

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Faculté des Sciences Biologiques



Thèse
Présentée pour l'obtention du grade de Docteur
En : SCIENCES BIOLOGIQUES
Spécialité: Biotechnologie et Santé

Par M^{lle} Toumi Ryma

Sujet :

**Etude du Rôle de l'Interaction Microbiote /Muqueuse
Intestinale dans les Mécanismes Immuno-Inflammatoires Mis
en Jeu au Cours de la Pathogénèse et de l'Evolution des
Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin : Influence
sur les Thérapies Alternatives**

Soutenue publiquement, le 28/04/2016, devant le jury composé de:

M^{me} F. Laraba Djebari	Professeur à l'USTHB	Présidente
M^{me} C. Touil-Boukoffa	Professeur à l'USTHB	Directrice de thèse
M^{me} Y. Messai	Professeur à l'USTHB	Examinatrice
M^{me} H. Amroun-Mesbah	Professeur à l'USTHB	Examinatrice
Mr A. Biad	Professeur à la Fac. Méd. Alger 1	Examinateur
Mr R. Djidjik	Professeur à la Fac. Méd. Alger 1	Examinateur
M^{me} D. Mezioug	Maitre de conférences A à l'USTHB	Examinatrice

Résumé

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) regroupant la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont des affections caractérisées par une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal. Elles surviendraient chez des individus prédisposés génétiquement à la suite d'une perte de tolérance du système immunitaire intestinal muqueux vis-à-vis des antigènes du microbiote intestinal. Ce dernier est altéré chez les patients atteints de MICI. La manipulation du microbiote par les probiotiques constitue une approche thérapeutique alternative intéressante et prometteuse. Les probiotiques sont principalement des bactéries lactiques (lactobacilles et bifidobactéries) présentes naturellement dans le microbiote intestinal. Administrées en quantité adéquate, elles s'avèrent bénéfiques pour la santé de l'hôte.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle d'un cocktail de probiotiques (l'Ultrabiotique®) dans la modulation du microbiote intestinal et du système immunitaire muqueux. Nous avons ciblé son potentiel thérapeutique à travers l'étude de son rôle dans l'induction et le maintien de la phase de rémission au cours de la colite expérimentale induite par le Dextran Sulfate Sodium (DSS) chez les souris BALB/c. Nous avons exploré les mécanismes soutenant son rôle immuno-modulateur et de maintien de la barrière épithéliale intestinale. Nous nous sommes également intéressé au rôle des métabolites produits par les probiotiques dans la modulation de la production du NO par les PBMCs de patients atteints de MICI.

Les observations cliniques relatives aux symptômes de la colite révèlent l'instauration d'un effet bénéfique des probiotiques à travers l'induction et l'accélération de la phase de rémission. L'administration des probiotiques a vraisemblablement influencé la composition de microbiote et a modulé la réponse immunitaire. En effet, les probiotiques ont atténué la réponse pro-inflammatoire (diminution de l'expression du TLR-4, du NF- κ B, de la NOS-2, de l'IFN- γ , de l'IL-6 et du CCR-6) tout en favorisant la réponse immuno-régulatrice (TGF- β , FoxP3). Ces résultats sont en faveur de notre hypothèse selon laquelle les probiotiques utilisés dans notre étude contribuent à l'orientation de la réponse immunitaire pro-inflammatoire au cours de la colite vers un profil immuno-régulateur nécessaire à la résolution de l'inflammation. L'augmentation de l'expression de l'IL-22 et de l'IL-33 chez les souris traitées par les probiotiques contribue à la réparation tissulaire et à la reconstitution de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. Par ailleurs, la stimulation des PBMCs de patients atteints de MICI par les métabolites générés par les probiotiques (Ultrabiotique®, Ultralevure®) nous a permis de mettre en évidence leur rôle indirect dans la régulation de la production du NO.

Nos résultats dans leur ensemble mettent en exergue les effets thérapeutiques des probiotiques au cours de la colite et ouvrent des perspectives quant à leur utilisation dans la mise en place d'une stratégie thérapeutique alternative et complémentaire dans la prise en charge des MICI.

Mots clés/Abréviations : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin : **MICI** ; Dextran Sulfate Sodium : **DSS** ; **NOS-2** : NO Synthase2 ; microbiote intestinal, probiotiques, thérapies alternatives ; rémission ; Cytokines ; métabolite ; Ultrabiotique® ; Ultralevure®.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.

Mais n'est-ce pas faire preuve d'ingratitude que de ne pas avoir une pensée pour ce pays qui m'a vue naître et qui grâce à l'ensemble de ses institutions m'a permis de grandir, d'étudier et d'être la femme instruite que je suis aujourd'hui ?

*Je tiens à exprimer en premier, toute ma gratitude à ma directrice de thèse et chef de l'équipe « Cytokines et NO Synthases ; Immunité et pathogénie », Professeur **Chafia Touil-Boukoffa**. Les mots ne suffisent pas pour lui témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, de m'avoir guidée tout au long de ce travail. Merci pour la confiance que vous m'avez toujours témoignée, pour votre vision hors pair, vos conseils et encouragements. Vous faites partie des personnes qui ont marqué ma vie, j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme directrice de thèse et mentor.*

Je tiens à remercier vivement chacun des membres du jury :

*Mme le **Pr.LARABA-DJEBARI**, Doyenne de la FSB-USTHB et Directrice de l'équipe «Biochimie des biomolécules : mode d'action, immunothérapie », pour l'honneur qu'elle me fait en président ce jury.*

*Mr le **Pr. Biad**, Professeur à la faculté de médecine d'Alger et chef de service de médecine interne au CHU d'Ain Taya, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens également à le remercier vivement pour son étroite collaboration, ses conseils et son aide précieuse dans la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et ma sincère gratitude.*

*Mr le **Pr. Djidjik**, Professeur d'Immunologie et chef de service d'immunologie CHU Béni-Messous, d'avoir eu l'amabilité de consacrer son temps pour examiner ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.*

*Mme le **Pr.MESSAI**, membre de l'équipe « Génétique moléculaire », pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'avoir eu l'amabilité d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer le plaisir de la voir participer à mon jury.*

*Mme le **Pr. MESBAH-AMROUNE**, Membre de l'équipe « Cytokines et NO-Synthases », qui a bien voulu examiner ce travail. Je la remercie également pour l'intérêt qu'elle porte à notre travail et pour ses encouragements.*

Mme le **Dr. MEZIOUG**, Membre de l'équipe « Cytokines et NO-Synthases », pour avoir accepté d'examiner ce travail ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses encouragements.

Mes vifs remerciements s'adressent également au **Dr. SAOULA** du service de gastroentérologie- CHU Maillot pour son étroite collaboration.

Un travail de thèse est loin d'être un travail individuel, j'ai eu la chance de bénéficier du soutien de mon équipe « **Cytokine et NO Synthases ; Immunité et pathogénie** » et de la générosité des membres de la faculté de Biologie. Je tiens à les remercier vivement pour leur contribution. Je remercie particulièrement, **Imene, Sarah, Assia, Hayet, Houda, Mourad, Oussama et Djamila**.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tout **le personnel de l'animalerie** de la FSB-USTHB.

Mes sincères remerciements vont à tous **mes professeurs**, pour la qualité de l'enseignement qu'ils m'ont prodiguée au cours de ma graduation et de ma post-graduation.

Je ne pourrais terminer sans avoir une pensée pour **les patients et les volontaires sains** qui ont accepté de participer à cette étude.

