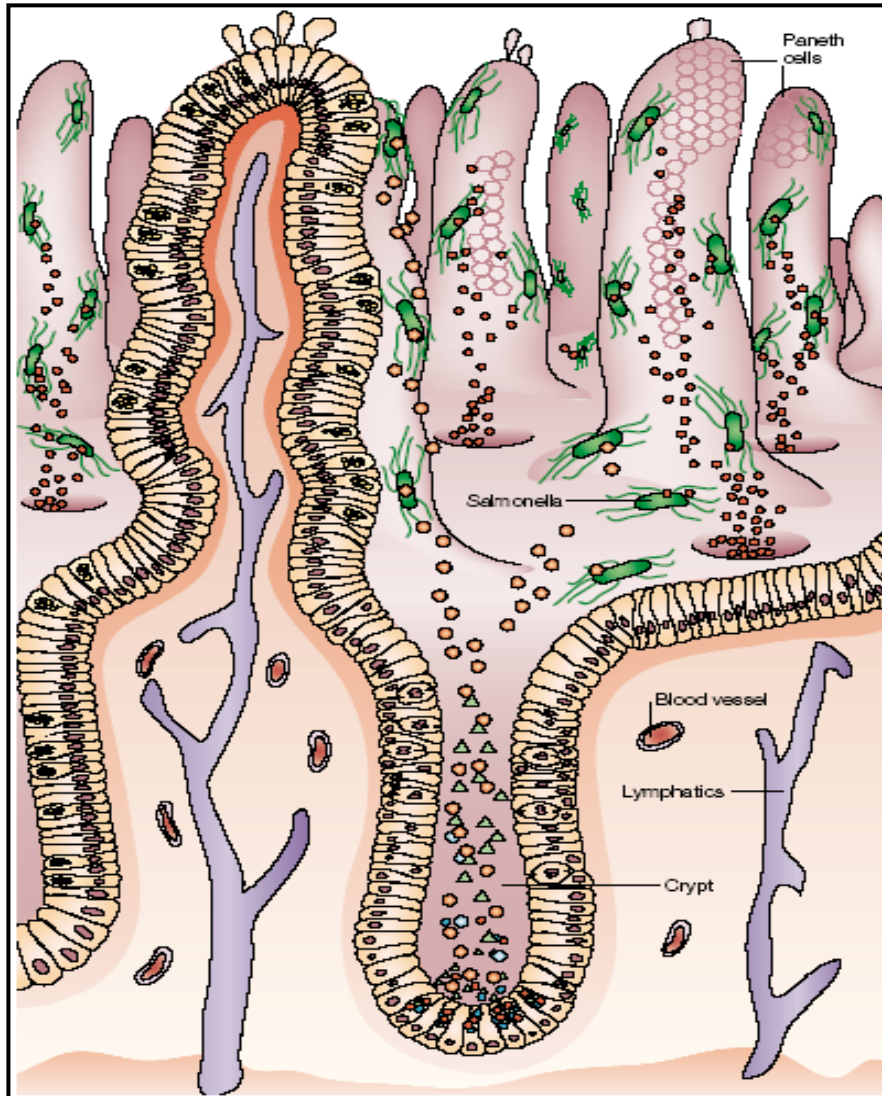
- Couche protectrice protéases-résistante assurant une protection physique de la surface de l'épithélium (Corazziari ES. 2009. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.,48:Suppl.2:S54-55)
- Capture des bactéries par mimiquerie des récepteurs membranaires, élimination par péristaltisme (Sajan SU & Forstner JF. 1990. Infect.Immun.,58:868-873; Smith CJ et coll. 1995. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.,21:269-276)
- Matrice maintenant et concentrant les molécules antimicrobiennes produites par l'épithélium (peptides antimicrobiens), les molécules cytoprotectives (TFF) et les slgA (Taupin D & Podolsky DK. 2003. Nat.Rev.Cell Biol.Dev.,4:721-732)



Sperandio B et Sansonetti PJ

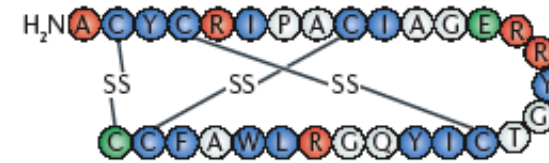


# Antimicrobial peptides



## Crypts

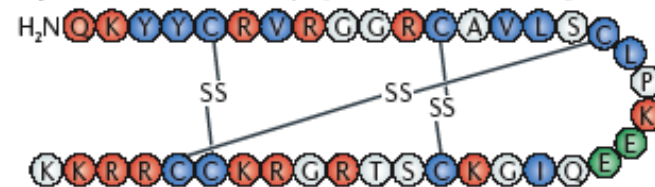
- ◆  $\alpha$ -defensin 5 (Paneth cells)
- ◆  $\alpha$ -defensin 6 (Paneth cells)



$\alpha$ -defensin 1

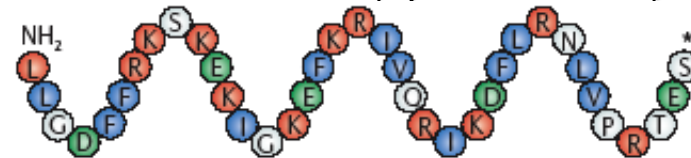
## Villi

- ◆  $\beta$ -defensin 1 (epithelial cells)
- ◆  $\beta$ -defensin 2 (epithelial cells)
- ◆  $\beta$ -defensin 3 (epithelial cells)



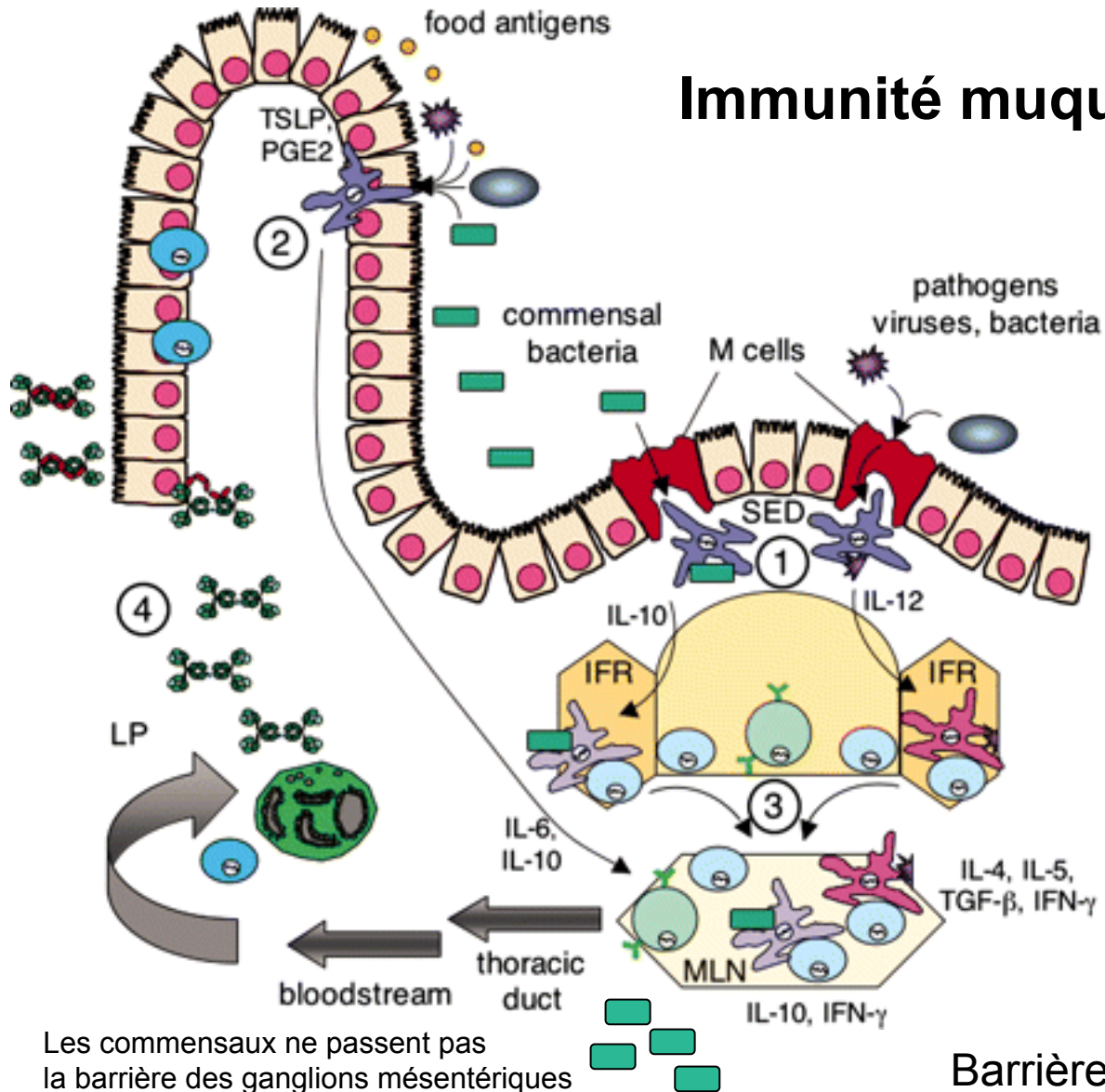
$\beta$ -defensin 3

- ◆ cathelicidin LL-37 (epithelial cells)



LL-37

# Immunité muqueuse et sIgA

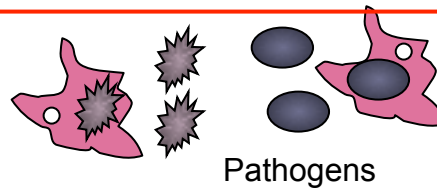


La reconnaissance des microorganismes commensaux demeure un processus strictement localisé à la muqueuse.

**Notion de barrière des ganglions mésentériques**

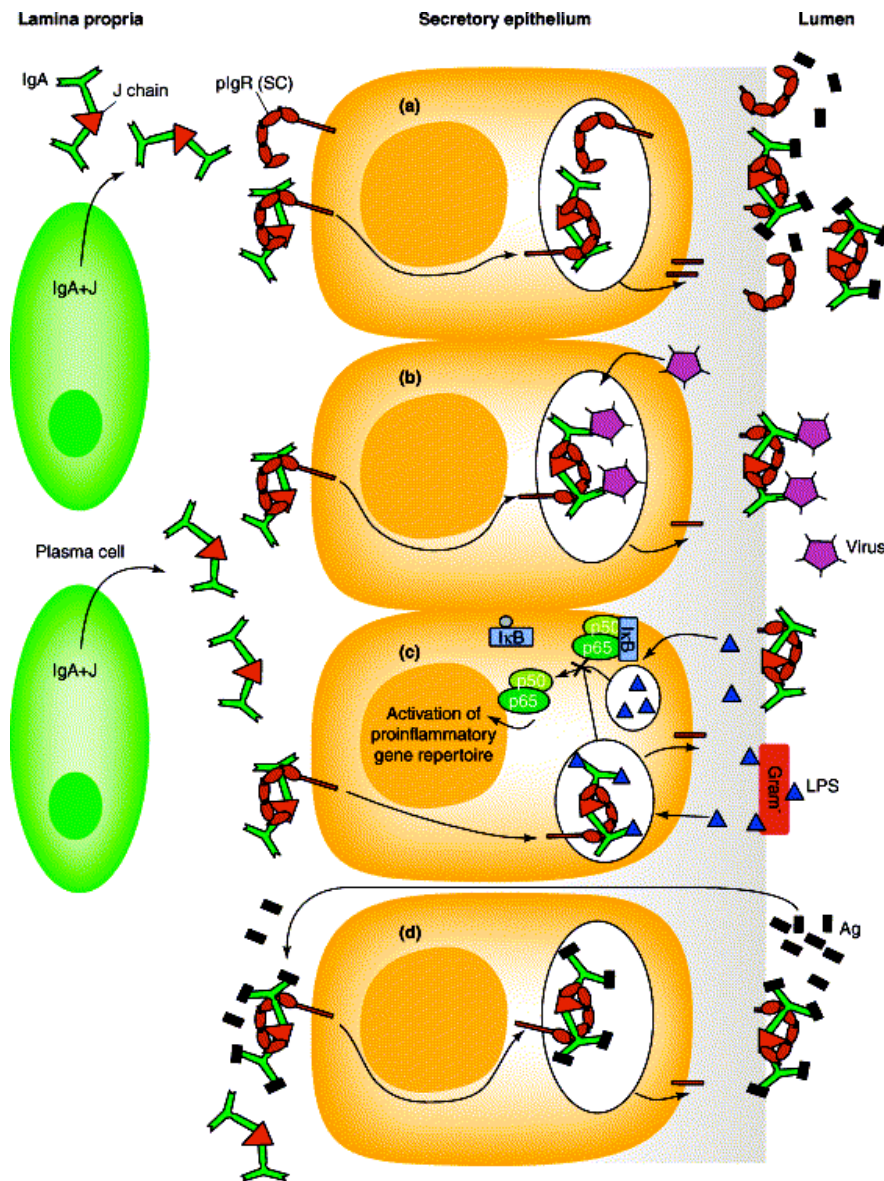
Les commensaux ne passent pas la barrière des ganglions mésentériques

**Barrière des ganglions mésentériques**



Dissémination systémique, Stimulation de l'immunité systémique

# Fonctions principales des IgA sécrétoires



Anticorps bloquant assurant l'exclusion immune

Corthésy B.2009.

Immunopharmacol.Immunotoxicol.,31:174-179

Phalipon A et coll. 2002. Immunity,17:107-115

Neutralisation intracellulaire des virus

Huang YT.2005. J.Immunol.,174:4828-4835

Neutralisation intracellulaire des PAMPs (LPS)

Effet anti-inflammatoire

Fernandez MI et coll. 2003. Immunity,18:739-749

Clairance des antigènes qui ont accidentellement franchi la barrière épithéliale

Suzuki K & Fagarasan S. 2008.

Trends Immunol.,29:523-531

# Contrôle du microbiote commensal par les IgA sécrétoires

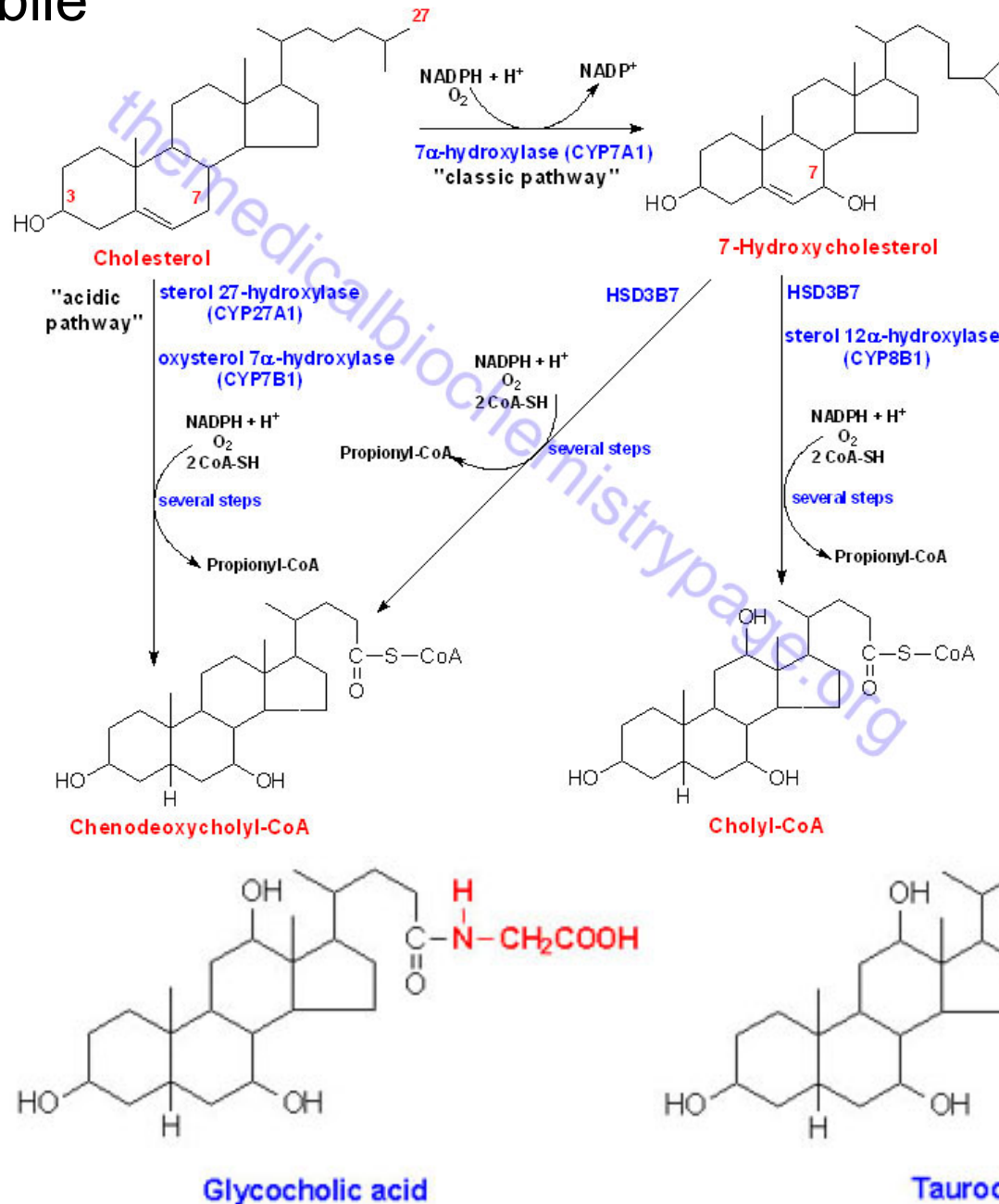
Malgré l'énorme quantité d'IgA produites et sécrétées chaque jour (5-15 grammes, au moins 60 % de l'ensemble des immunoglobulines de tous isotypes produites !) au niveau de la muqueuse intestinale, relativement peu d'études ont analysé leur fonction dans le contrôle de l'homéostasie du microbiote.