*A toute ma famille et particulièrement :
ma mère et mon père, ce poète méconnu
ainsi que ceux que je ne nomme pas, mais qui se reconnaîtront*

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
--------------------	---

Partie I : Rappels Bibliographiques

Chapitre I : Interaction Microbiote -Muqueuseintestinale

I. L'épithélium intestinal	4
I.1Fonction de barrière de l'épithélium intestinal	5
I.2 Le système immunitaire intestinal	6
I.3 Reconnaissance des antigènes luminaux	9
I.3.1 Rôle des Toll Like Receptors (TLRs)	9
I.3.2 Compartimentation des TLRs	11
II. Le microbiote intestinal	12
II.1 Présentation du microbiote intestinal :	12
II.2 Rôle du microbiote intestinal	14
II.2.1 Fonction métabolique et physiologique.....	14
II.2.2 Fonction immunologique.....	14

Chapitre II : Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

I.Présentation des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	17
I.1 Classification clinique des MICI	17
I.1.1 La maladie de Crohn (MC)	17

I.1.2 La rectocolite hémorragique (RCH)	18
I.2 Symptomatologie et diagnostic des MICI	19
I.3 Epidémiologie des MICI.....	21
I.4 Etiologie des MICI.....	22
I.4.1 Facteurs génétiques.....	23
I.4.2 Facteurs environnementaux	25
I.4.3 Facteurs immunologiques et physiopathologie des MICI	26
I.4.4 Le microbiote intestinal dans les MICI.....	30
II. Les modèles expérimentaux de MICI	32
II.1. Les modèles de colites chimio-induites.....	32
II.1.1 La colite expérimentale induite par le Dextran Sulfate Sodium (DSS).....	32
II.1.2 La colite induite par un haptène : TNBS /Oxazolone.....	34
II.2 Modèles de colite spontanée.....	34
II.3 Modèles génétiques	35
II.4 Modèle de colite induite par transfert adoptif de cellules:	35
III. Traitements des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	36
III.1 Les dérivés aminosalicylés.....	36
III.2 Les corticoïdes	36
III.3 Les immunosuppresseurs	37
III.4 Les Biothérapies ciblées : Anticorps anti-TNF- α :	37
III.5 Les futures cibles thérapeutiques des MICI	38
III.6 Les thérapies alternatives/ complémentaires dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : pro, prébiotiques et symbiotiques	39
III.6.1 Les probiotiques	39
III.6.2 Les prébiotiques	40
III.6.3 Les symbiotiques	41
III.7 La transplantation de microbiote fécal (FMT).....	41

Chapitre III : Les probiotiques

I. Les probiotiques.....	42
I.1 Critères de sélection des bactéries d'intérêt probiotique	42
I.2 Renforcement de la barrière épithéliale intestinale et modulation du système immunitaire muqueux par les probiotiques.....	43

Partie II : Matériel et méthodes

I. Matériel.....	46
II. Méthodes	49
II.1 Description du modèle expérimental.....	49
II.1.1 Induction de la colite aigue par le Dextran Sulfate Sodium (DSS)	49
II.1.2 Administration des probiotiques.....	49
II.1.3 Les groupes expérimentaux :	50
II.1.4 Plasma.....	50
II.1.5 Récupération des organes	51
II.1.6 Culture des explants coliques des souris	52
II.1.7 Etude anatomopathologique	52
II.2 Analyse transcriptomique par la PCR en temps réel.....	55
II.3 Dosage plasmatique de l'IFN- γ et de l'IL-22.....	56
II.4 Préparation des surnageants de culture des probiotiques et induction des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)	56
II.4.1 Préparation des surnageants de culture des probiotiques	56
II.4.2 Récupération et induction des cellules mononuclées du sang périphérique	57
II.5 Dosages des nitrites résiduels dans le plasma et les surnageants de culture des explants coliques par la méthode de Griess modifié	57
II.6 Analyse statistique.....	58

Partie III : Résultats et discussion

Partie I : Effets de l'administration thérapeutique des probiotiques sur l'induction de la phase de rémission au cours de la colite expérimentale61

I.1 Etude de l'effet de l'administration thérapeutique des probiotiques (Ultrabiotique®) sur l'atténuation des symptômes cliniques de la colite61

I.2 Etude de l'effet des probiotiques sur la réparation des dommages tissulaires et sur le renforcement de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal64

I.2.1 Etude de l'effet thérapeutique des probiotiques sur les altérations macroscopiques du côlon64

I.2.2 Etude de l'effet thérapeutique des probiotiques sur les altérations microscopiques du côlon65

I.2.3 Etude de l'effet des probiotiques sur la production du mucus par les cellules caliciformes au cours de la colite expérimentale69

I.2.4 Etude de l'effet des probiotiques sur l'expression génique de l'IL-22, de son récepteur IL-22R et de l'IL-3371

I.3 Etude des propriétés immunomodulatrices des probiotiques sur la réponse immunitaire locale74

I.3.1 Effet des probiotiques sur l'expression du TLR-4 au niveau du côlon distal74

I.3.2 Etude de l'effet des probiotiques sur la voie de signalisation intracellulaire NF- κ B77

I.3.3 Etude de l'effet des probiotiques sur le système NOS-2/NO78

I.3.4 Etude de l'effet des probiotiques sur l'expression cytokinique au niveau du côlon distal des souris BALB/c83

I.4 Evaluation de l'effet de l'administration orale des probiotiques sur la réponse immunitaire systémique88

Partie II : Etude de l'effet immunomodulateur des probiotiques sur la production du monoxyde d'azote chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....92

II.1 Évaluation de la production *in vivo* du NO chez les sujets sains et les patients atteints de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH)92

II.2 Évaluation de la production *in vivo* de l'IL-22 chez les sujets sains et les patients atteints de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH) 93

II.3 Étude de l'effet des surnageants de culture des probiotiques sur la production *in vitro* du NO par les PBMCs chez des patients atteints de MICI95

Partie VI : Discussion générale

Partie I : Etude de l'effet de l'administration thérapeutique des probiotiques sur l'induction de la phase de rémission au cours de la colite expérimentale96

Partie II : Etude de l'effet immunomodulateur des probiotiques sur la production du monoxyde d'azote chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....110

Conclusion.....114

Références bibliographiques

Principales abréviations

– Nom de genre des Micro-organismes

B.	<i>Bifidobacterium</i>
E.	<i>Escherichia</i>
L.	<i>Lactobacillus</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
St.	<i>Streptococcus</i>

– Unité de mesure

°C :	Degré Celsius
cm, mm, µm	Centimètre, millimètre, micromètre
g, mg, µg, pg	Gramme, milligramme, microgramme, picogramme
h	Heure
l, ml, µl	Litre, millilitre, microlitre
kDa	Kilo-Dalton
mM, µM	Millimolaire, micromolaire
rpm	Rotation par minute
U	Unité
UI	Unité internationale
UFC	Unité formant colonies
w/V	Weight/Volume

– Autres abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGCC	Acide gras à chaîne courte
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messager
ARNr	Acide Ribonucléique Ribosomique
ASCA	Anticorps anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATB	Antibiotiques
ATG16L1	Autophagy-related protein 16-1
BFS	Bactéries Filamenteuses Segmentées
BHIB	Brain-Heart Infusion Broth
CARD	Caspase recruitment domain containing protein
CD	Cluster differentiation
CEIs	Cellules épithéliales intestinales
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CI	Colite indéterminée
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CRP	C-reactive protein
D.O	Densité optique
DAI	Disease Activity Index
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DC	Cellule dendritique
DMEM	Dubelco's Modified Eagle's Medium
DSS	Dextran Sulfate Sodium
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
Foxp3	Forhead box protein P3
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
GRAS	Generally Regarded As Safe
GWAS	Genome-wide-association-studies
HCL	Acide chlorhydrique
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
Ikk	Nuclear factor κ B inhibitor complex
IL	Interleukine
ILC	Innate Lymphoid Cell
IRF1	Interferon regulatory factor1
IRGM	Immunity-related GTPase M
IκB	Protéine inhibitrice des κ B
J	Jour
Jak	Janus kinase
KO	Knock out
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocytes T
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MC	La maladie de Crohn
MDP	Muramyl –dipeptide
MICI	Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MLN	Mesenteric Lymph Nodes
MUC	Mucine
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
NLR	NOD-like receptors
NO	Monoxyde d'azote
NOD	Nucleotide oligomerization Domain2
NOS-2/iNOS	NO Synthase inductible
ns	Non significatif
OMS	Organisation mondiale pour la santé
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
pANCA	Anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
PARRγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PBS	Phosphate buffer saline
PGN	Peptidoglycane
pH	Potentiel d'Hydrogène

PM	Poids moléculaire
Pro	Probiotiques
PRRs	Pattern recognition receptors
R	Récepteur
RCH	La rectocolite hémorragique
ROR	Retinoid- related ophran receptor
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCID	Severe combined immunodeficiency
ssp	Sous espèce
STAT	Singal transducer activator of transcription
SVF	Sérum de veau foetal
T reg	Lymphocytes T régulateurs
TFF3	Trefoil factor 3
TGF-β	Tumor growth factor β
Th	Lymphocytes T helper
TLR	Toll-like receptor
TNBS	Trinitro benzene sulfonic acid
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
UHT	Ultra Haute Température

Liste des figures

Figure 1:	Types cellulaires présents dans une villosité intestinale dessinée en coupe longitudinale	5
Figure 2:	Le système immunitaire associé à la muqueuse intestinale	8
Figure 3:	Rôle des cellules lymphoïdes innées (ILCs) dans le maintien de l'homéostasie intestinale	8
Figure 4:	Localisation, ligands et voies de signalisation des TLRs	10
Figure 5:	Compartimentation des TLRs	11
Figure 6:	Répartition des différentes espèces bactériennes dans le tube digestif	13
Figure 7:	Caractéristiques anatomo-histo-pathologiques de la RCH et de la MC	19
Figure 8:	Les facteurs de risque incriminés dans les MICI	22
Figure 9:	Chronologie de la mise en évidence des gènes de susceptibilité aux MICI	25
Figure 10:	Mécanismes immunopathologiques incriminés dans la maladie de Crohn	29
Figure 11:	Mécanismes immunopathologiques incriminés dans la rectocolite hémorragique	29
Figure 12:	Les différentes cibles thérapeutiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....	39
Figure13:	Rôle des probiotiques dans le maintien de l'homéostasie intestinale	45
Figure 14:	Schéma illustrant le déroulement des différentes phases de la mise au point modèle expérimental	51
Figure 15:	Démarche expérimentale suivie dans l'étude de l'effet thérapeutique des probiotiques au cours de la colite expérimentale induite par le DSS.....	59
Figure 16 :	Démarche expérimentale suivie dans l'étude de l'effet des surnageants de culture de l'Ultrabiotique® et de l'Ultralevure® sur la production du NO par les PBMC de patients atteints de MICI.....	60
Figure 17:	Effet des probiotiques sur l'amélioration des symptômes cliniques chez les souris BALB/c.	63
Figure 18:	Effet des probiotiques sur les altérations macroscopiques du côlon.	65
Figure 19:	Score de l'analyse histologique du côlon	66
Figure 20 :	Photomicrographies représentatives de la Structure histologique du côlon. ...	68
Figure 21 :	Photomicrographies représentatives de la production du mucus au niveau du côlon distal.....	70

Figure 22:	Expression relative de l'ARNm de l'IL-22 (A) et de son récepteur IL-22R (B) au niveau du côlon distal.....	72
Figure23:	Expression relative de l'ARNm du récepteur IL-33 au niveau du côlon distal	73
Figure 24:	Expression relative de l'ARNm du TLR-4 au niveau du côlon distal.....	75
Figure 25:	Etude de l'expression <i>in situ</i> du TLR-4 au niveau du côlon distal	76
Figure 26:	Etude de l'expression du NF-κB au niveau du côlon.....	78
Figure 27:	Expression relative de l'ARNm de la NOS-2 au niveau du côlon distal	80
Figure 28:	Etude de l'expression <i>in situ</i> de la NOS-2 au niveau du côlon	81
Figure 29:	Effet des probiotiques sur la production <i>ex vivo</i> du NO au niveau des explants coliques	83
Figure 30:	Expression relative de l'ARNm de l'IL-6 au niveau du côlon distal	85
Figure31:	Expression relative de l'ARNm du TGF-β au niveau du côlon distal	85
Figure 32:	Expression relative de l'ARNm du CCR-6 au niveau du côlon distal	86
Figure33:	Expression relative de l'ARNm du Foxp3 au niveau du côlon distal	87
Figure 34:	Poids relatif de la rate chez les différents groupes expérimentaux	89
Figure 35:	Effet des probiotiques sur la production <i>in vivo</i> du NO	91
Figure 36:	Effet des probiotiques sur la production <i>in vivo</i> de l'IFN-γ	91
Figure37:	Taux de nitrites résiduel dans le plasma des patients atteints de la MC et de la RCH	94
Figure 38:	Taux de l'IL-22 dans le plasma des patients atteints de la MC et de la RCH.	94
Figure 39:	Etude de l'effet du surnageant de culture des l'Ultrabiotique® (sPro) (A) et l'Ultralevure® (B) sur la production <i>in vitro</i> du NO par les PBMCs de patients atteints de la maladie de Crohn.....	97
Figure40:	Etude de l'effet du surnageant de culture des l'Ultrabiotique® (sPro) (A) et de l'Ultralevure® (B) sur la production <i>in vitro</i> du NO par les PBMCs de patients atteints de la Rectocolite hémorragique	97
Figure41:	Schéma récapitulatif, proposé pour illustrer le rôle immuno-modulateur des probiotiques au cours de la colite expérimentale.	113

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux critères de sélection des probiotiques	43
Tableau 2: Caractéristiques cliniques des patients et des témoins	47
Tableau 3: Calcul de l'indice d'activité de la maladie (DAI).	50
Tableau 4: Caractéristiques des différents groupes expérimentaux	50
Tableau 5: Calcul du score histologique.....	53
Tableau 6: Liste des amorces.....	55

Introduction

Introduction

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) regroupant la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont des maladies invalidantes caractérisées par une inflammation gastro-intestinale chronique et récurrente survenant généralement chez le sujet jeune (Podolsky, 2002 ; Calop *et al.*, 2008). La MC et la RCH sont des pathologies cliniquement distinctes. Toutefois, elles ont en commun une étiologie complexe qui repose sur l'implication de plusieurs facteurs génétiques, environnementaux et immunitaires (Kaser *et al.*, 2010; Actis, 2016).

Sur un terrain génétique de prédisposition, les MICI surviendraient à la suite d'une perte de tolérance du système immunitaire intestinal muqueux vis-à-vis des micro-organismes du microbiote intestinal (Kaser *et al.*, 2010 ; Cario 2012). Ce dernier, constitue un écosystème actif intervenant dans la physiologie intestinale et la maturation du système immunitaire muqueux. Lorsque l'équilibre normal du microbiote est perturbé, état qualifié de dysbiose, une dérégulation du système immunitaire est alors engagée. La dysbiose intestinale survenant dans les MICI est marquée par une augmentation des entérobactéries potentiellement pro-inflammatoires et une diminution des bifidobactéries et des lactobacilles (Swidsinskiet *al.*, 2005).

Le dysfonctionnement de la réponse immunitaire innée et de la réponse immunitaire adaptative dans les MICI conduit à une dérégulation de la balance physiologique entre les lymphocytes T de type Treg/TH1, TH2 et TH17 (Sarra *et al.*, 2010 ; Powrie, 2012). Il en résulte un infiltrat cellulaire intestinal dense et riche en lymphocytes, en macrophages et en neutrophiles, à l'origine de la libération des médiateurs de l'inflammation, tels que les cytokines, les molécules chimiotactiques, les radicaux libres oxygénés et le monoxyde d'azote (NO). Ces médiateurs agissent de concert pour déclencher et perpétuer une réponse inflammatoire chronique au niveau de l'intestin (Zhang *et al.*, 1999 ; Reimund *et al.*, 1996).