Les souris déficientes en poly-Ig récepteur (PIgR) qui assurent la transcytose épithéliale des IgA et IgM présentent une entéropathie exsudative du fait d'une perte de la barrière paracellulaire (Johansen FE et coll. 1999. J.Exp.Med.,190:915-922)

En l'absence d'IgA la densité luminale de la flore bactérienne augmente de façon incontrôlée (Fagarasan S. 2002. Science,298:1424-1427). Observation faite chez les souris AID<sup>-/-</sup> (activation-induced cytidine deaminase <sup>-/-</sup>) qui sont déficientes en IgA et IgM à affinité maturée présentent une croissance incontrôlée de leur flore anaérobie.

(AID est l'enzyme clé régulateur de la diversification des anticorps secondaires assurant la commutation isotypique = pas d'IgA et la maturation de l'affinité des anticorps par mutations somatiques = pas de maturation de l'affinité des IgM)

# La bile



The most abundant bile acids in human bile are **chenodeoxycholic acid** (45%) and **cholic acid** (31%). These are referred to as the **primary bile acids**. Before the primary bile acids are secreted into the canalicular lumen they are conjugated via an amide bond at the terminal carboxyl group with either of the amino acids glycine or taurine. These conjugation reactions yield **glycoconjugates** and **tauroconjugates**, respectively. This conjugation process increases the amphipathic nature of the bile acids making them more easily secretable as well as less cytotoxic. The conjugated bile acids are the major solutes in human bile.

[Br Med J.](#) 1972 Sep 30;3(5830):813-5

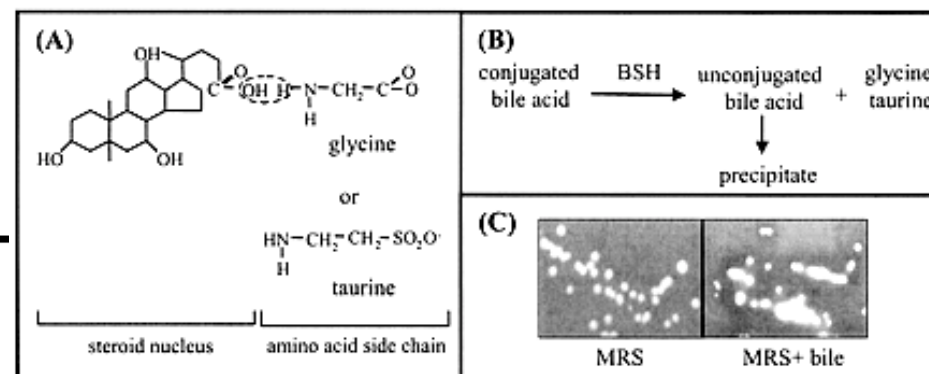
## Bile acids: a pH dependent antibacterial system in the gut?

[Percy-Robb IW](#), [Collee JG](#).

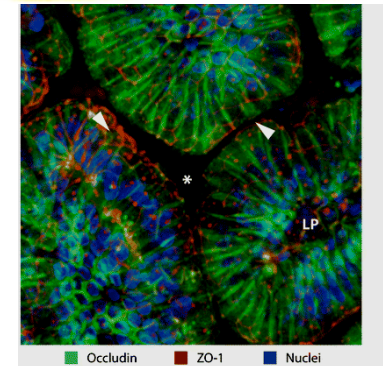
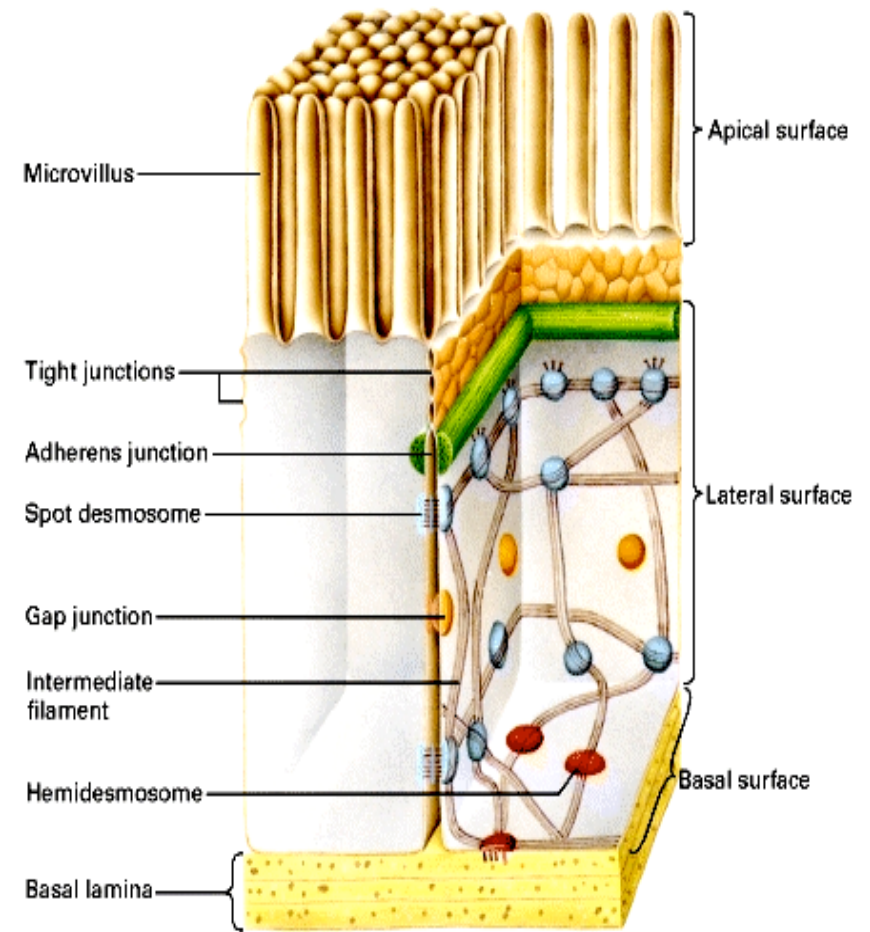
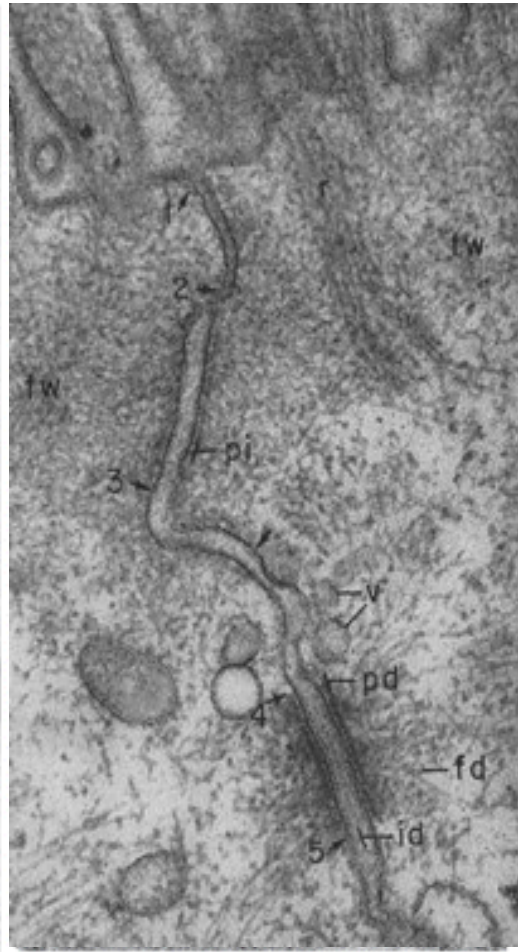
**Abstract** Bile acids are secreted in the bile in the form of conjugates and many species of intestinal bacteria can rapidly deconjugate them. Studies have shown that an unconjugated bile acid may have bactericidal and bacteriostatic effects, which are pH dependent. It is proposed that unconjugated bile acids may be involved in a homeostatic mechanism, preventing bacterial growth in the small intestine.

Genera and species of Intestinal bacteria	Bile salt hydrolase activity
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Kawamoto <i>et al.</i> , 1989
<i>Bacteroides fragilis</i>	Stelwag and Hylemon, 1976
<i>Bacteroides</i> sp.	
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Grill <i>et al.</i> , 1995
<i>Clostridium perfringens</i>	Gopal-Srivastava and Hylemon, 1988
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Eubacterium</i> sp.	
<i>Lactobacillus</i> sp.	Lundeen and Savage, 1990
	Christiaens <i>et al.</i> , 1992
<i>Streptococcus</i> sp.	

[Mol Microbiol.](#) 2002 Aug;45(4):1095-106. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. [Dussurget O](#), [Cabanes D](#), [Dehoux P](#), [Lecuit M](#), [Buchrieser C](#), [Glaser P](#), [Cossart P](#); [European Listeria Genome Consortium](#).



Reaction catalyzed by BSH enzymes. BSHs cleave the peptide linkage of bile acids, which results in removal of the amino acid group from the steroid core. The resulting unconjugated bile acids precipitate at low pH.



■ Occludin    ■ ZO-1    ■ Nuclei  
 Marchiando AM, et al. 2010.  
 Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 5:119-44

## Structures jonctionnelles intercellulaires

## **Est-ce que la translocation bactérienne (BT) est un concept valide ? (Balzan S et coll. 2007. J. Gastroenterol. Hepatol., 22:464-471)**

**BT** = migration de bactéries du microbiote intestinal à travers la muqueuse vers des tissus normalement stériles, particulièrement les ganglions mésentériques (MLN) et possiblement après dissémination systémique vers d'autres organes/sites.

Les bactéries vivantes ne sont pas obligatoirement concernées, il peut s'agir de la translocation de composants bactériens pro-inflammatoires (PAMP), en particulier du LPS (Berg RD & Garlington RW. 1979. 23:403-411).

### **Concept de perméabilité intestinale.**

- Des bactéries viables sont retrouvées dans la cavité péritonéale de chiens soumis à un choc hémorragique. Les bactéries retrouvées sont similaires à celles identifiées dans le microbiote intestinal normal de ces animaux (Schweinburg FB et al. 1949. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71:150-153, Lillehei RC et coll. 1957. Surg. Forum, 7:6-11)

- Des bactéries à Gram négatif et positif, des champignons et de l'endotoxine traversent la barrière intestinale chez des patients atteints de choc avec un dysfonctionnement multi-organes (Lemaire LCJM et coll. 1997. Br. J. Surg., 84:1340-1350).

**La translocation bactérienne est elle aussi un phénomène physiologique ?**



## **Est-ce que tous les symbiotes sont égaux en regard de BT ?**

*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, autres entérobactéries, *Enterococci*, autres *Streptococci*  
Sont les bactéries les plus aptes à transloquer de la lumière intestinale vers les MLN  
(Steffen EK et coll. 1988. J. Infect. Dis., 157:1032-1038)

Malgré leur énorme prédominance (100-1000:1 en comparaison des espèces aéro-anaérobies),  
les espèces anaérobies ne transloquent qu'en cas de lésions muqueuses importantes ou de  
déficits immunitaires majeurs (neutropénie, lymphopénie thérapeutiques, infectieuses (SIDA).  
(Lee PI et al. 2009. J. Infect. Dis., 199:1664-1670)

Survient expérimentalement:

Chez les souris thymectomisées (Owens WE et al. 1960. Infect. Immun., 27:461-467),

Chez les souris irradiées à dose létale (Brook I et al. 1984. Infect. Immun., 46:270-271),

Chez les rongeurs suite à une brûlure étendue (Wells CL. 1990. Antonie Van Leeuwenhoek,  
58:87-93)

Les espèces anaérobies exercent un « effet de barrière » limitant la croissance et la colonisation  
par des espèces susceptibles de translocation efficace.

L'élimination sélective des espèces anaérobies facilite la surcroissance, la colonisation et la  
translocation des espèces aéro-anaérobies (Wells CL et coll. 1987. Infect. Immun., 55:2689-2694)

### **La surcroissance bactérienne est la cause principale de BT.**

Chez la souris, une corrélation directe existe entre l'importance numérique des espèces présentes  
dans la lumière intestinale et les nombres de bactéries vivantes appartenant à ces espèces  
présentes dans les MLN (Steffen EK et al. 1983. Infect. Immun. 39:1252-1259), particulièrement  
s'il s'agit de bactéries adhérentes (Boedeker EC. 1994. Infect. Immun., 106:255-257). Idem chez  
l'homme.

## Site anatomique de BT

On considère généralement que **le caecum et le colon** sont le site majeur de translocation bactérienne car la densité bactérienne y est maximum, particulièrement Entérobactéries et Entérocoques.

Cependant l'épithélium colique est très bien défendu contre les bactéries:  
Couche de mucus très épaisse (presque 1mm !).  
Forte résistance électrique traduisant des jonctions serrées...très serrées.

L'inoculation de concentrations équivalentes d'*E. coli* dans l'intestin grêle et dans le colon a montré que **les bactéries transloquaient préférentiellement dans l'intestin grêle** (Koh IH. 1996. Transplant. Proc.: 28:2661).

Les études cliniques confirment que la surcroissance bactérienne dans l'intestin grêle est associée avec une accentuation de BT et un accroissement de la morbidité chez les patients en soins intensifs (MacFie J et coll. 1999. Gut, 45:223-228).

**BT peut survenir chez des sujets en bonne santé** et est sans doute (dans des limites qui restent à précisément définir) un événement physiologique sans conséquences délétères reflétant le mutualisme établi par la co-évolution animal/homme -microbes (Sedman PC et al. 1994. Gastroenterology, 107:643-649)

La translocation d'endotoxine et de peptidoglycane représente sans doute un stimulus physiologique du système immunitaire inné et par conséquent du système immunitaire adaptatif.

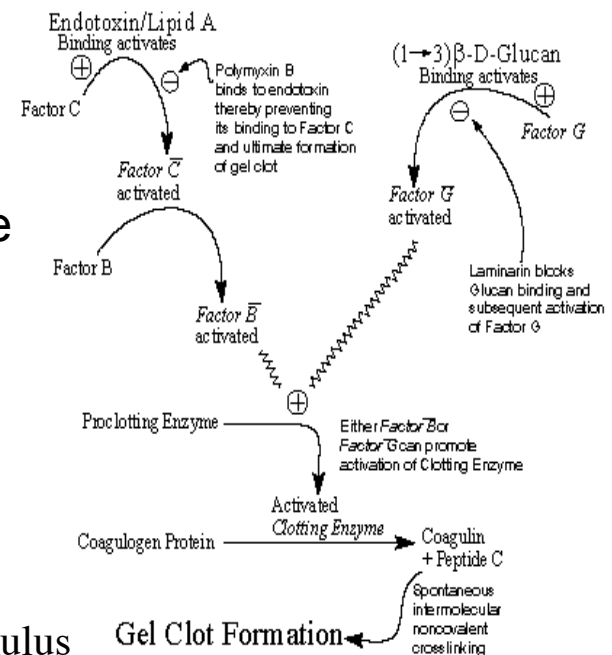
**Le niveau de base de BT chez l'homme en bonne santé est de 5-10%**, compte tenu de la sensibilité des méthodes de détection.

**Dans des situations médico-chirurgicales sévères, il peut atteindre 16-40%:**

- Surcroissance bactérienne dans l'intestin grêle
- Utilisation d'antibiotiques
- Immunosuppression
- Pancréatite aiguë, cirrhose, occlusion intestinale,
- Inflammation intestinale, hypotension (choc hémorragique polytraumas, brûlures sévères étendues)



Horseshoe crab (crabe limulus)



## **Problématique du mode de transport bactérien:**

- Bactéries libres dans la circulation ?
- Ou piégées dans des cellules circulantes (PNN, monocytes, DC) ?