Présentement, il n'existe pas de traitement curatif pour les MICI. Les thérapies indiquées sont symptomatiques et ciblent principalement l'atténuation de la réponse immunitaire. Ces thérapies ne sont pas toujours efficaces et sont souvent accompagnées par des effets secondaires. Actuellement, la recherche de nouvelles voies thérapeutiques alternatives qui

ciblent non seulement la réponse immunitaire dérégulée mais également la dysbiose caractérisant les MICI suscite beaucoup d'intérêt. Comme les probiotiques répondent à ces critères, ils ont émergé comme une stratégie thérapeutique alternative potentielle. Les probiotiques telles que les bactéries lactiques (lactobacilles et bifidobactéries) sont, par définition, des micro-organismes vivants appartenant au microbiote intestinal. Lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ils sont bénéfiques pour la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2001). Les données expérimentales disponibles portant sur les effets bénéfiques des probiotiques laissent entrevoir des perspectives prometteuses dans la prévention et / ou l'atténuation de la réponse immunitaire. Leur utilisation dans le traitement des MICI vise à rétablir l'équilibre du microbiote intestinal, à réduire l'inflammation chronique caractérisant ces maladies et à maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale.

Les travaux antérieurs de notre équipe ont permis de démontrer le rôle bénéfique d'un cocktail de probiotiques (Ultrabiotique®) composé de quatre souches bactériennes vivantes: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve* au cours de la colite expérimentale induite par le Dextran Sulfate Sodium (DSS). Sur la base de ces données, nous nous sommes intéressés dans notre étude, à l'élucidation des mécanismes à l'origine de leurs propriétés anti-inflammatoires et immuno-régulatrices.

La première partie de la présente étude a porté sur l'exploration du potentiel thérapeutique de l'Ultrabiotique® dans l'induction et le maintien de la phase de rémission d'une colite expérimentale induite par le DSS chez la souris BALB/c. Pour ce faire, nous avons exploré les mécanismes soutenant le rôle immuno-modulateur de ces probiotiques sur la réponse inflammatoire locale et systémique à travers :

- L'étude de la voie de signalisation TLR-4/NF- κ B ;
- L'étude de l'expression de la NOS-2 à l'échelle locale et de la production de l'IFN- γ et du monoxyde d'azote (NO) à l'échelle systémique.
- L'étude de l'effet des probiotiques sur l'expression locale des cytokines (IL-6, TGF- β) de la chimiokine CCR-6 et du facteur de transcription marqueur des Treg, FoxP3.

Nous avons également été amenés à explorer les mécanismes impliqués dans le maintien de l'intégrité et la reconstitution de l'épithélium intestinal par les probiotiques en ciblant l'expression des cytokines IL-22 et IL-33.

Dans la seconde partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets des métabolites générés par les probiotiques sur la modulation de la NOS-2 *in vitro* chez les patients atteints de MICI.

Partie I : Rappels bibliographiques

- Interaction microbiote-muqueuse intestinale
- Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin ;
- Les probiotiques.

Chapitre I :
Interaction microbiote-muqueuse
intestinale

I.L'épithélium intestinal :

L'épithélium intestinal s'étend sur une surface de plus de 300m² qui est en contact direct avec le milieu extérieur. Il est constitué de plusieurs cellules dotées de propriétés d'absorption ou de sécrétion: *Les cellules épithéliales intestinales(CEIs) ou entérocytes* représentant 80% de la population cellulaire totale. Ces cellules sont hautement polarisées. Elles présentent une face apicale munie d'une bordure en brosse qui assure l'absorption des nutriments et une face basolatérale qui forme des jonctions avec les cellules adjacentes; *les cellules caliciformes (cellules de Goblet)* sécrétrices de mucus dont le nombre augmente au niveau du côlon (environ 15%); *les cellules neuroendocrines* sécrétrices d'hormones et *les cellules de Paneth* qui sont fonctionnellement similaires aux neutrophiles. Elles secrètent des peptides antimicrobiens telles que les α et β defensines (Ayabe *et al.*, 2000). Récemment, un autre type de cellules sécrétrices a été décrit. Il s'agit des *cellules « Tuft »* caractérisées par une bordure en brosse particulièrement développée (Figure 1) (Gerbe *et al.*, 2012; Carulli *et al.*, 2014).

Au niveau des plaques de Peyer l'épithélium contient un autre type cellulaire, les *cellules M* (Microfold Cell). Ces dernières assurent le passage de l'information antigénique vers les follicules lymphoïdes sous jacents (Jung *et al.*,2010).

L'épithélium intestinal est organisé en deux compartiments morphologiquement et fonctionnellement distincts: les cryptes de Lieberkühn qui constituent une zone de prolifération et les villosités qui forment une zone de différenciation. Au niveau du tiers inférieur des cryptes se trouvent des cellules souches ainsi que des cellules progénitrices en cours de prolifération qui assurent une régénération rapide des cellules épithéliales intestinales (tous les 4 à 5 jours chez l'homme). Contrairement aux autres types cellulaires qui migrent jusqu'à l'axe crypto-villositaire, les cellules de *Paneth* se différencient plus lentement (tous les 20 jours) et restent localisées à la base des cryptes (Figure 1) (Potten, 1998 ; Carulli *et al.*, 2014).

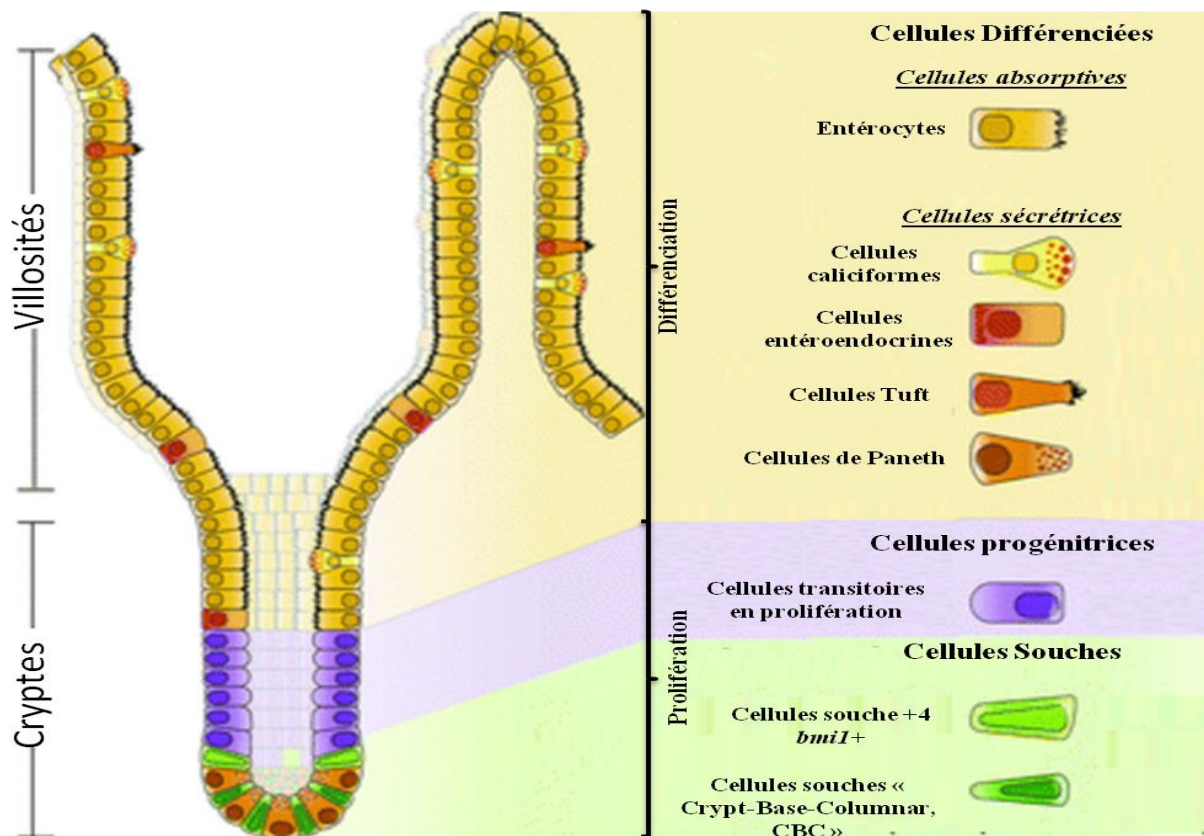


Figure1:Types cellulaires présents dans une villosité intestinale dessinée en coupe longitudinale (Carulli *et al.*, 2014).

I.1 Fonction de barrière de l'épithélium intestinal:

Le rôle principal de l'épithélium intestinal consiste à filtrer le passage des molécules et des nutriments depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation générale mais également à assurer une fonction de barrière qui empêche le passage des micro-organismes, des toxines et des antigènes luminaux. Cette fonction est assurée par quatre niveaux de défense :

- *La barrière mécanique* : cette barrière est représentée par les mouvements péristaltiques de l'intestin qui empêchent l'adhérence et la prolifération des bactéries au niveau de la muqueuse intestinale (Nieuwenhuijs *et al.* 1998).
- *La barrière écologique* : elle correspond au microbiote intestinal qui joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Il empêche la colonisation de l'intestin par les bactéries pathogènes.

- *La barrière physique* : elle est formée par les cellules épithéliales intestinales (CEIs) qui constituent une barrière contre l'invasion des tissus par les micro-organismes. Les CEIs sont connectées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes qui contrôlent les propriétés de perméabilité sélective de l'intestin. Cette perméabilité peut être transcellulaire permettant le passage de l'eau, des molécules solubles et des molécules de haut poids moléculaire à travers la cellule épithéliale ou paracellulaire permettant le passage des molécules de faible poids moléculaire à travers l'espace intracellulaire (Groschwitz et Hogan, 2009). De plus, l'épithélium est recouvert par une couche de mucus qui renferme des peptides antimicrobiens et des bactériocines sécrétés par les cellules de Paneth et les bactéries commensales. Ces molécules antimicrobiennes empêchent la prolifération et la croissance des micro-organismes pathogènes (Bevins et Salzman, 2011).
- *La barrière immunologique* : elle est principalement formée par le tissu lymphoïde associé à la muqueuse ou GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) qui doit répondre aux micro-organismes pathogènes sans induire pour autant une réponse immunitaire locale contre les bactéries commensales. Cet état « d'ignorance » envers le microbiote intestinal est qualifié de tolérance orale (Sekirov *et al.*, 2010).

I.2 Le système immunitaire intestinal:

Le système lymphoïde associé à l'intestin ou « *Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT* » représente le plus grand système immunitaire de l'organisme. Il peut être subdivisé en sites inducteurs et en sites effecteurs reliés entre eux par le système lymphatique. Le site inducteur est formé par des tissus lymphoïdes organisés sous forme de ganglions lymphatiques mésentériques (MLN, mesenteric lymph nodes), de crypto-plaques situés à la base des cryptes responsables de la génération des lymphocytes intra-épithéliaux (IELs), de plaques de Peyer et de follicules lymphoïdes isolés. En revanche, le site effecteur est diffus. Il est constitué de lymphocytes intra-épithéliaux (IELs) et d'une lamina propria riche en cellules immunocompétentes, notamment les plasmocytes sécréteurs d'IgA (Figure 2) (Abreu, 2010 ; Brown *et al.*, 2013).

Le GALT contient plus de 80% des cellules immunitaires de l'organisme. Il abrite un nombre important de cellules lymphoïdes innées (ILC, Innate Lymphoid Cell). Ces cellules jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale en induisant une réponse immunitaire dirigée contre les antigènes pathogènes, en limitant la réponse inflammatoire contre les bactéries commensales et en favorisant la réparation des dommages tissulaires. Il existe plusieurs sous-types de cellules lymphoïdes innées (ILC1, ILC2 et ILC3), classés selon le profil de sécrétion cytokinique (Figure 3). En effet, les cellules ILC1 secrètent de l'IFN- γ et du TNF- α . Les cellules ILC2 produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 ; elles induisent la production du mucus par les cellules caliciformes. Enfin, la sous population ILC3 produit de l'IL-22 et de l'IL-17 qui contribuent à la protection de la muqueuse intestinale. Les cellules ILC3 limitent la colonisation de l'intestin par les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) qui régulent positivement la différenciation des cellules TH17 pro-inflammatoires. L'IL-22 sécrétée par ces cellules protège l'intégrité de la barrière épithéliale en induisant la production de peptides antimicrobiens et en limitant le risque de dissémination des bactéries commensales. Cette cytokine joue également un rôle majeur dans la réparation de l'épithélium intestinal en cas de lésions tissulaires (Sonnenberg, 2014).

Les CEIs jouent également un rôle clé dans l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles remplissent une fonction de cellule présentatrice d'antigène grâce à l'expression des molécules du CMH I et II à leur surface (Christ et Blumberg, 1997). Elles expriment également des récepteurs pour de nombreuses chimiokines (CXCR4, CCR5, CCR6, CCL20) et produisent de nombreuses cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-15, IL-17, IFN- γ et TNF- α). De plus, grâce à l'expression du récepteur des IgA dimériques au niveau du pôle basal, les CEIs permettent leur translocation de la lamina propria vers la lumière intestinale sous forme d'IgA sécrétoires (Sartor, 2007). Par ailleurs, les cellules dendritiques présentes dans le côlon, ont pour fonction l'échantillonnage des antigènes de la lumière intestinale grâce aux prolongements de leurs dendrites. À l'état physiologique et en absence d'agents pathogènes invasifs, elles induisent la différenciation des lymphocytes T vers un profil T régulateur (Treg). En outre, elles stimulent la sécrétion des IgA par les lymphocytes B (Wells *et al.*, 2011 ; Abraham et Medzhitov, 2011).

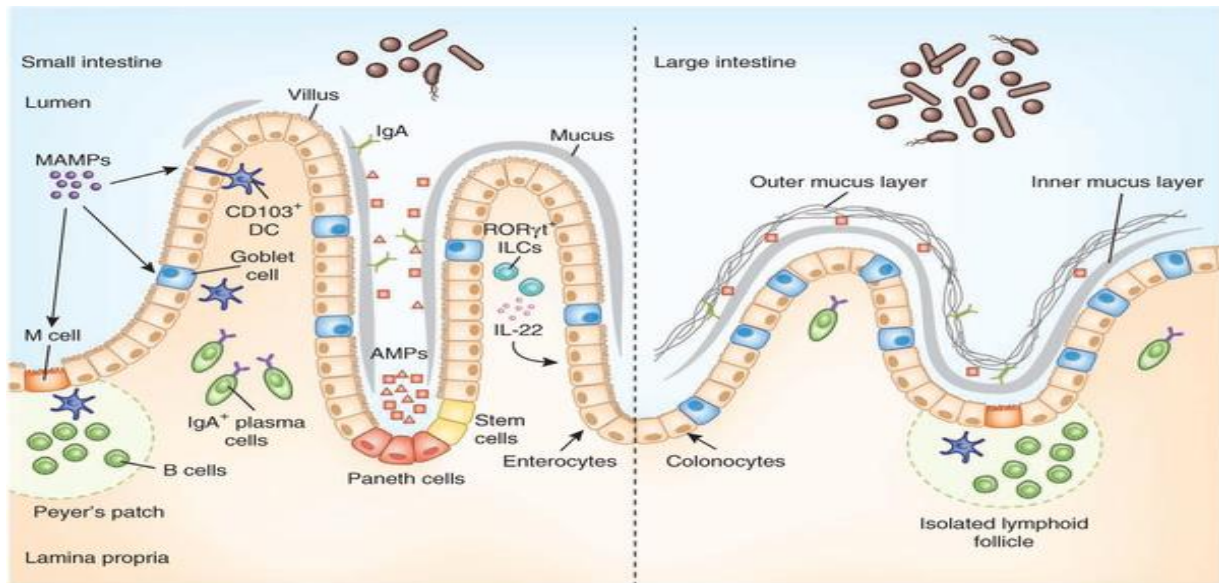


Figure 2: Le système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (Brown *et al.*, 2013). Les entérocytes forment une barrière qui sépare le système immunitaire muqueux de la lumière intestinale. Les cellules dendritiques (DCs) reconnaissent les antigènes bactériens (MAMPs : Motifs moléculaires associés aux microbes). Elles induisent une réponse immunitaire tolérante vis-à-vis des bactéries du microbiote intestinal. Les cellules immunitaires sécrètent des immunoglobulines (IgA) et des cytokines (IL-22) nécessaires à la protection de l'épithélium contre l'invasion par les bactéries potentiellement pathogènes. (AMPs : Peptides anti microbiens ; ILCs : Cellules lymphoïdes innées).