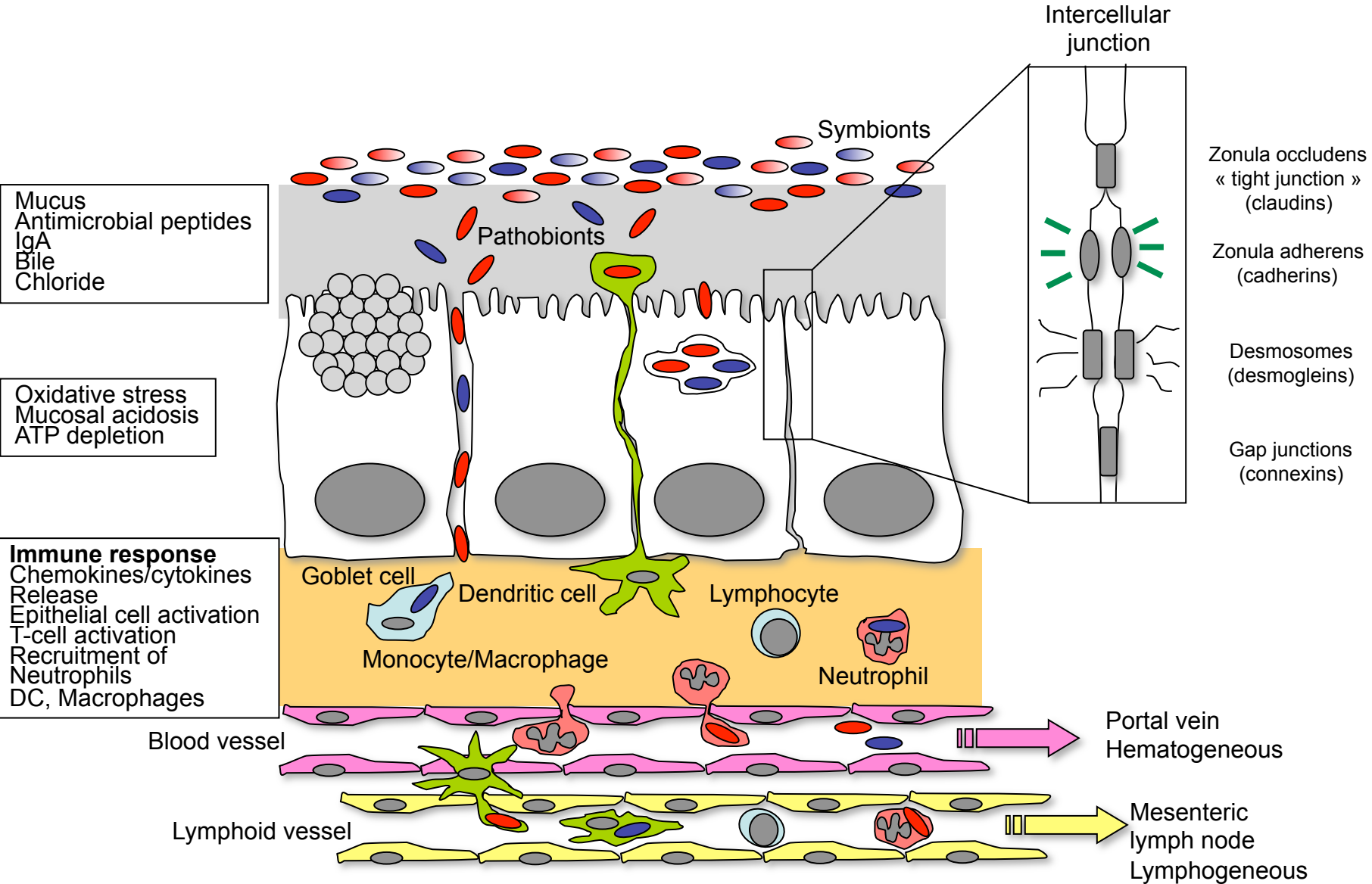
Méthodes d'étude

Culture des MLN

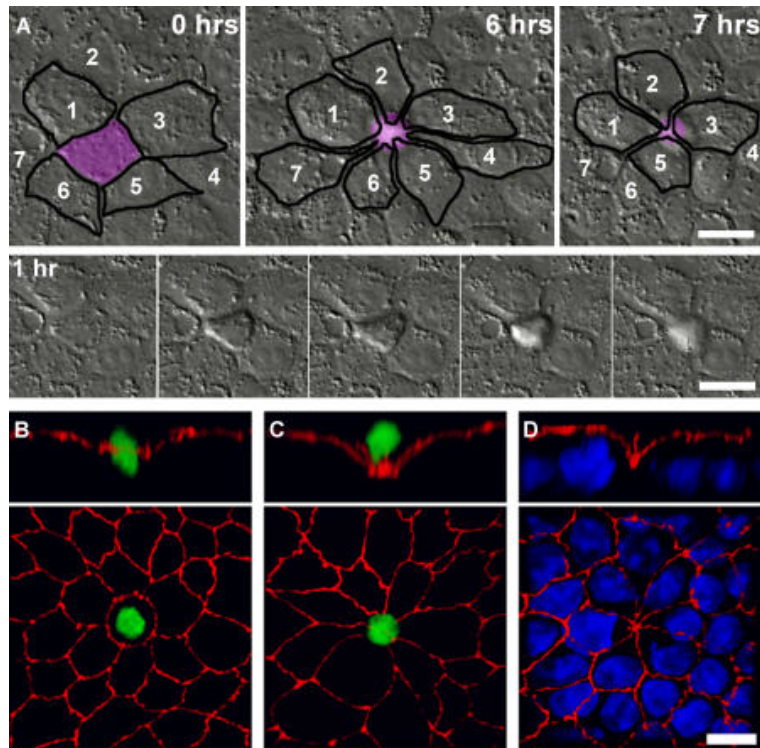
Bactéries radioactives

Détection d'endotoxine dans le sang circulant

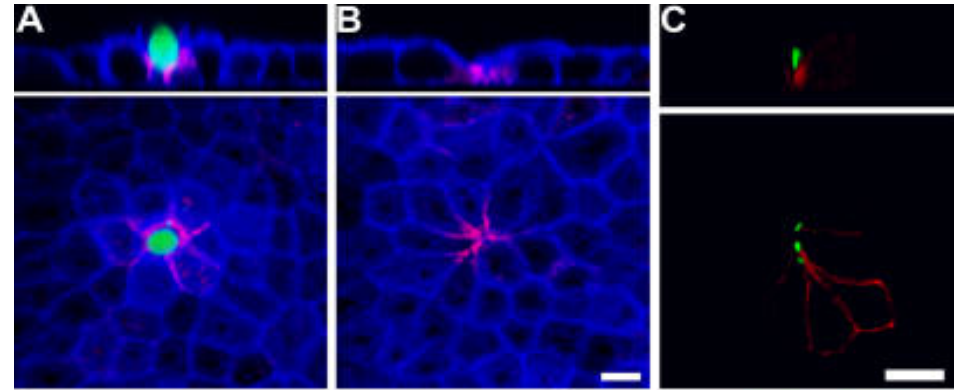
# Major mechanisms of BT



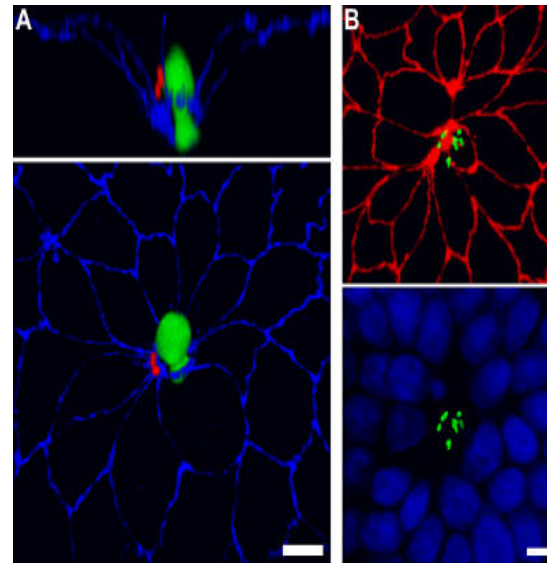
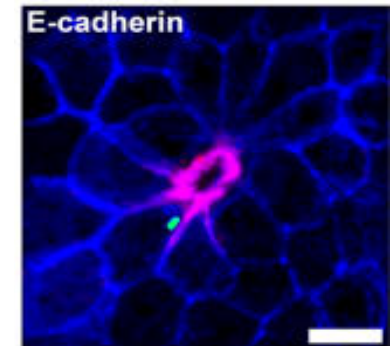
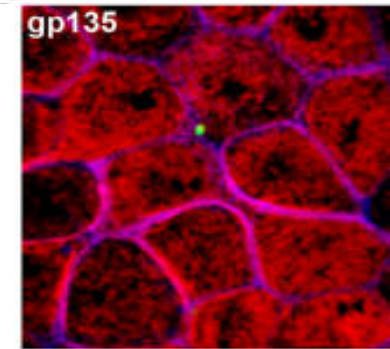
[PLoS Pathog.](#) 2006 Jan;2(1):e3. Epub 2006 Jan 27. **Listeria monocytogenes invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion.** [Pentecost M](#), [Otto G](#), [Theriot JA](#), [Amieva MR](#).



Multicellular Junctions Created by Cell Extrusion

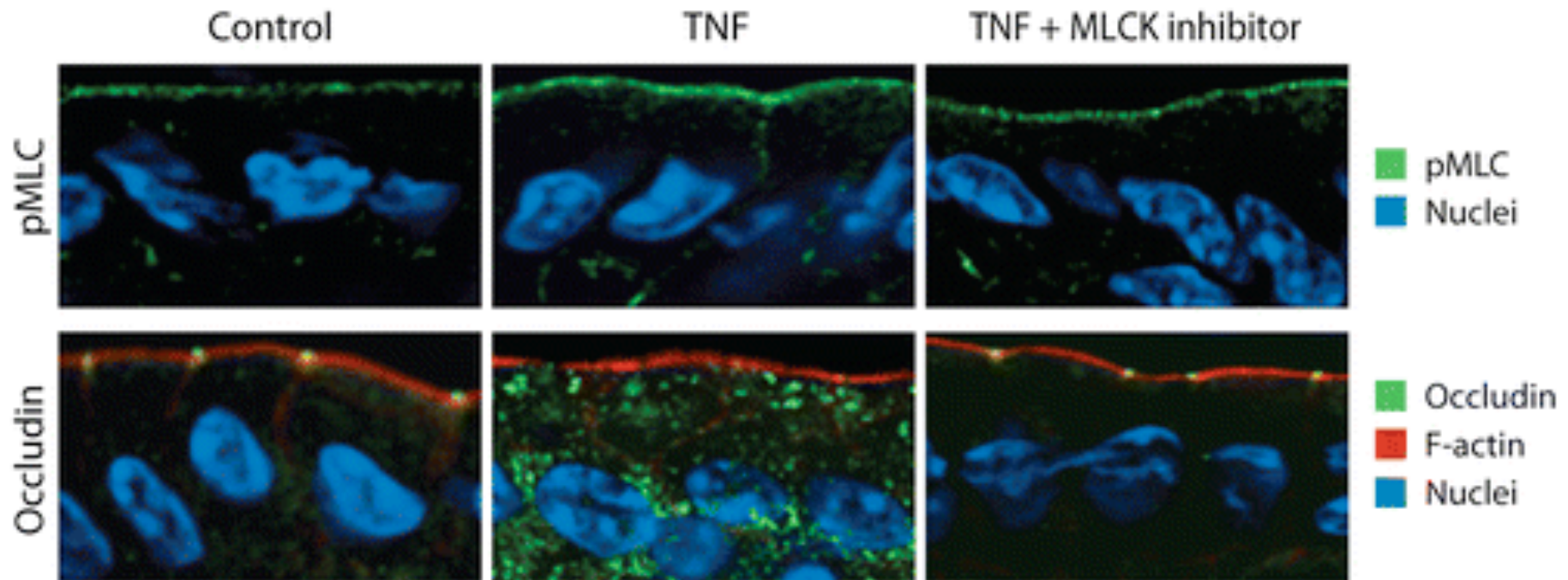


*L. monocytogenes* Attachment to Accessible E-cadherin at Multicellular Junctions of Cell Extrusion Sites



*L. monocytogenes* Adhesion to Sites of Cell Extrusion

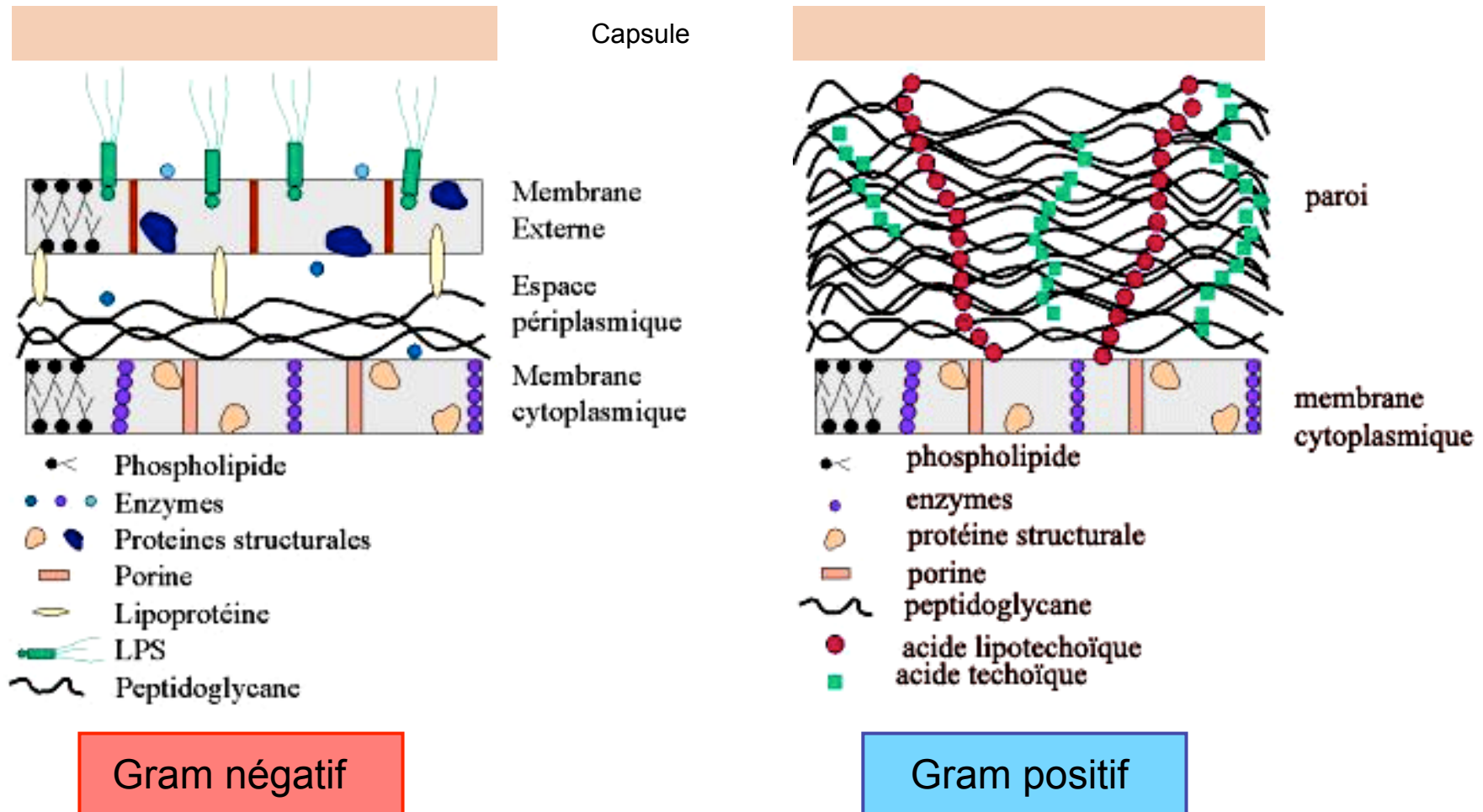
# Subversion des fonctions de barrière de l'épithélium intestinal par les médiateurs de l'inflammation



Marchiado et coll., 2010, *Annu.Rev.Pathol.Mech.Dis.*, 5:119-144

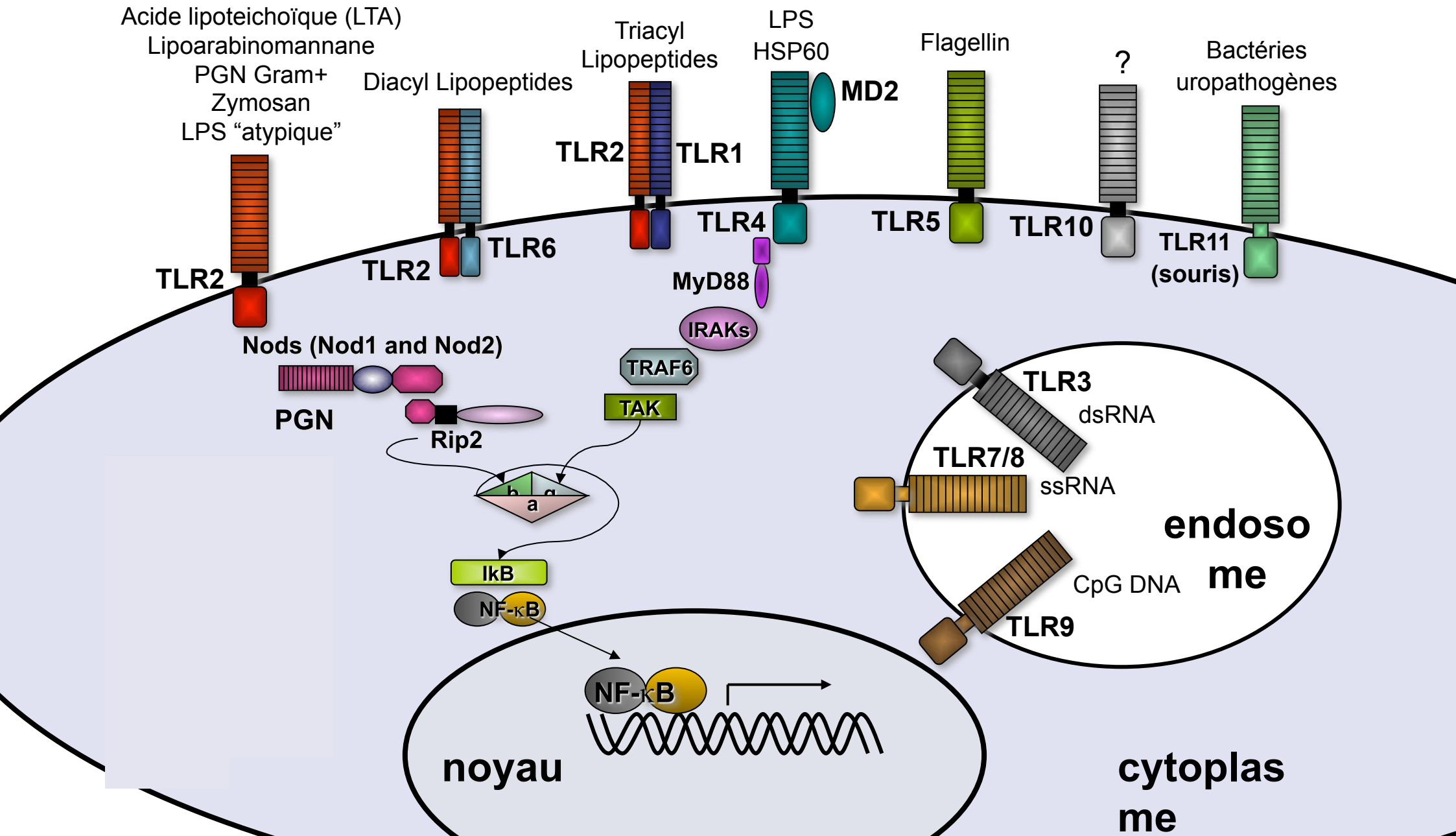
Effects of tumor necrosis factor (TNF) on myosin II regulatory light chain (MLC) phosphorylation and occludin localization. In vivo TNF treatment increases phosphorylation of MLC at the perijunctional actomyosin ring of jejunal villus enterocytes. (Top row) MLC phosphorylation can be blocked by MLC kinase (MLCK) inhibition. (Bottom row) Similarly, TNF-induced occludin internalization can be blocked by MLCK inhibition. Abbreviation: pMLC, phosphorylated MLC.