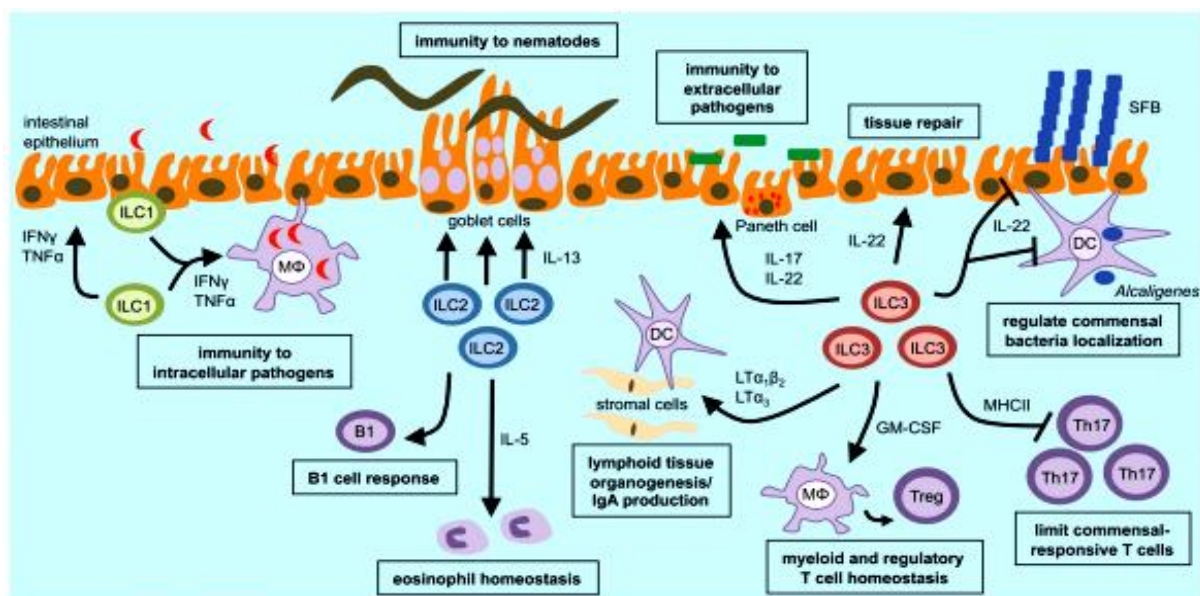


Figure 3: Rôle des cellules lymphoïdes innées (ILCs) dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Sonnenberg *et al.*, 2014). (MΦ : macrophages ; SFB : bactéries filamenteuses segmentées)

I.3 Reconnaissance des antigènes luminaux :

Les cellules épithéliales intestinales (CEIs) ainsi que les cellules présentatrices d'antigènes tels que les cellules dendritiques (CDs) et les macrophages expriment des récepteurs membranaires et cytoplasmiques, les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ces récepteurs reconnaissent des structures communes à des groupes de microorganismes commensaux et pathogènes qui sont restés constants au cours de l'évolution, les PAMPs « Pathogen Associated Molecular Pattern ». Ils reconnaissent également des signaux de danger endogènes, les DAPMs « Damage Associated Molecular Pattern » libérés par les tissus endommagés. Les principaux PRRs exprimés par les CEIs sont les récepteurs TLRs et les NODs. Leur activation déclenche non seulement les voies de signalisation qui aboutissent à la sécrétion de différents médiateurs inflammatoires impliqués dans la défense de l'hôte et l'immunité innée mais contribue également au développement d'une réponse immunitaire adaptative (Kumar *et al.*, 2009 ; Cerf-Bensussan et Gaboriau-Routhiau, 2010).

I.3.1 Role des Toll Like Receptors (TLRs):

Les TLR figurent parmi les récepteurs PRRs les mieux étudiés. Il existe 11 TLRs chez l'homme et 13 chez la souris. Ce sont des glycoprotéines membranaires de type 1 ; les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 11 sont localisés à la surface cellulaire et reconnaissent principalement les composants membranaires des micro-organismes, tandis que les récepteurs TLR3,7,8 et 9 sont localisés dans les compartiments intracellulaires et détectent les acides nucléiques. Les TLRs représentent l'une des premières et plus importantes lignes de défense contre les agents pathogènes bactériens, fongiques, parasitaires ou viraux qui peuvent nuire à l'organisme. Les principaux PAMPs reconnus par les TLRs sont : la flagelline, le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane (PGN), l'acide lipotechoïque (LTA), les lipopeptides di- ou tri-acylés, l'ADN contenant des motifs CpG non-méthylés, l'ARN simple-brin (sbARN), ou double-brin (dbARN) (Figure 4) (Takeda et Akira, 2004).

La liaison des TLRs avec leurs ligands induit leur dimérisation et le recrutement au niveau de leur domaine intra-cytoplasmique « TIR » des molécules adaptatrices nécessaires à la transduction du signal. Les cascades de signalisation induites par les TLRs peuvent être

dépendantes ou non de la protéine adaptatrice MyD88. Elles mènent généralement à l'activation de deux familles de facteurs de transcription : le Nuclear Factor kappaB (NF- κ B) et des membres de la famille des Interféron (IFN) Regulatory Factors (IRFs) (Yang et Seki, 2012). Le NF- κ B se trouve dans la cellule sous forme inactive et cytoplasmique. Il est associé à des protéines inhibitrices « I κ B » qui empêchent sa translocation dans le noyau. L'activation du NF- κ B nécessite l'activation des kinases spécifiques Ikk (I κ B kinases) qui phosphorylent la sous unité I κ B. La phosphorylation de cette dernière conduit à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome 26S présent dans le cytoplasme. La translocation nucléaire du facteur NF- κ B entraîne la transcription des gènes modulant l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, et le TNF- α (Figure 4) (Kawai et Akira, 2010).

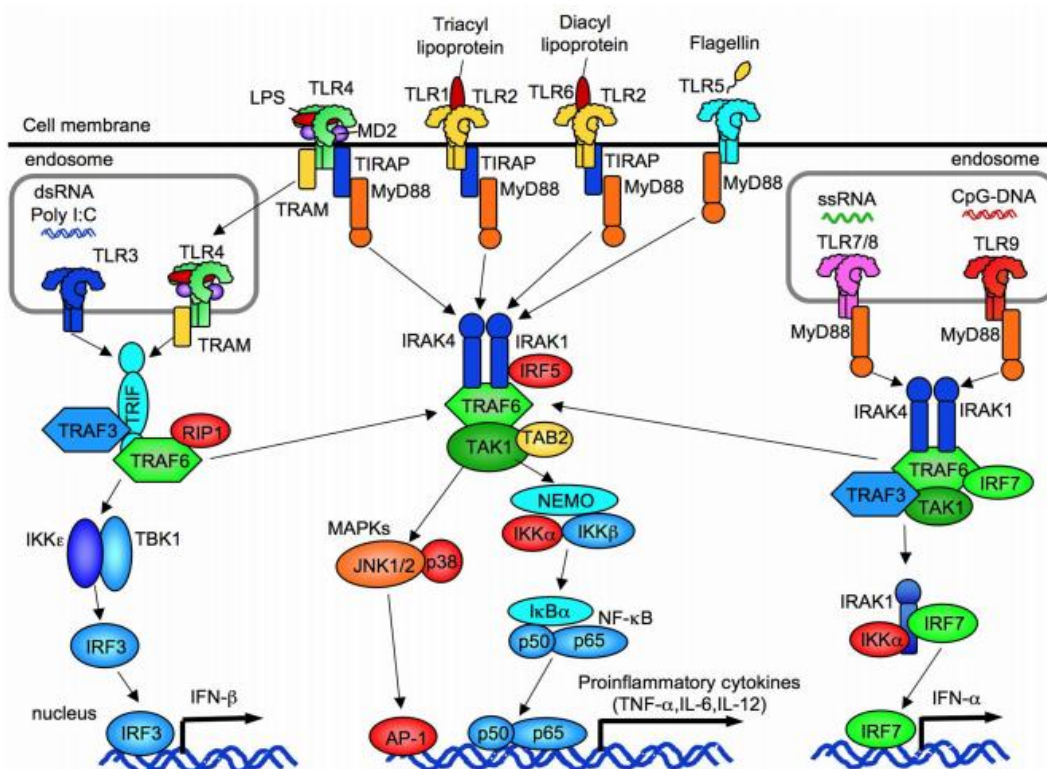


Figure 4: Localisation, ligands et voies de signalisation des TLRs (Yang et Seki, 2012). Différentes réponses immunitaires peuvent être induites par les TLRs et ce, en fonction du ligand et des molécules adaptatrices recrutées pour transmettre le signal cellulaire. Les molécules adaptatrices sont: MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), TRIF (TIR domain-containing adaptator inducing IFN β), TIRAP/Mal (TIR domain containing adaptator protein/MyD88 adaptator-like protein) et TRAM (TRIF-related adaptator molecule).

I.3.2 Compartimentation des TLRs :

La répartition des TLRs au niveau des cellules joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Cette répartition dépend du type cellulaire et de l'état stationnaire ou activé du système immunitaire. Ainsi, afin de préserver un état de tolérance vis-à-vis des bactéries commensales tout en restant très réactives aux bactéries pathogènes, les CEIs présentent une compartimentation des TLRs adaptée à cet effet. En effet, contrairement aux cellules présentatrices d'antigènes caractérisées par un niveau d'expression élevé et ubiquitaire des TLRs, les cellules épithéliales montrent un faible niveau d'expression de ces récepteurs au niveau de leur pôle apical (Figure 5) (Yu et Gao, 2015). Cette faible expression, notamment celle du TLR-4 et du TLR-2, serait due à leur polarisation intrinsèque aux surfaces basolatérales où leur activation par les bactéries franchissant la barrière épithéliale induit une réponse immunitaire pro-inflammatoire (Abreu *et al.*, 2010). En outre, il a été démontré que la compartimentation du TLR-5 au niveau du pôle basolatéral est primordiale à la détection des bactéries flagellées et le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace contre ces bactéries invasives et souvent très pathogènes (Rhee *et al.*, 2005). De la même manière, la stimulation du TLR-9 au niveau basolatéral induit une forte réaction pro-inflammatoire via l'activation du facteur NF- κ B, alors que, sa stimulation au niveau apical régule négativement la réponse pro-inflammatoire en inhibant l'activation du NF- κ B (Lee *et al.*, 2006).

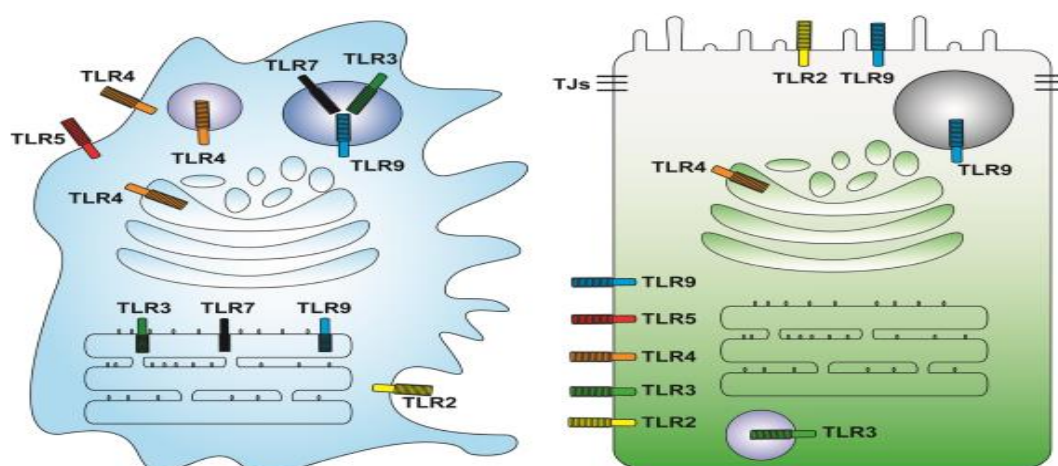


Figure 5 : Compartimentation des TLRs (Yu et Gao 2015). A) Cellule immunitaire non polarisée ; B) cellule épithéliale polarisée. (Tjs : Tight Junctions).

II. Le microbiote intestinal

II.1 Présentation du microbiote intestinal :

Anciennement appelé flore digestive, le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, archées, levures) qui colonisent notre tube digestif. Il est constitué de cent mille milliards de germes et plus de mille espèces différentes. La communauté bactérienne qui colonise le tractus gastro-intestinal est composée essentiellement de bactéries Gram positif et près de 95 % de bactéries anaérobies strictes. La majorité de ces bactéries sont non cultivables, ce qui rend impossible leur identification avec les techniques fondées sur les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques (Eckburg *et al.*, 2005).

Le microbiote intestinal s'acquiert à la naissance ; les bactéries qui colonisent le tractus intestinal stérile du nouveau né proviendraient essentiellement de la flore maternelle vaginale (lactobacilles) et fécale (entérobactéries et bifidobactéries) ainsi que de l'environnement immédiat où prédominent des bactéries aérobies-anaérobies facultatives (Staphylocoques, Entérocoques et Entérobactéries). La prolifération de ces bactéries s'accompagne d'une diminution du taux d'oxygène dans le milieu qui permet aux bactéries anaérobies strictes de s'implanter (Firmicutes, Bifidobacteries et Bacteroides). Vers l'âge de deux ans, la composition du microbiote intestinal se stabilise et une association symbiotique s'installe avec l'hôte. La composition du microbiote reste néanmoins dynamique. En effet, de nombreux facteurs influencent son installation et son évolution comme le mode d'accouchement, le type d'alimentation, la prise d'antibiotiques et le statut immunologique de l'hôte (Eckburg *et al.*, 2005 ; Goulet, 2009).

L'avènement de la biologie moléculaire a permis une meilleure caractérisation du microbiote intestinal. Ainsi, le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), présent dans l'ensemble des espèces bactériennes a révélé la présence de quatre phyla majoritaires dans le tractus intestinal : Firmicutes, Bacteroides, Actinobacteria, et Proteobacteria. Au sein de ces phylums, six genres bactériens sont retrouvés chez tous les individus: *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides* et *Bifidobacterium*. Les bactéries du microbiote intestinal appartiennent majoritairement au

phylum *Firmicutes* (64%) qui se compose des genres : *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus* et *Lactobacillus* (Eckburg *et al.*, 2005 ;Lagier *et al.*, 2012).