# Différences structurales entre les enveloppes des bactéries à Gram + et à Gram -

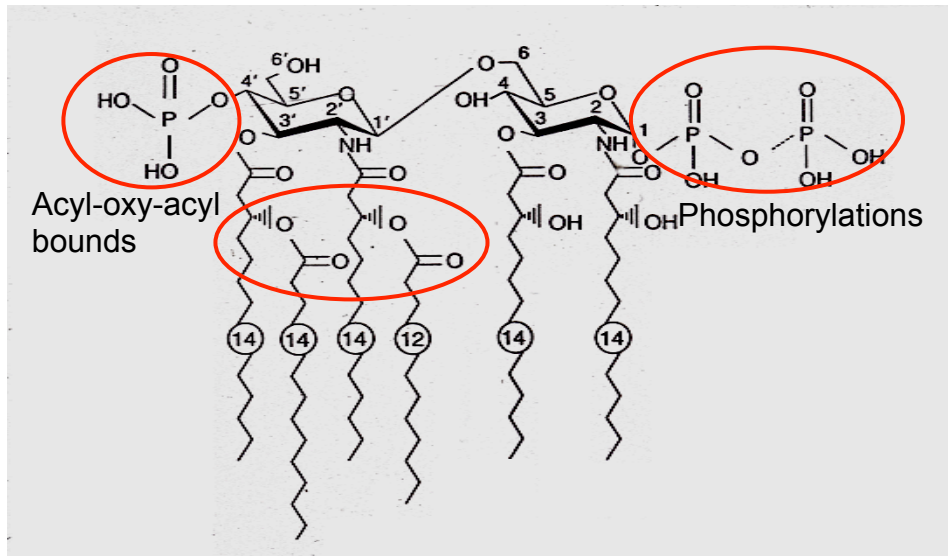




# “PATHOGEN RECOGNITION RECEPTORS (PRRs)” & PAMPs



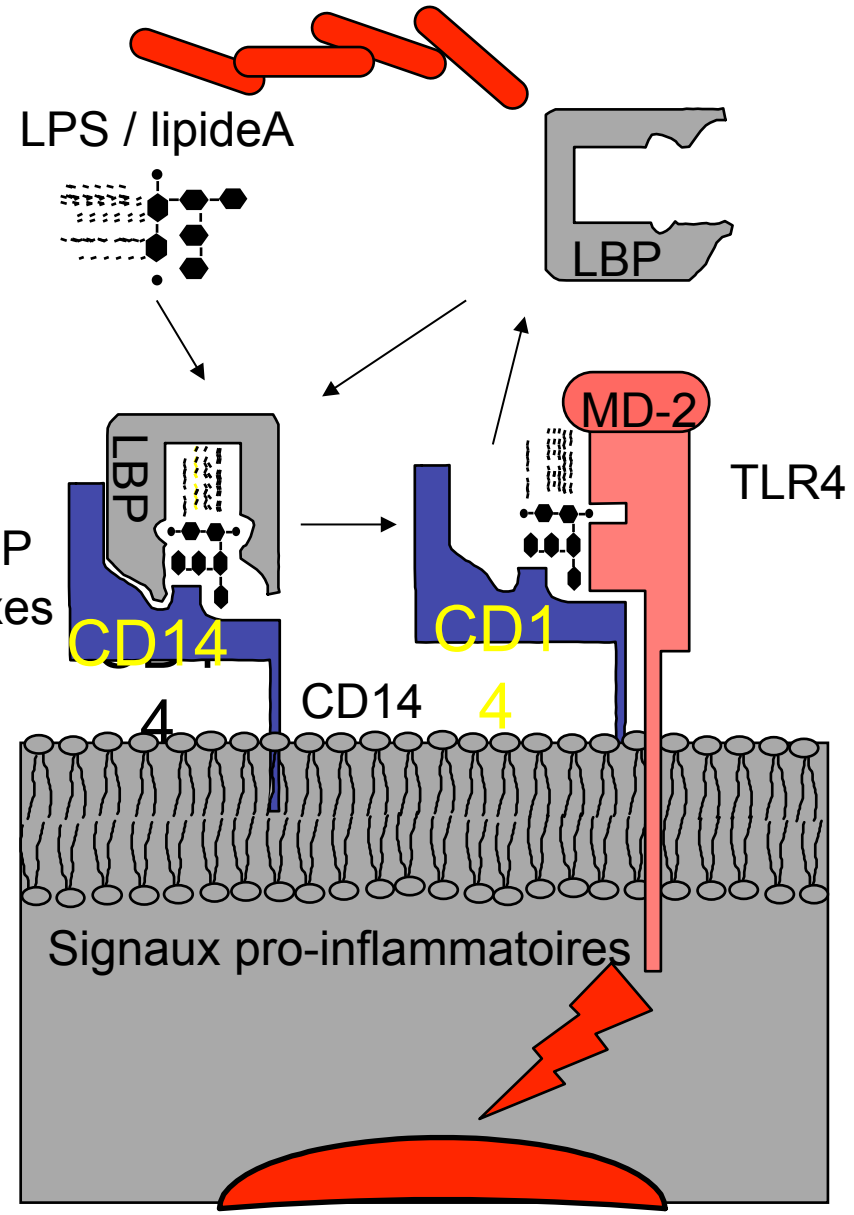
# Reconnaissance du Lipopolysaccharide (LPS) par TLR4

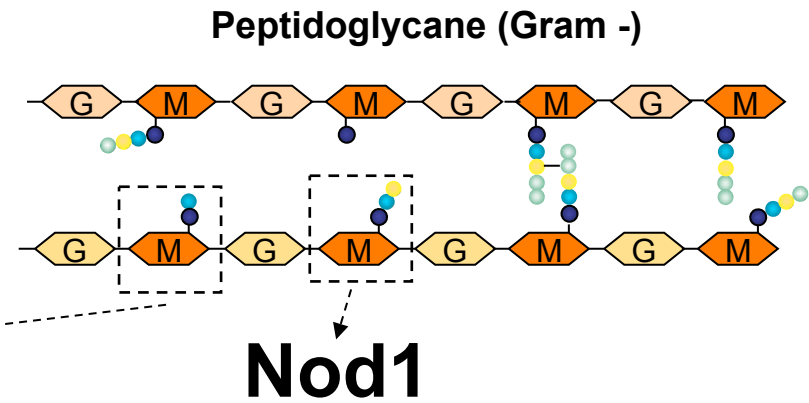
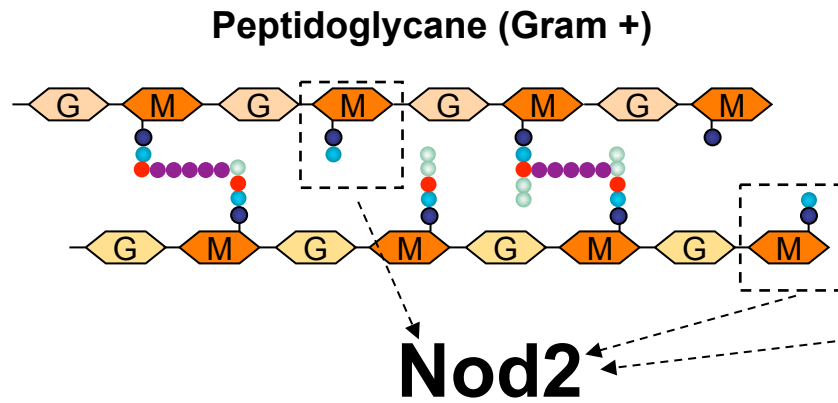


Lipide A « classique » d'*E. coli*

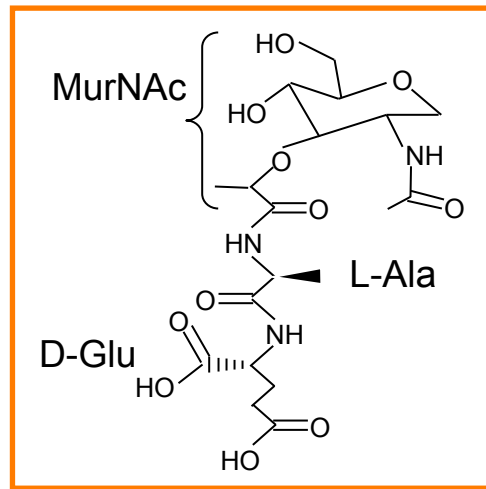
○ Eléments assurant le niveau d'endotoxicité du lipide A

Le lipide A des BG- anaérobies commensaux (Bacteroidetes) sont tetra/pentacylés, donc faiblement agonistes, voire antagonistes sur TLR4, contrairement au lipide A hexacylé des BG - aéro-anaérobies commensaux et pathogènes (Munford RS & Varley AW. 2006. PLoS Path., 2:e67).

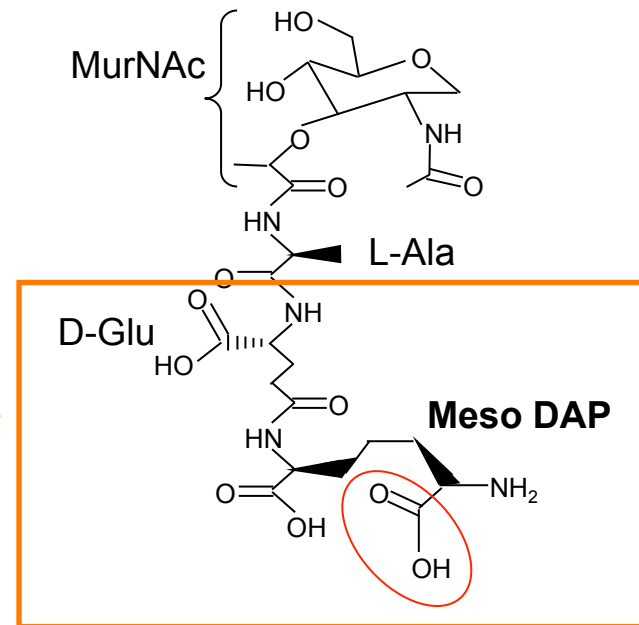




**MurNAc-L-Ala-D-Glu**



**MurNAc-L-Ala-D-Glu-mesoDAP**



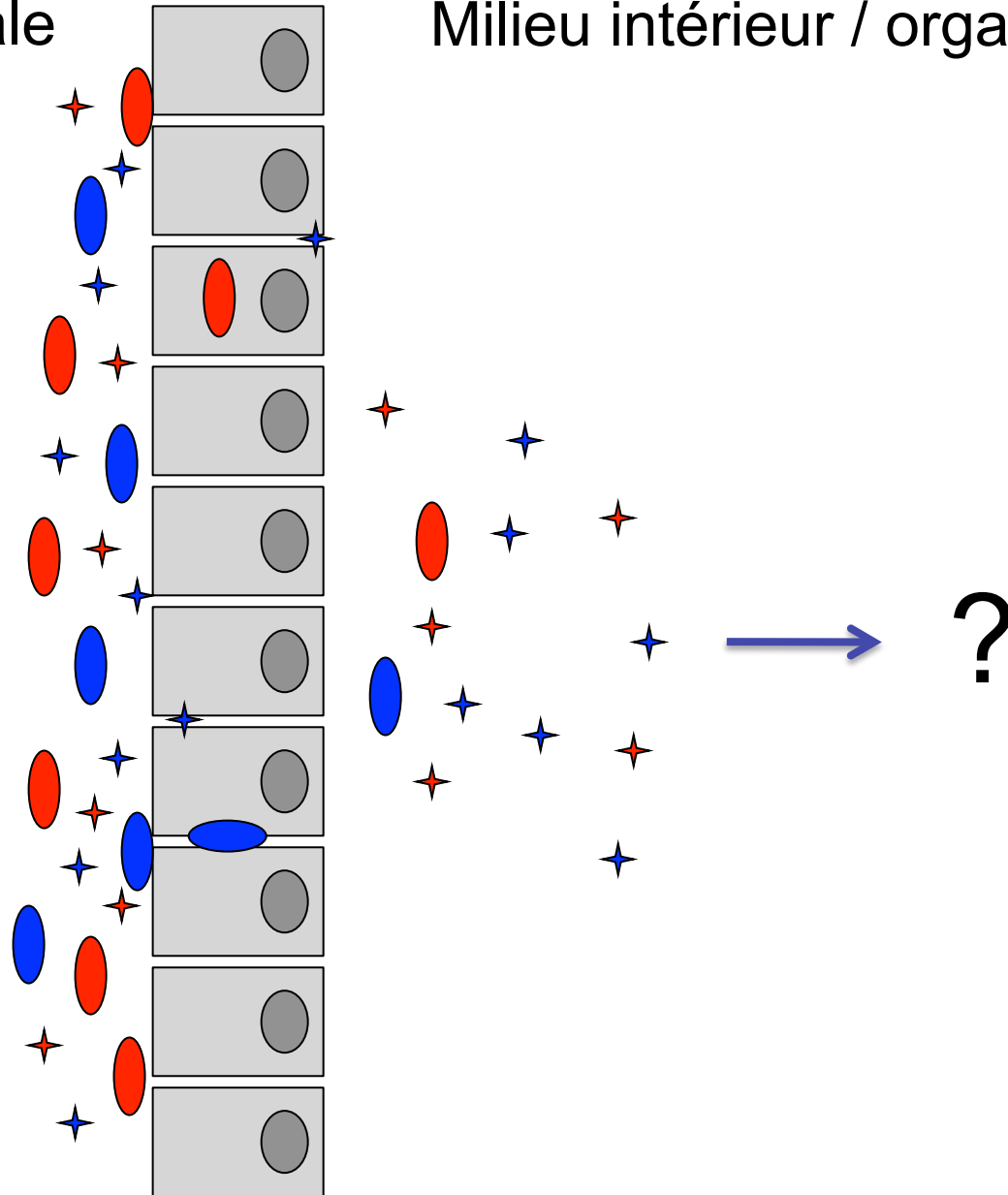
Structure minimale

# Barrière épithéliale intestinale

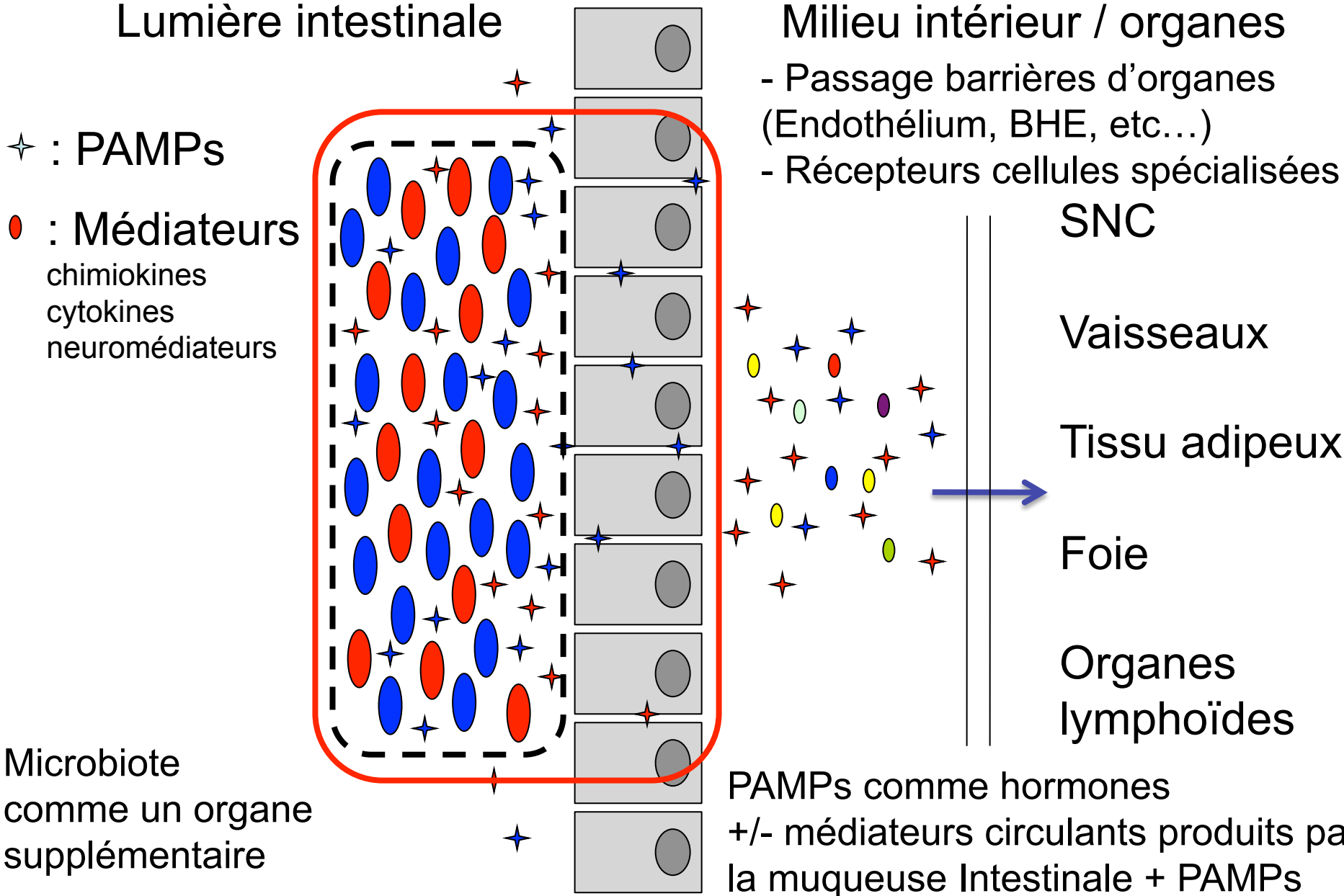
Lumière intestinale

Milieu intérieur / organes

✦ : PAMPs



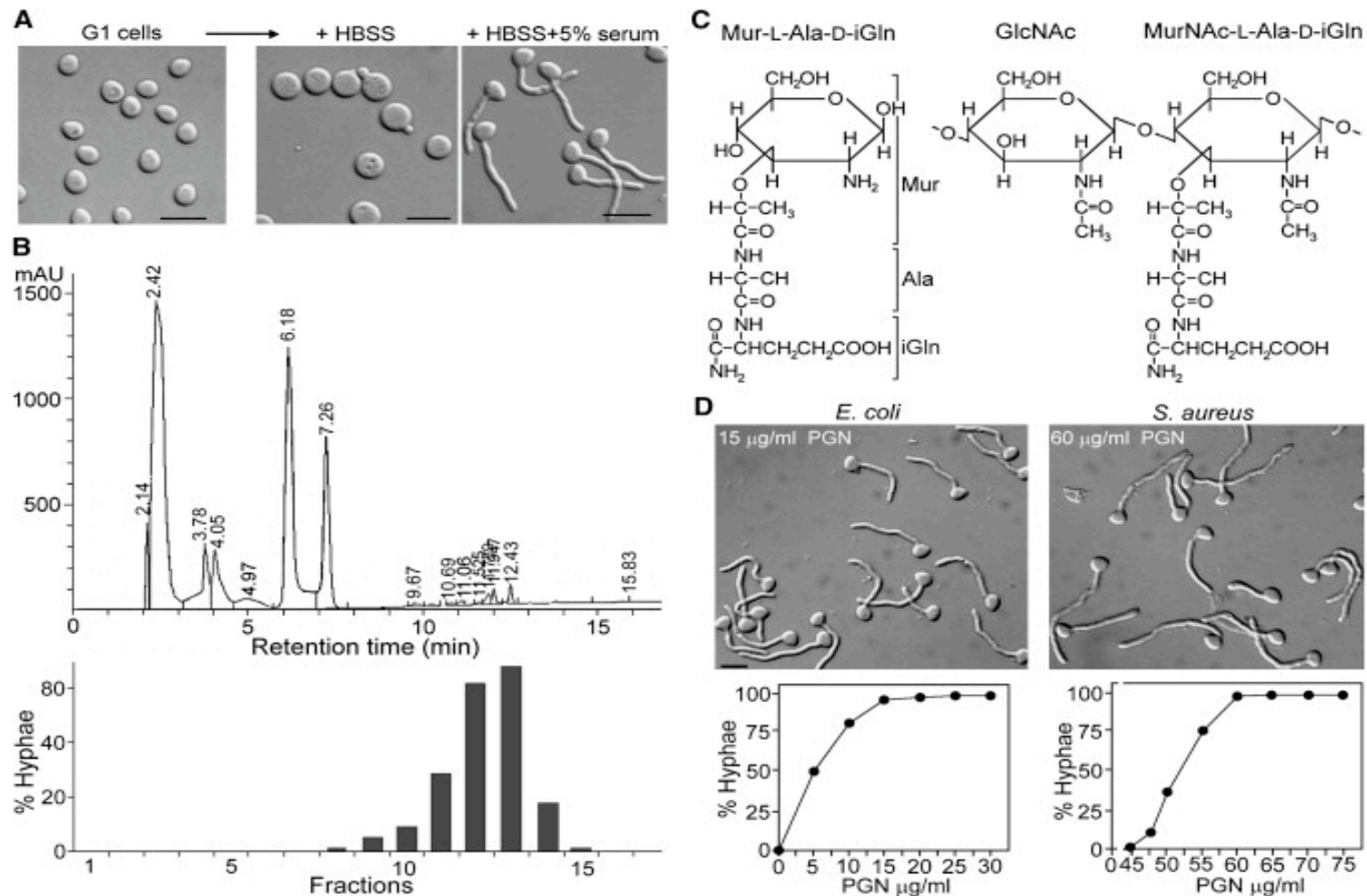
# Barrière épithéliale intestinale



**Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p.**

Xu XL, Lee RT, Fang HM, Wang YM, Li R, Zou H, Zhu Y, Wang Y

*Cell Host Microbe*. 2008. Jul 17;4(1):28-39.



Identification of Serum Hypha-Inducing Factors(A) Elutriated G1 cells were incubated in HBSS with or without 5% serum filtrate at 37°C for 2 hr. The use of G1 cells was to ensure uniform hyphal growth, allowing more accurate differentiation of the activities of various hypha-inducing compounds. Bars indicate 5 microns.(B) The upper panel shows a chromatogram of reversed-phase HPLC separation of serum. To track the hypha-inducing activity, 10 microg of each fraction was added to 40 microl of HBSS containing yeast cells at  $5 \times 10^5$  cells/ml and then incubated at 37°C for 2 hr (lower panel).(C) A proposed compound (left) based on the NMR data and a subunit of typical bacterial PGN (right).(D) *E. coli* and *S. aureus* PGNs were hydrolyzed with HCl, passed through a 3 kDa filter, and lyophilized before testing for hyphal induction in HBSS for 2 hr. Bar indicates 5 microm.

# Translocation bactérienne en conditions physiologiques

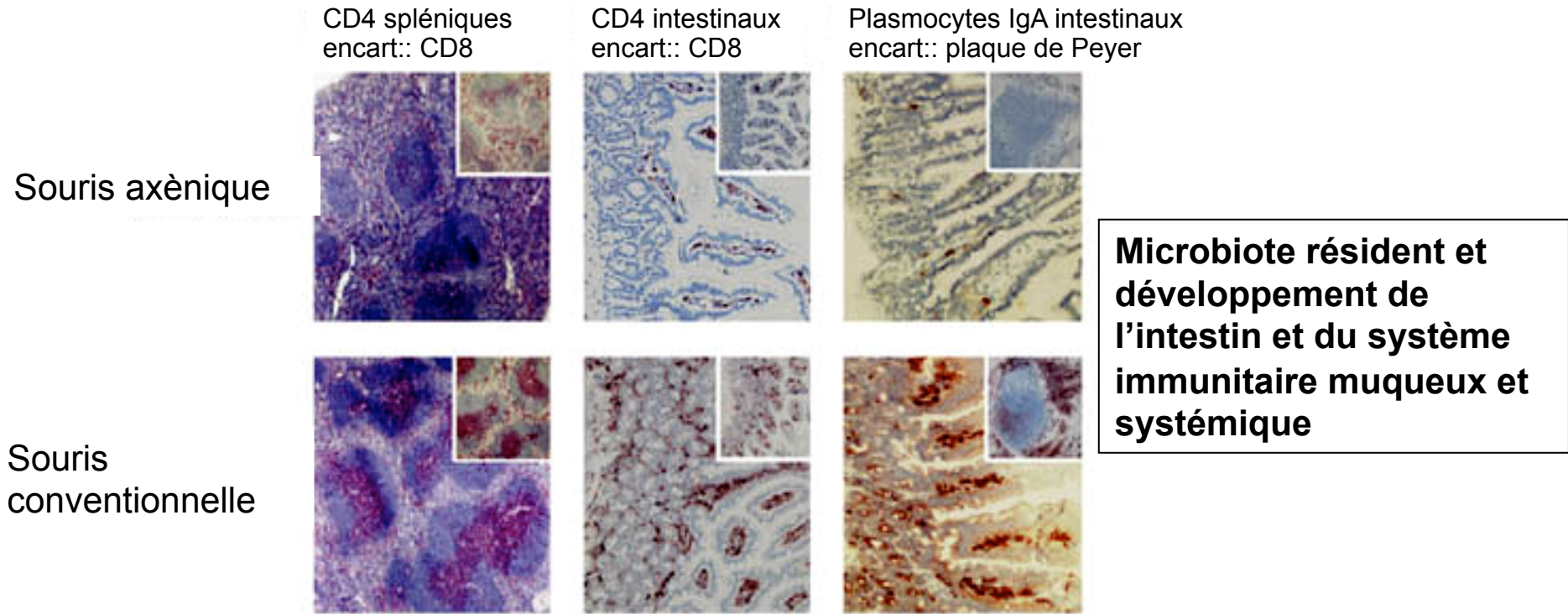
BT pris au sens large: translocation de bactéries vivantes et/ou des PAMPs correspondant.

Conséquences:

Maturation (maintien du niveau de veille ?) du système immunitaire

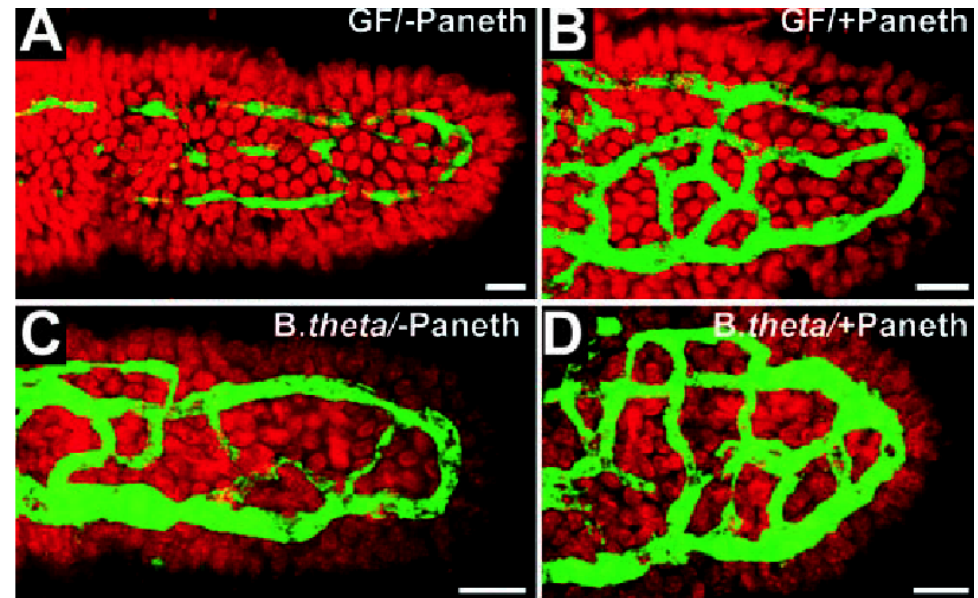
Equilibre du métabolisme des sucres et des lipides

Développement du système nerveux, contrôle de l'activité, comportement



Macpherson & Harris, 2004, Nature Reviews Immunology

Villosités intestinales murines  
Immunomarquage FITC = Facteur de Willebrand  
(vaisseaux de la lamina propria)



Stappenback et coll., 2002, PNAS



## Article

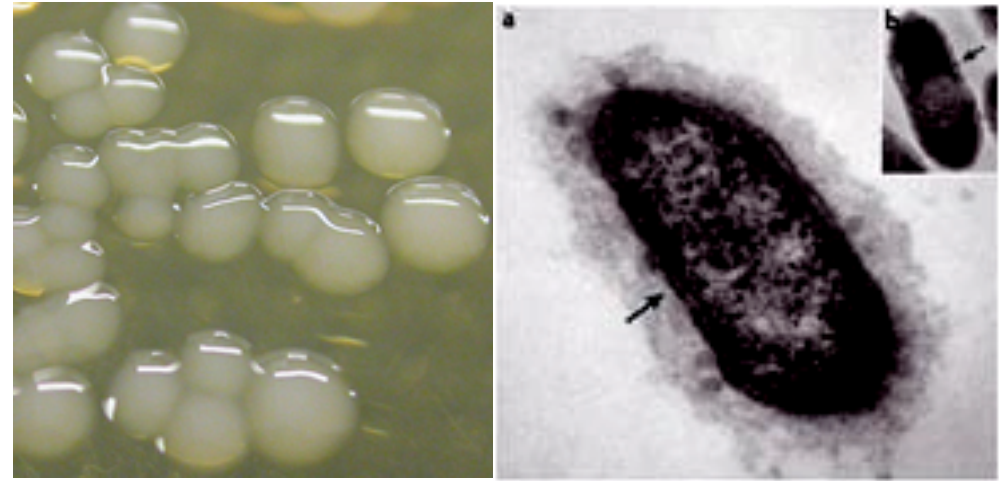
# **An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System**

**Sarkis K. Mazmanian<sup>1, 3, ,</sup>, Cui Hua Liu<sup>1, 2,</sup> Arthur O. Tzianabos<sup>1, 3</sup> and Dennis L. Kasper<sup>1, 3,</sup>**

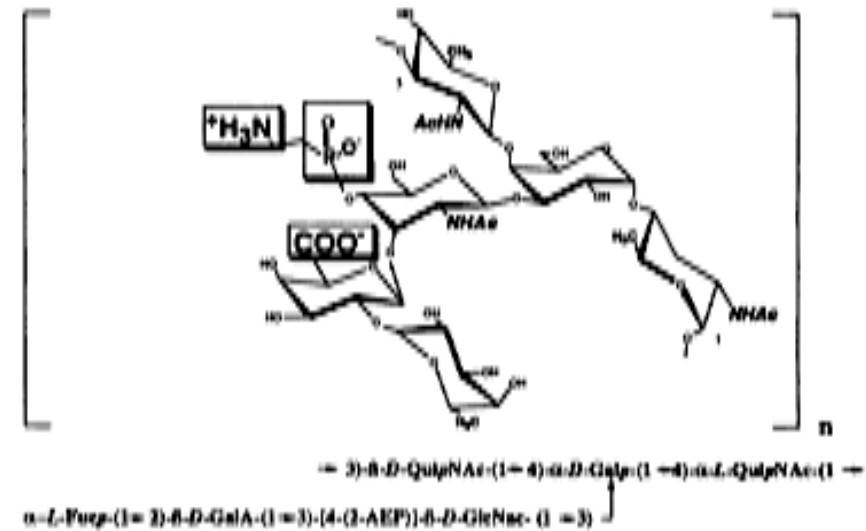
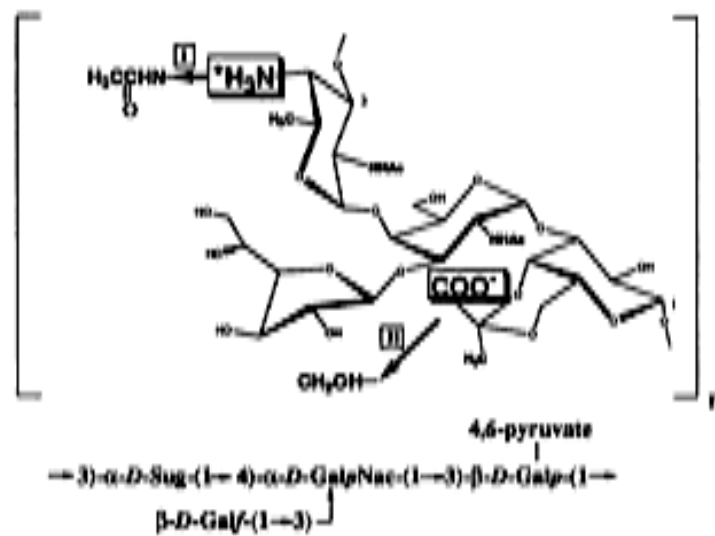
**<sup>1</sup>Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115**

**<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China**

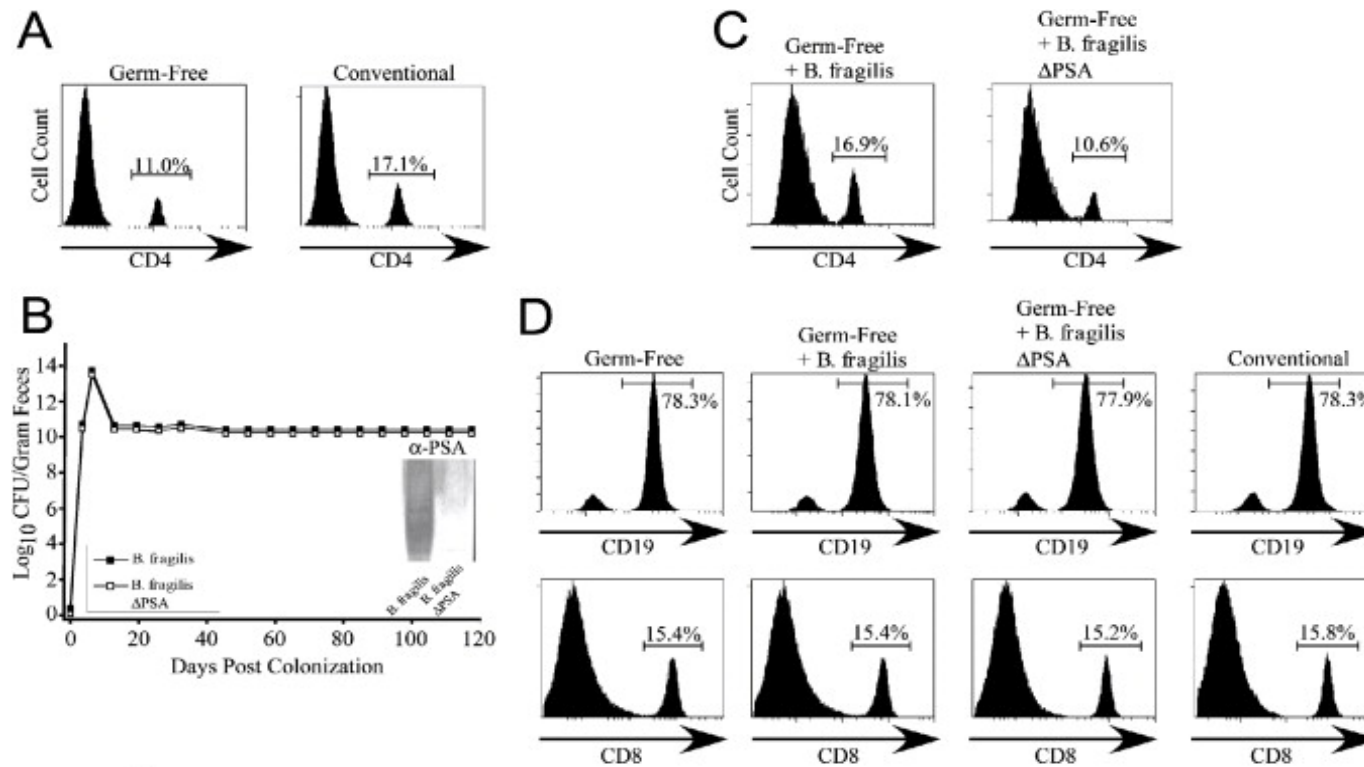
**<sup>3</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115**



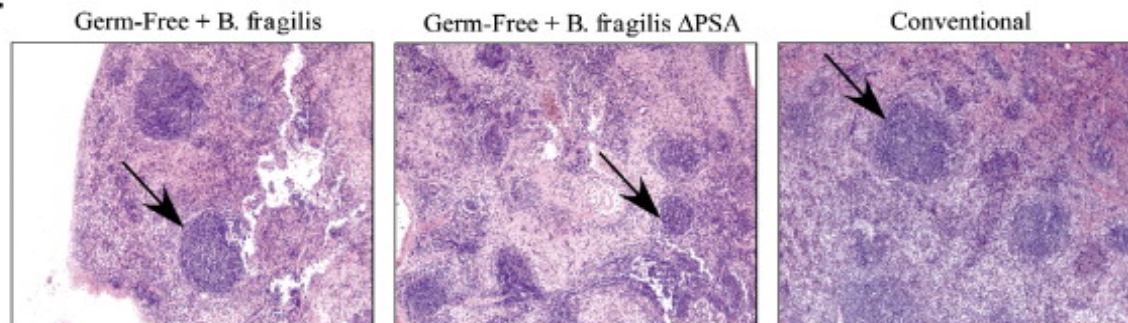
*Bacteroides fragilis* - capsule - EPS



La maturation cellulaire, fonctionnelle et physique du système immunitaire périphérique de souris axéniques requiert la colonisation intestinale par *Bacteroides fragilis* produisant l'antigène capsulaire polysaccharidique (PSA) PSA nécessaire à la maturation des lymphocytes CD4+, mais pas CD8+ et B

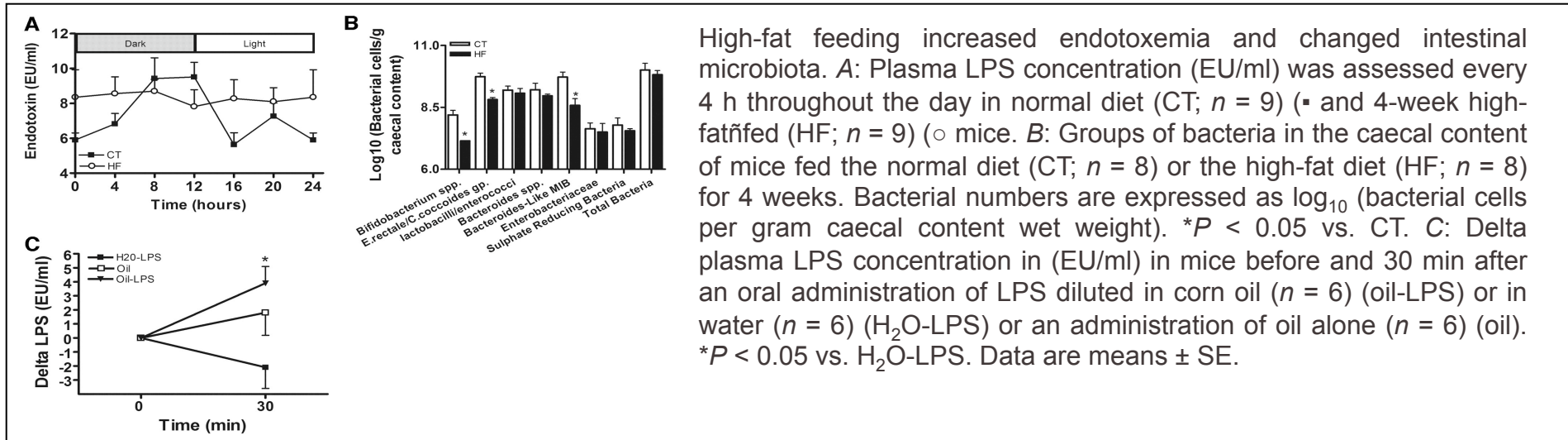


**E**



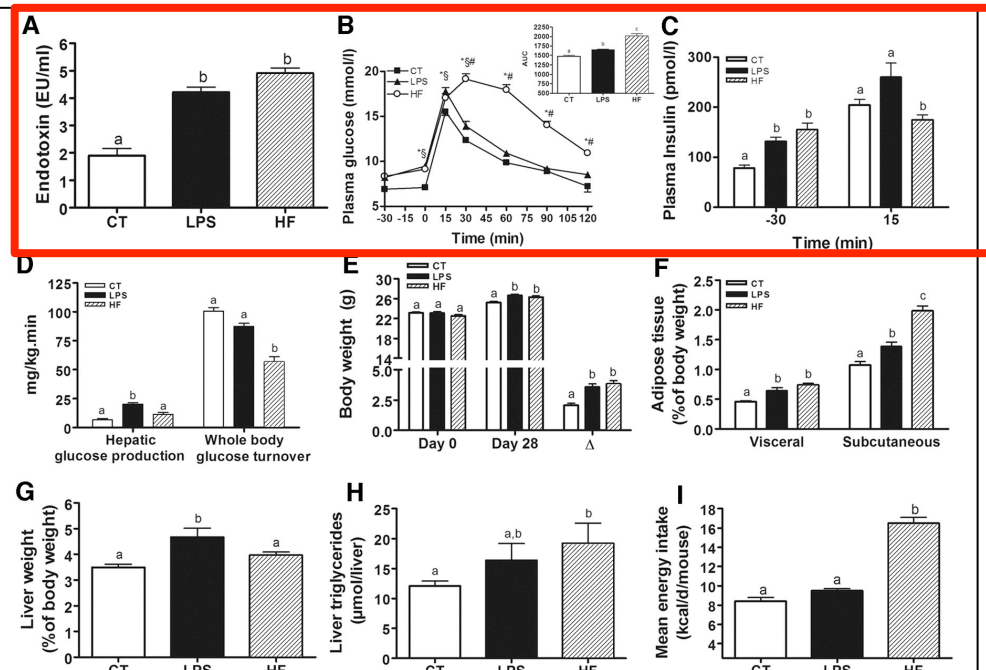
Absence de larges follicules lymphoïdes spléniques chez les souris axéniques ou monocolonisées par une souche de *B. fragilis* ΔPSA. Mesure de la déplétion en cellules T.

**Diabetes.** 2007 Jul;56(7):1761-72. Epub 2007 Apr 24. **Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance.** Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, DelmÈe E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, FerriÈres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R.



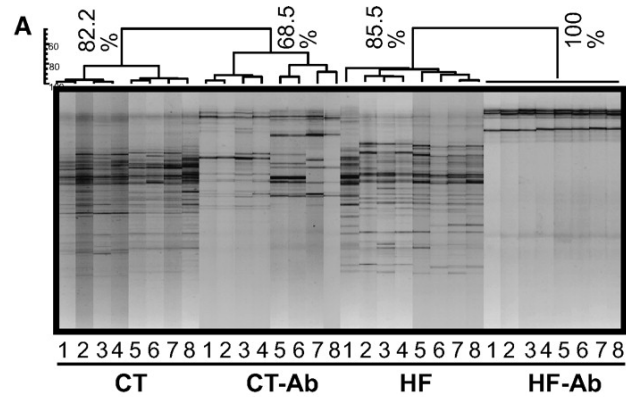
High-fat feeding increased endotoxemia and changed intestinal microbiota. **A:** Plasma LPS concentration (EU/ml) was assessed every 4 h throughout the day in normal diet (CT;  $n = 9$ ) (■) and 4-week high-fat fed (HF;  $n = 9$ ) (○) mice. **B:** Groups of bacteria in the caecal content of mice fed the normal diet (CT;  $n = 8$ ) or the high-fat diet (HF;  $n = 8$ ) for 4 weeks. Bacterial numbers are expressed as  $\log_{10}$  (bacterial cells per gram caecal content wet weight). \* $P < 0.05$  vs. CT. **C:** Delta plasma LPS concentration in (EU/ml) in mice before and 30 min after an oral administration of LPS diluted in corn oil ( $n = 6$ ) (oil-LPS) or in water ( $n = 6$ ) (H<sub>2</sub>O-LPS) or an administration of oil alone ( $n = 6$ ) (oil). \* $P < 0.05$  vs. H<sub>2</sub>O-LPS. Data are means  $\pm$  SE.

Chronic experimental metabolic endotoxemia induces obesity and diabetes. **A:** Plasma endotoxin concentration (EU/ml) in WT mice infused with saline (CT;  $n = 18$ ) or LPS ( $n = 18$ ) for 4 weeks using subcutaneous osmotic pumps and compared with mice fed a high-fat diet for 4 weeks (HF;  $n = 18$ ). **B:** Plasma glucose (mmol/l) following an oral glucose load (3 g/kg) in control (CT;  $n = 24$ ), LPS ( $n = 13$ ), or high-fat diet (HF;  $n = 24$ ) mice. The inset represents the area under curve for each group. \* $P < 0.05$  vs. CT;  $\beta$ LPS vs. CT; #HF vs. LPS. **C:** Plasma insulin (pmol/l) concentrations 30 min before (-0) and 15 min after (15) an oral glucose load in control (CT;  $n = 24$ ), LPS ( $n = 13$ ), or high-fat diet fed (HF;  $n = 24$ ) mice. **D:** Hepatic glucose production and whole-body glucose turnover rates ( $\text{mg} \sum \text{kg}^{-1} \sum \text{min}^{-1}$ ) in control (CT;  $n = 5$ ), LPS ( $n = 5$ ), or high-fat diet fed (HF;  $n = 5$ ) mice. **E:** Body weight (g) before (day 0) and after a 28-day treatment period (day 28) and body weight gain ( $\Delta$ ) in control (CT;  $n = 26$ ), LPS ( $n = 21$ ), or high-fat diet fed (HF;  $n = 34$ ) mice. **F:** Visceral and subcutaneous adipose tissue weight (percentage of body weight) in control (CT;  $n = 26$ ), LPS ( $n = 21$ ), or high-fat diet fed (HF;  $n = 34$ ) mice. **G:** Liver weight (percentage of body weight) in control (CT;  $n = 26$ ), LPS ( $n = 21$ ), or high-fat diet fed (HF;  $n = 34$ ) mice. **H:** Liver triglycerides ( $\mu\text{mol/liver}$ ) in control (CT;  $n = 12$ ), LPS ( $n = 9$ ), or high-fat diet fed (HF;  $n = 11$ ) mice. **I:** Mean energy intake ( $\text{kcal} \sum \text{day}^{-1} \sum \text{mouse}^{-1}$ ) in control (CT;  $n = 18$ ), LPS ( $n = 18$ ), or high-fat diet fed (HF;  $n = 18$ ) mice.

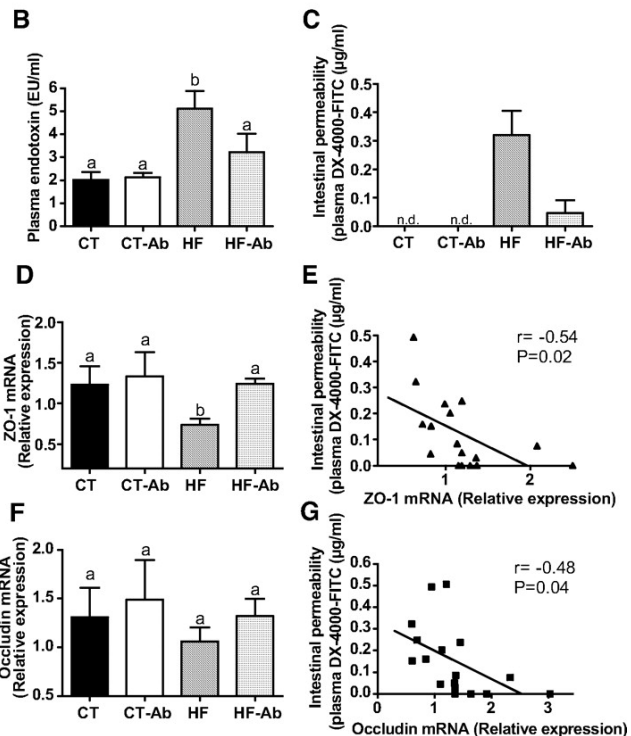


**Diabetes.** 2008 Jun;57(6):1470-81. Epub 2008 Feb 27. **Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice.**

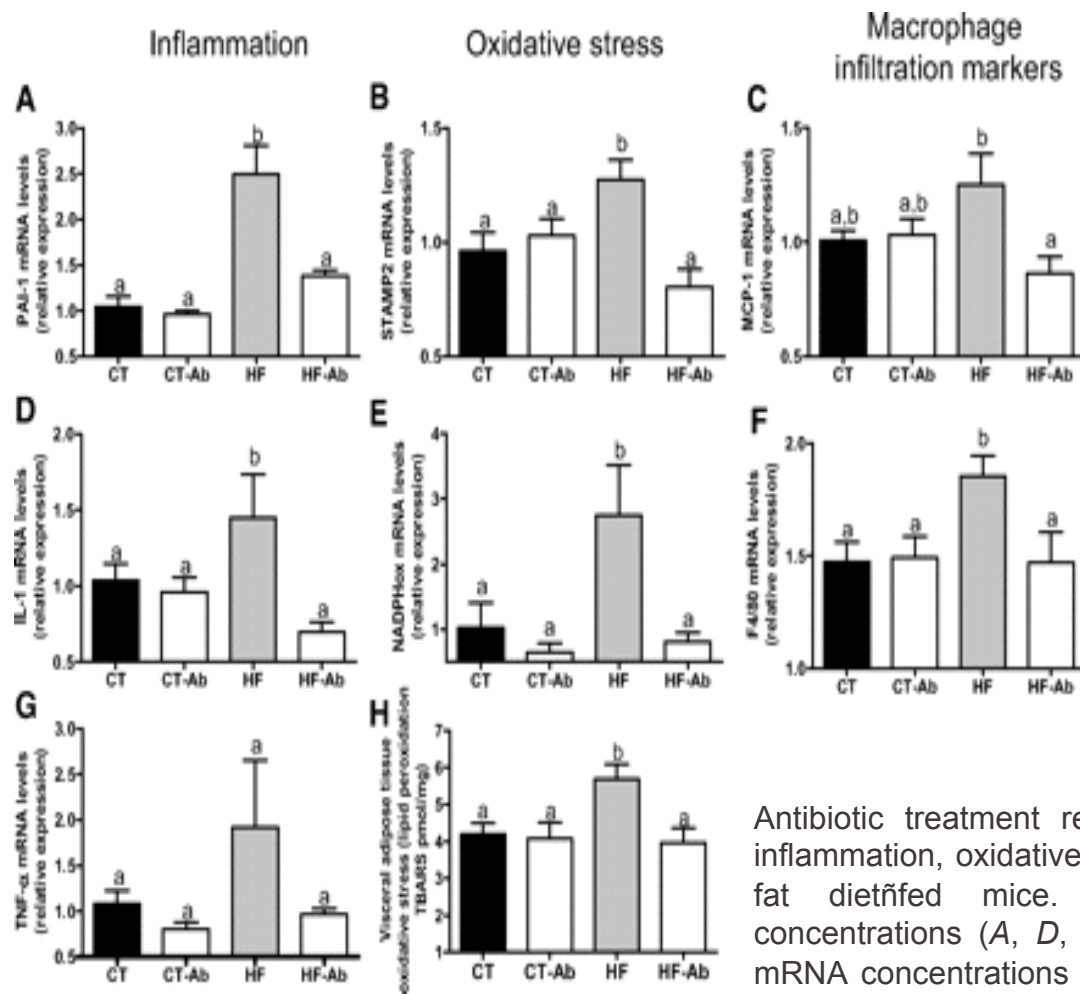
[Cani PD](#), [Bibiloni R](#), [Knauf C](#), [Waget A](#), [Neyrinck AM](#), [Delzenne NM](#), [Burcelin R](#).



Denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) combined with multiplex PCR on 16S RNA gene sequences specific of major bacterial phyla



Antibiotic treatment associated changes in gut microbiota, intestinal permeability, and endotoxemia during high-fat feeding. **A:** DGGE profiles generated from the cecal microbiota in mice fed normal diet (CT), normal diet and antibiotics (CT-Ab), high-fat diet (HF), or high-fat diet and antibiotics (HF-Ab) for 4 weeks. Each number and profile corresponds to a different animal. Bar = Dice's similarity coefficient. **B:** Plasma endotoxin (LPS) concentration (EU/ml). Data are means  $\pm$  SE. Data with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ), according to the post hoc ANOVA statistical analysis. **C:** Intestinal permeability assay: Plasma DX-4000-FITC ( $\mu$ g/ml). n.d., not detectable concentration. **D and F:** Epithelial tight junction proteins markers (ZO-1 and occludin mRNA concentrations). **E and G:** Correlations between intestinal permeability markers: plasma DX-4000-FITC and epithelial tight junction ZO-1 and occludin mRNA concentrations ( $P < 0.05$ ). *Inset* corresponds to Pearson's  $r$  correlation and corresponding  $P$  value. Data are means  $\pm$  SE. Data with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to the post hoc ANOVA statistical analysis.

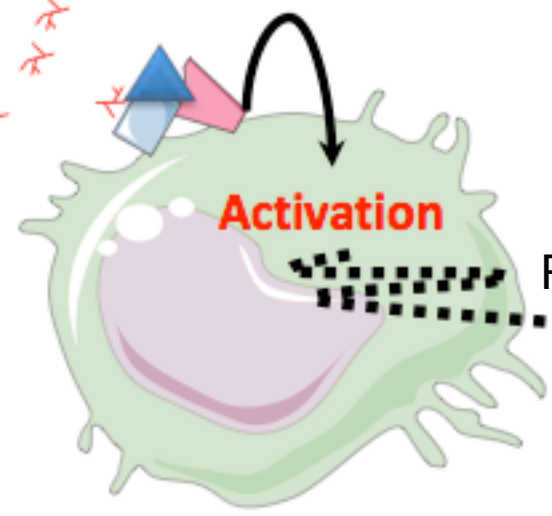
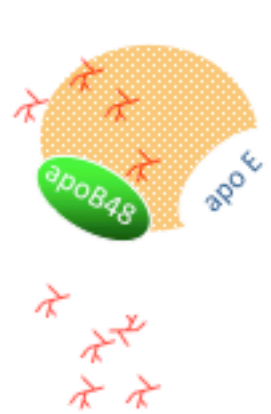
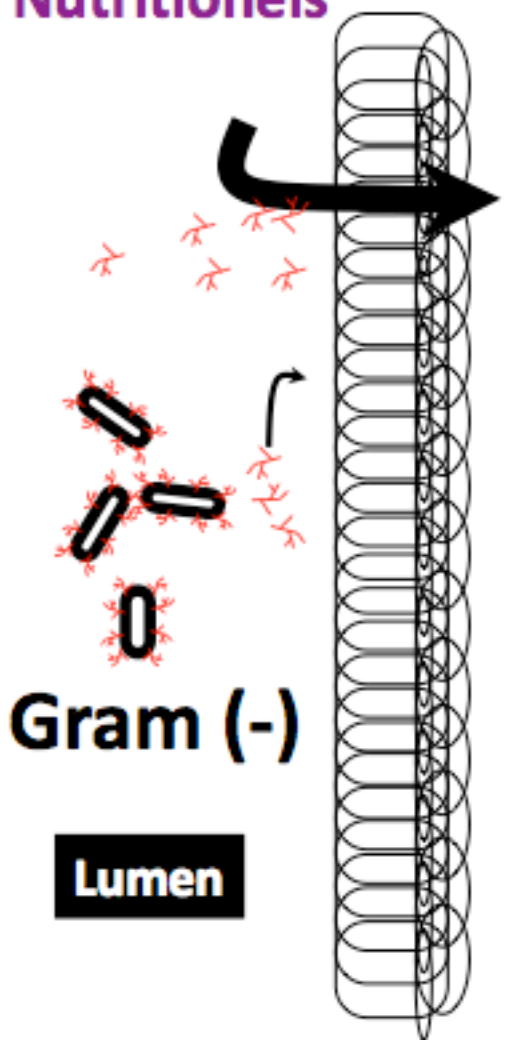


Antibiotic treatment reduced the occurrence of visceral adipose tissue inflammation, oxidative stress, and macrophage infiltration markers in high-fat dietfed mice. Inflammation: PAI-1, IL-1, and TNF- $\alpha$ mRNA concentrations (A, D, and G); oxidative stress: STAMP-2 and NADPHox mRNA concentrations (B and E); macrophage infiltration markers: MCP-1 and F4/80 mRNA concentrations (C and F), visceral adipose tissue oxidative stress levels (lipid peroxides concentrations) (H) in mice fed normal diet (CT), normal diet and antibiotics (CT-Ab), high-fat diet (HF), or high-fat diet and antibiotics (HF-Ab) for 4 weeks. Data are means  $\pm$  SE. Data with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to the post hoc ANOVA statistical analysis.

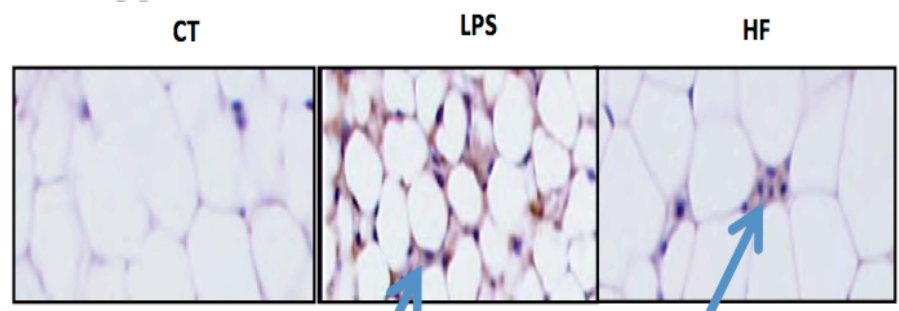
Lipides  
Nutritionnels

LPS  
Absorption ?

- mCD14
- TLR4
- LPS
- MD2



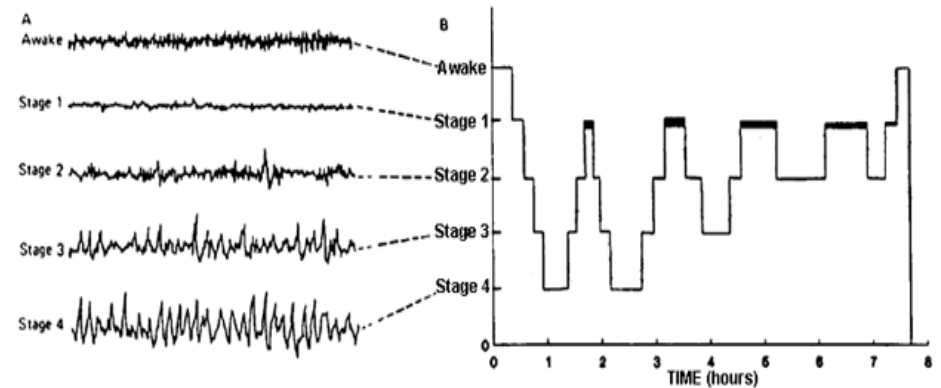
Résistance à l'insuline  
Obésité  
Diabète



Macrophages

D'après Burcelin R et coll.

*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*  
253: R646-R654, 1987



**Enhancement of quiet sleep in rabbit neonates by muramyl dipeptide**

**D. Davenne and J. M. Krueger**

Department of Physiology and Biophysics, University of Tennessee, Memphis 38163. Muramyl peptides that induce excess slow-wave sleep have been isolated from urine and brain. A synthetic analogue to those substances, muramyl dipeptide (MDP, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine), was found to induce prolonged increases in slow-wave sleep and to increase electroencephalographic (EEG) delta-wave activity. MDP is also pyrogenic, although this activity can be separated from its somnogenic activity. To further investigate the somnogenic actions of MDP, neonatal rabbits were used in the present study. Intraperitoneal injection of 100 micrograms/kg MDP induced differential somnogenic and pyrogenic effects; from postnatal days 7-9, MDP increased duration of quiet sleep (QS, the precursor of adult slow-wave sleep) and decreased active sleep (AS) as judged by behavioral criteria. These animals were not febrile during the period of enhanced QS, nor did MDP alter EEG delta-wave activity at this age. From postnatal days 10-15, MDP induced prolonged (6 h) increases in duration of QS; both behavioral and EEG criteria were used at this age to determine duration of QS and AS. Maximum MDP-induced effects occurred during the 2nd h, with a parallel increase in amplitudes of EEG delta-wave activity. At this age, MDP also elicited monophasic fevers and inhibition of AS, with maximum effects observed during hours 3-4 postinjection. After postnatal day 16, MDP-induced somnogenic and febrile responses were similar to those observed in adult rabbits. We conclude that the mechanisms responsible for behavioral sleep states are responsive to a sleep-promoting substance early in ontogenesis.



# Le microbiote intestinal module développement cérébral et comportement

La colonisation microbienne des mammifères est un processus conduit par l'évolution qui module plusieurs fonctions importantes. Des données récentes indiquent que le **microbiote intestinal** a un impact sur le **développement cérébral** et sur le **comportement** à l'âge adulte.



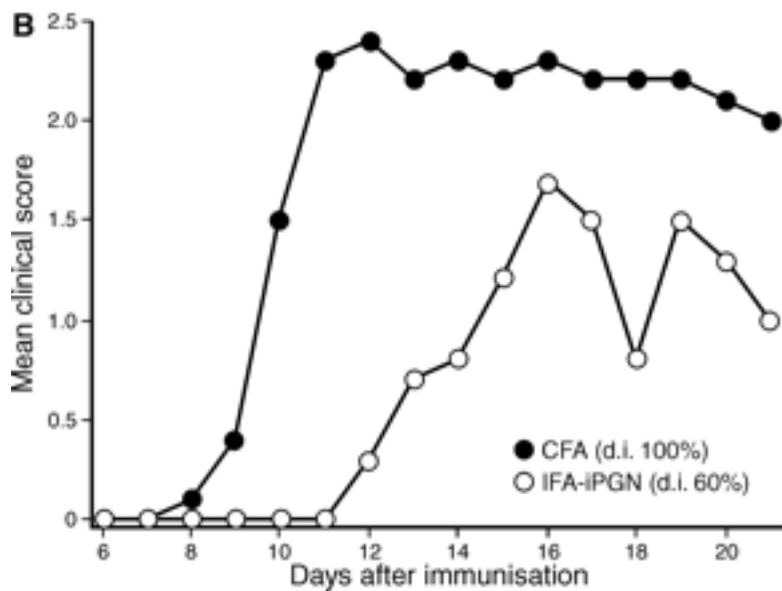
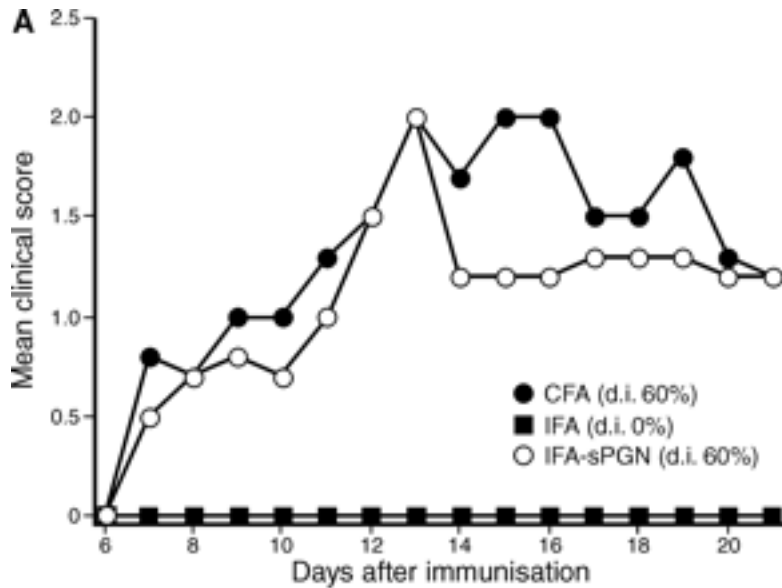
**Sur la base de mesures de l'activité motrice et de du niveau d'anxiété, le groupe de Sven Pettersson à l'Institut Karolinska à Stockholm vient de démontrer:**

- 1 – Les nouveaux-nés axéniques (germ-free = GF) ont une activité motrice accrue et un comportement anormal marqué par une diminution du niveau d'anxiété et une augmentation des conduites à risque en comparaison de souris colonisées par un microbiote normal (specific pathogen free = SPF).
- 2 – Ce phénotype comportemental anormal est associé à l'altération de l'expression de gènes impliqués dans la production de messagers secondaires et dans la potentialisation synaptique à long terme dans les zones du cerveau impliquées dans le contrôle moteur et dans le contrôle de l'anxiété.
- 3 – Les souris GF précocement colonisées par une flore intestinale normale acquièrent un phénotype comportemental similaire à celui des souris SPF, incluant une réduction de l'expression de PSD-95 et de la synaptophysine dans le striatum. Ces résultats suggèrent que la colonisation microbienne d'un individu initie une signalisation affectant les circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de l'activité motrice et de l'anxiété.

*The Journal of Immunology*, 2005, 174: 808-816

**Proinflammatory Bacterial Peptidoglycan as a Cofactor for the Development of Central Nervous System Autoimmune**

**Disease** Lizette Visser<sup>\*</sup>, Hendrik Jan de Heer<sup>Ü</sup>, Leonie A. Boven<sup>\*</sup>, Debby van Riel<sup>\*</sup>, Marjan van Meurs<sup>\*</sup>, Marie-JosÈ Melief<sup>\*</sup>, Ulrich Z%ohringer<sup>²</sup>, Jos van Strijp<sup>³</sup>, Bart N. Lambrecht<sup>Ü</sup>, Edward E. Nieuwenhuis<sup>á</sup> and Jon D. Laman<sup>1,\*</sup>

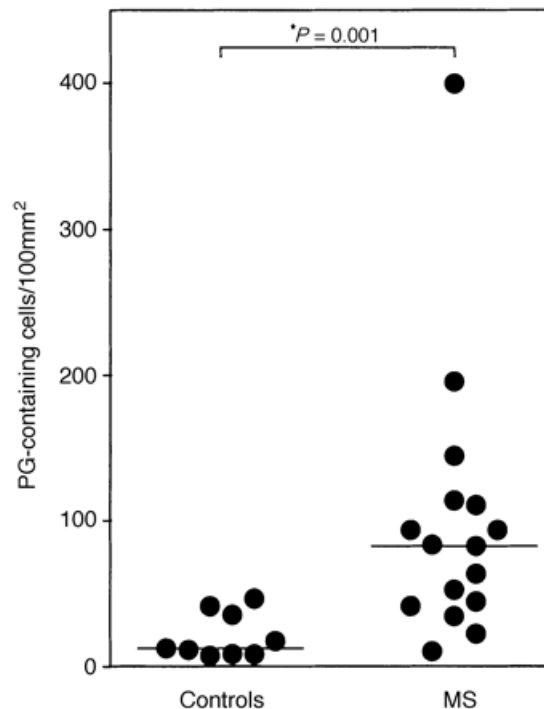


Both sPGN and iPGN are potent adjuvants for the induction of EAE. *A* and *B*, In two separate experiments, C57BL/6 mice were immunized with MOG<sub>35-55</sub> emulsified in CFA (i). In *A*, mice were immunized with MOG<sub>35-55</sub> in IFA (■), or IFA-25 µg sPGN (○). In *B*, mice were immunized with IFA-400 µg iPGN (○). Mice were weighed and scored for clinical signs of EAE daily. Five animals were used for each group. Graphs show mean clinical scores of animals that developed EAE. d.i., Disease incidence.

MOG = Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

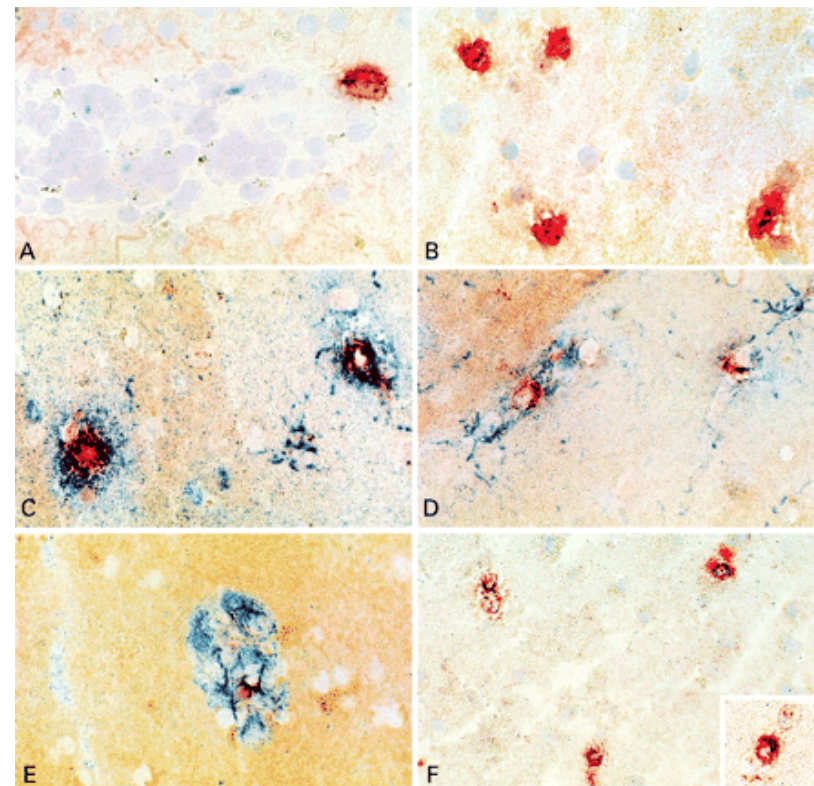
## Bacterial peptidoglycan and immune reactivity in the central nervous system in multiple sclerosis.

Ingrid A. Schrijver<sup>1</sup>, Marjan van Meurs<sup>1</sup>, Marie-JosÉ Melief<sup>1</sup>, C. Wim Ang<sup>1,2</sup>, Dragan Buljevac<sup>2</sup>, Rivka Ravid<sup>3</sup>, Maarten P. Hazenberg<sup>1</sup> and Jon D. Laman<sup>1</sup>

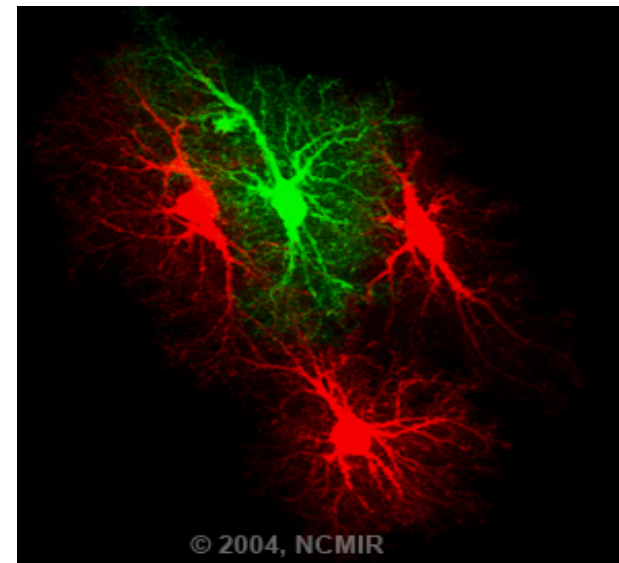
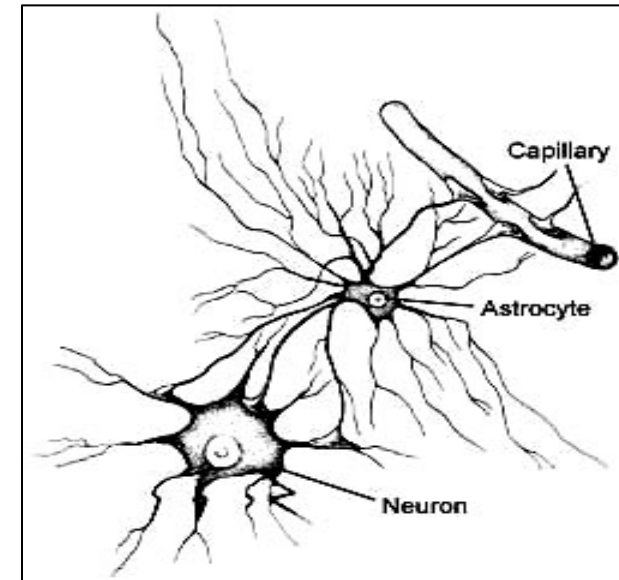
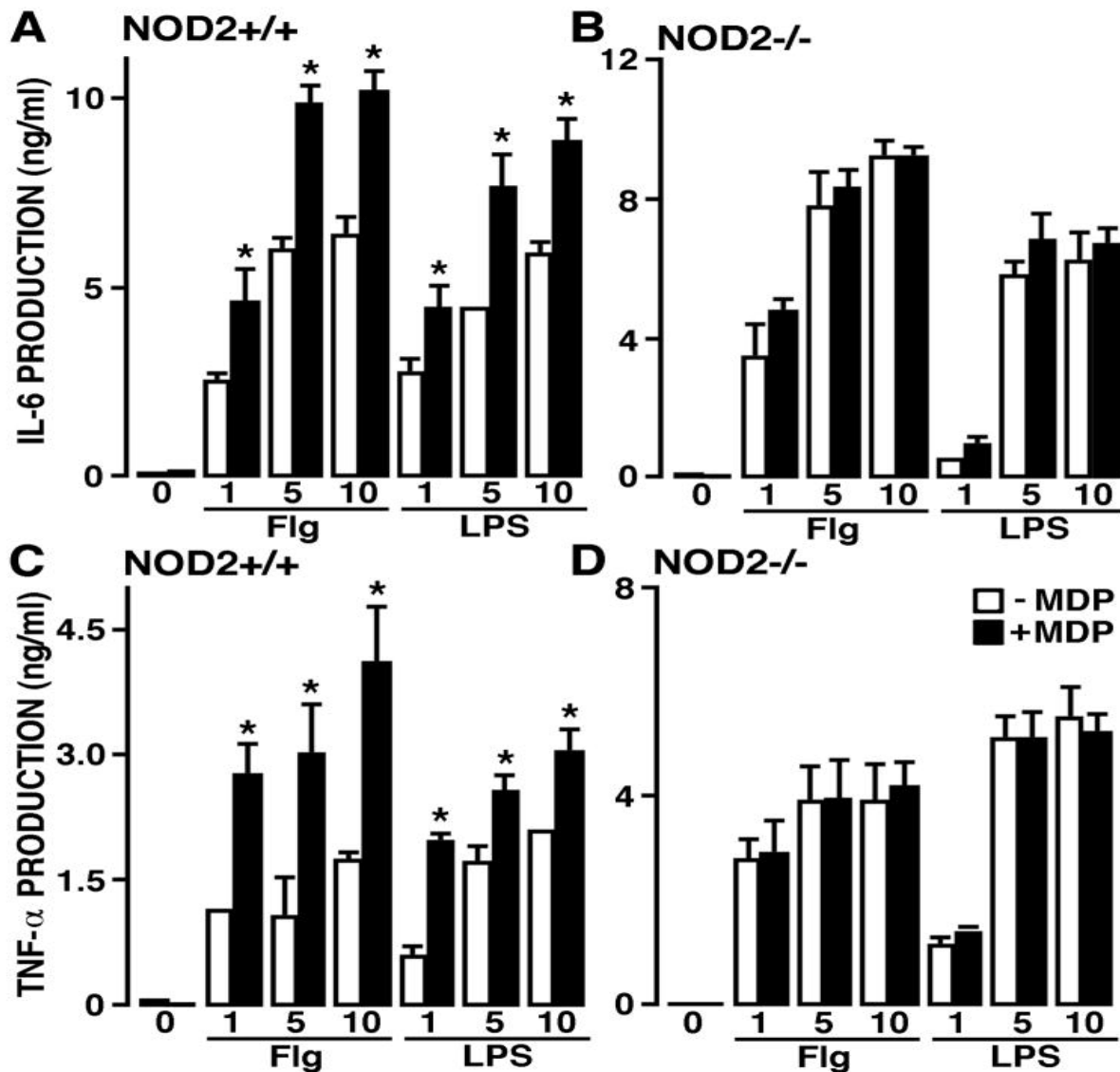


Peptidoglycan is present in brain white matter of multiple sclerosis patients. Immunohistochemistry was performed on brain tissue of 17 multiple sclerosis patients (MS) and 10 control subjects using Mab 2E9 raised against PG isolated from human faeces. The median (horizontal bar) of the number of positive cells was 82/100 mm<sup>2</sup> in multiple sclerosis patients compared with 12/100 mm<sup>2</sup> in the control subjects.

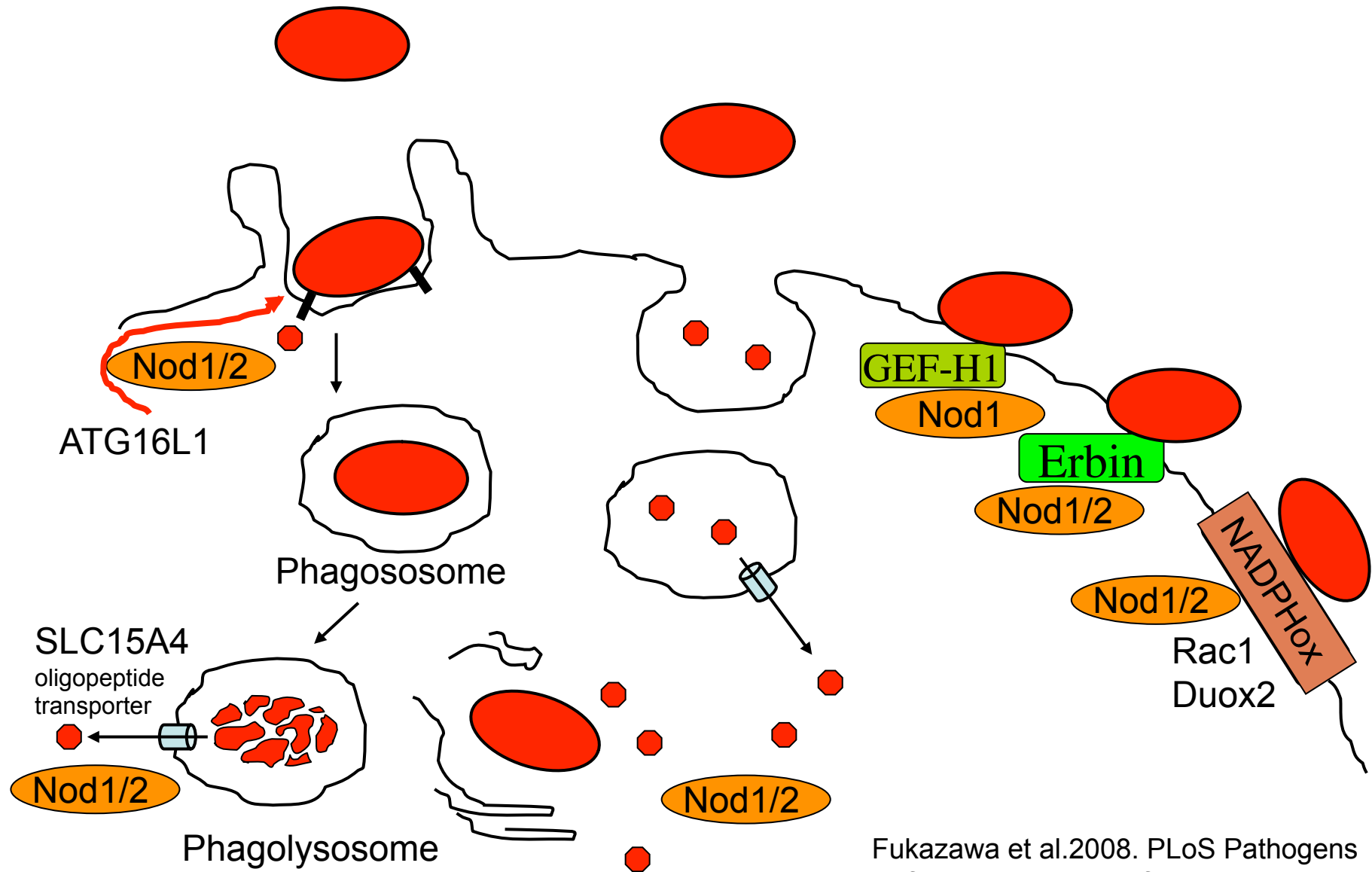
Peptidoglycan promotes immune reactivity in multiple sclerosis brain tissue. Peptidoglycan is present in the white matter of multiple sclerosis patients on the edge of infiltrates or active lesions (A), or distributed in normal appearing white matter (B). Co-expression was found with CD80 (C) and co-localization with other cells expressing IL-10 (D). Both co-expression and co-localization were found with TNF- $\alpha$ (E). Using biotin-labelled PG, antibody forming cells specific for PG could be detected in multiple sclerosis brain tissue (F + inset). Magnification: A,  $\times$ 630; F,  $\times$ 400; inset,  $\times$ 630.



**NOD2 plays an important role in the inflammatory responses of microglia and astrocytes to bacterial CNS pathogens.**  
 (Chauhan VS et coll. 2009. *Glia*, 57:414-423)



# Activation of Nod1/2 at cell membrane



Fukazawa et al. 2008. PLoS Pathogens  
Kufer T et al. 2006. Infect. Immun.  
Lipinski et al. 2009. J. Cell Science  
Lee et al. 2009. J. Biol. Chem.

**BT: Translocation en conditions pathologiques**

## **Mécanismes de lésion de la barrière intestinale:**

**La séquence hypoxie suivie de reperfusion est un élément majeur de la cytotoxicité épithéliale amenant BT.**

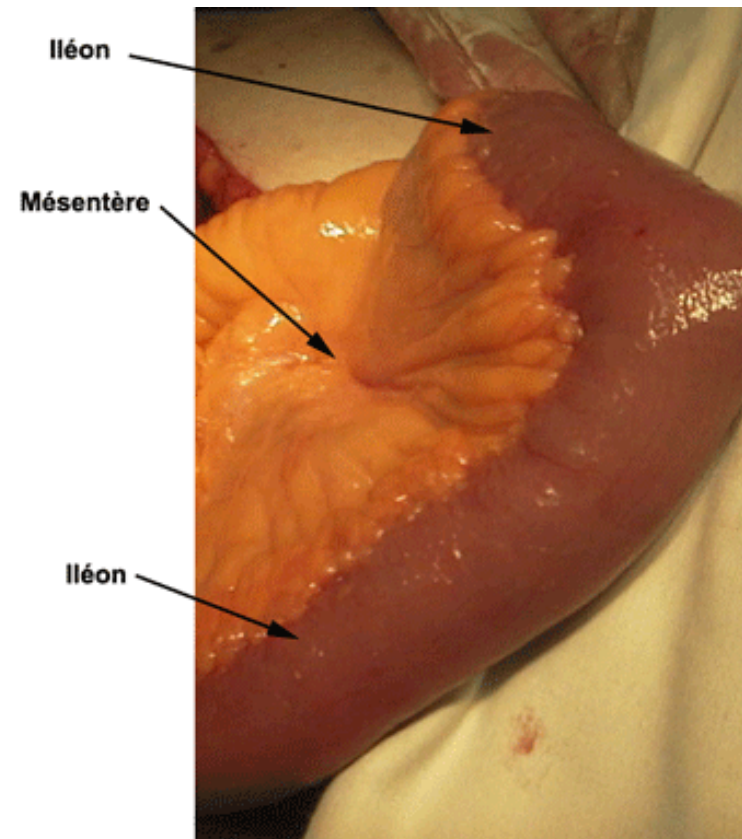
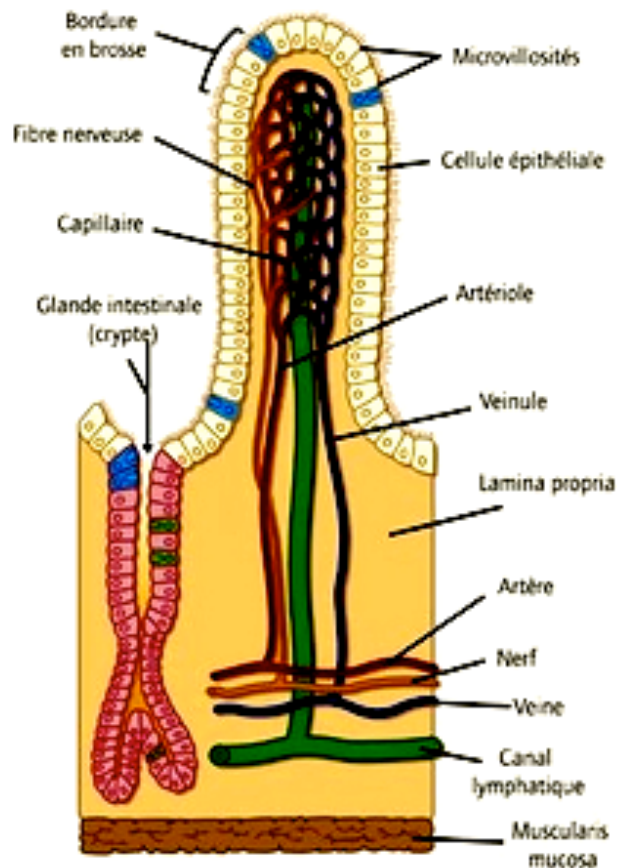
Survient dans différentes conditions: trauma, choc, lésions thermiques.

La tension en O<sub>2</sub> à l'extrémité des villosités intestinales est plus faible que dans le sang artériel, même dans des conditions physiologiques

Toute réduction du flux sanguin amène l'O<sub>2</sub> épithélial au dessous du seuil critique. L'acidose lactique épithéliale / muqueuse qui en est la conséquence entraîne une cytotoxicité responsable de la rupture de la barrière épithéliale.

Par ailleurs, la production de ROS secondaire à l'acidose entraîne aussi une augmentation de la perméabilité (Baumgart DC & Dignass AU. 2002. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 5:685-694)

Une perfusion sanguine adéquate est un élément crucial du maintien de la fonctionnalité de la barrière épithéliale intestinale et donc de la susceptibilité à BT (Wiest R & Rath HC. 2003. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 17:397-425)





## **Modèle en 3 étapes pour BT:**

(Deitch AE. 2002. Surgery, 131:241-244)

**Etape 1:** Hypoperfusion, ischémie et souffrance métabolique épithéliale.

**Etape 2:** Restauration du flux sanguin intestinal, libération consécutive de chimiokines proinflammatoires, Recrutement de polynucléaires neutrophiles dans la microcirculation, libération de cytokines proinflammatoires par cellules épithéliales, leucocytes et cellules du GALT

**Etape 3:** Perte de l'intégrité de la barrière intestinale permettant la translocation

Des bactéries, PAMP et molécules toxiques associées et exposant flore et tissus endommagés au système immunitaire.

La majorité des bactéries transloquées sont phagocytées, contribuant à l'accentuation de la réponse inflammatoire (cercle vicieux)

**Etape 4 ???:** Certaines des bactéries transloquées et PAMP associés sont drainés par le système lymphoïde vers

Les ganglions mésentériques (MLN), causant une inflammation loco-régionale et offrant une plate forme pour la dissémination systémique des bactéries.

**Rôle clé du MLN dans la protection ultime contre la dissémination !**

Dans des conditions physiologiques, même si des bactéries peuvent traverser la barrière épithéliale intestinale, elles doivent être détruites par les cellules phagocytaires avant de pouvoir atteindre la circulation

Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) et les phagocytes recrutés, jouent un rôle majeur dans le contrôle de BT. L'immunosuppression et l'insuffisance médullaire sont un autre facteur majeur Impliqué dans la survenue de BT (Baumgart DC & Dignass AU. 2002. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 5:685-694)

**Rôle central des ganglions mésentériques, dernière barrière avant la dissémination systémique**

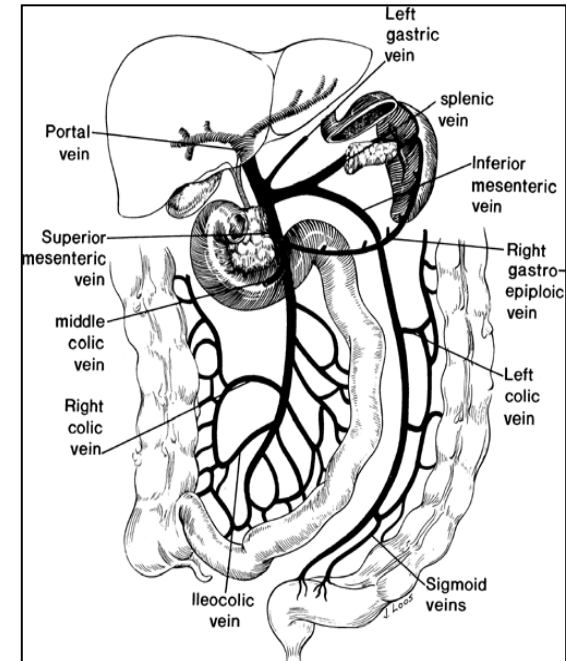
# Modes de dissémination post BT

## **Système veineux entérique se collectant dans la veine porte.**

Cultures de sang portal chez des patients polytraumatisés:

- 8/212 +
- Pas de valeur prédictive des cultures pour la survenue de syndrome de de dysfonctionnement multi-organes (MODS)
- Idem pour la présence d'endotoxine (Moore et al. J. 1991. Trauma, 31:629-638)

L'absence d'association entre la présence de bactérie et/ou d'endotoxine dans le sang portal Et la survenue de MODS indique l'existence d'une autre voie de dissémination succédant à BT.



## **Système lymphatique entérique et MLS.**

Les MLS semblent être le site essentiel de collecte des bactéries suivant leur translocation, impliquant le réseau lymphatique entérique comme trajectoire principale de dissémination après BT, commensaux / pathogènes (Deitch AE. 2002. Surgery, 131:241-244)

Dans une série de patients opérés pour infection abdominale, les complications septiques sont plus fréquentes chez ceux dont les MLS sont positifs et les bactéries responsables de septicémie / localisations secondaires sont essentiellement celles cultivées à partir des MLN (O'Boyle et al. 1998. Gut, 42:29-35)