La charge microbiologique totale dans l'intestin est de 10^{13} – 10^{14} micro-organismes, soit dix fois plus que le nombre de cellules de l'organisme. Quant à leur méta-génome, il est cent fois plus important que le génome humain (Gill *et al.*, 2006). La répartition du microbiote varie le long du tractus gastro-intestinal. En effet, la concentration augmente de l'intestin grêle au côlon. Cette variation topographique correspond à des niches écologiques spécifiques à chaque niveau de l'intestin où le pH, les sécrétions gastriques et la présence de sites d'adhésion influencent la colonisation et l'installation de la flore commensale (Figure 6) (Wisnewsky *et al.*, 2012). Il existe également une variation transversale de la microflore entre la lumière et la muqueuse intestinale (Salminen *et al.*, 1998 ; Sekirov *et al.*, 2010).

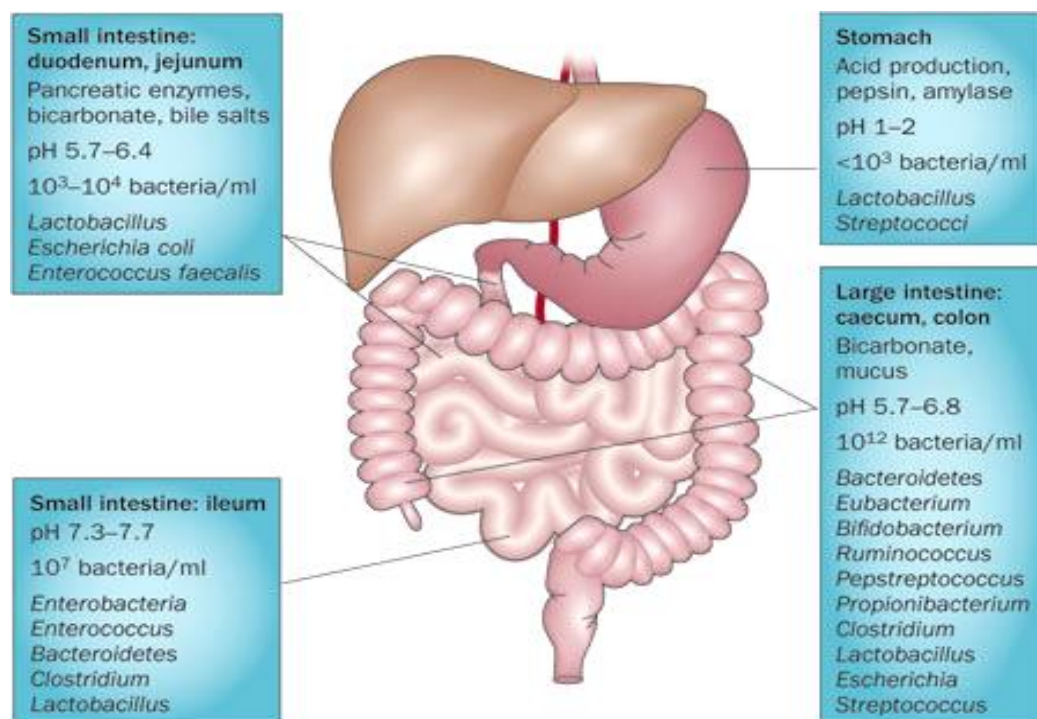


Figure 6:Répartition des différentes espèces bactériennes dans le tube digestif (Wisnewsky *et al.*, 2012).

II.2 Rôle du microbiote intestinal :

II.2.1 Fonction métabolique et physiologique :

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions métaboliques, trophiques et protectrices essentielles à l'organisme. Au niveau du coecum et du côlon proximal principalement, les bactéries commensales fournissent de nombreuses enzymes qui contribuent à la dégradation des aliments non digestibles. Il en résulte la production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) : acétate, propionate et butyrate ainsi que des gaz : H₂, CO₂ et CH₄. Le butyrate exerce un effet trophique majeur sur l'épithélium intestinal. En effet, il est impliqué dans la régulation de la prolifération, différenciation et apoptose des cellules épithéliales. Il exerce également un rôle immuno-modulateur important au maintien de la tolérance immunitaire. Par ailleurs, les bactéries commensales participent à la transformation des xénobiotiques, la production des vitamines (B12, B6, B9, K) et le métabolisme hépatique des lipides (Salminen *et al.*, 1998 ; Guarner, 2006 ; Giorgetti *et al.*, 2015).

L'influence du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte ne se limite pas uniquement au tractus intestinal. En effet, de nombreuses études expérimentales ont permis de mettre en évidence la capacité des bactéries commensales à produire des neurotransmetteurs et à réguler négativement le comportement anxieux et le stress chez les souris confirmant ainsi la présence d'un axe « Intestin-Cerveau » (Sudo *et al.*, 2004). De plus, une association entre l'autisme et certaines espèces bactériennes (*Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Sutterella* et *Bactéroides fragilis*) ou leurs métabolites (l'acide propionique et l'indole) a été rapportée (Rhee *et al.*, 2009 ; Midtvedt, 2012).

II.2.2 Fonction immunologique:

Au cours de l'évolution, un dialogue croisé ou « Cross-talk » s'est établi entre l'épithélium intestinal, le système immunitaire muqueux et le microbiote intestinal. Ce dernier contribue au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale à travers de nombreux mécanismes telles que : la compétition pour les éléments nutritifs, l'activation de la sécrétion des IgA et la production de facteurs antibactériens. Le microbiote forme ainsi une couche protectrice contre l'adhérence des pathogènes à l'épithélium intestinal.

De même que certaines bactéries dont les lactobacilles stimulent la synthèse de mucines par les cellules caliciformes renforçant ainsi l'intégrité de la barrière épithéliale (Daliri *et al.*, 2015).

Par ailleurs, des études réalisées sur des souris axéniques (nées et élevées en condition stérile stricte et exemptes de tout micro-organisme) ont permis de mettre en évidence le rôle crucial du microbiote intestinal dans la maturation et le développement du système immunitaire muqueux (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009). En effet, les souris axéniques montrent de nombreuses anomalies au niveau de leur système immunitaire : un nombre réduit de plaques de Peyer, une diminution du nombre des plasmocytes sécréteurs d'IgA, de lymphocytes Treg producteurs de TGF- β et d'IL-10 et de lymphocytes intraépithéliaux (IELs) (Macpherson et Harri, 2004). En périphérie, les organes lymphoïdes secondaires de ces souris (rate et ganglions lymphatiques) présentent des zones lymphocytaires atrophiées. Cependant, la colonisation du tractus gastro-intestinal de ces souris axéniques par des bactéries commensales ou encore l'administration orale de ligands des TLRs conduit en quelques semaines, à la restauration de leur système immunitaire muqueux (Abraham et Medzhitov, 2011). En effet, il a été démontré que l'activation du TLR-2 par un polysaccharide purifié à partir de la bactérie commensale *Bacteroides fragilis* permet de rétablir les compartiments lymphoïdes périphériques chez les souris axéniques (Mazmanian *et al.*, 2005). Par ailleurs, les bactéries de la flore endogène jouent un rôle déterminant dans la polarisation des sous populations lymphocytaires TH1, TH2 et le maintien de l'équilibre entre les cellules TH17 et Treg (Chow et Mazmanian., 2009).

Les bactéries commensales inhibent également la production de cytokines pro-inflammatoires par les CEIs en interférant avec la voie d'activation du facteur NF- κ B (Heyman et Ménard, 2002). En outre, le butyrate issu de la fermentation des polysaccharides exerce de nombreux effets anti-inflammatoires à travers l'inhibition de l'expression du facteur de transcription NF- κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α) au niveau du chorion (Segain *et al.*, 2000). Par ailleurs, la stimulation des CEIs par les bactéries commensales induit la libération de cytokines tels que le TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) et le TGF- β qui contribuent au conditionnement des cellules dendritiques vers un profil tolérogène (Zeuthen *et al.*, 2007 ; Abraham et Medzhitov, 2011).

Lorsque l'équilibre normal du microbiote est perturbé, état qualifié de dysbiose, une dérégulation du système immunitaire est alors observée. Cette dérégulation peut entraîner l'apparition de certaines pathologies telles que les allergies et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Guarner, 2006; Cerf-Bensussan et Gaboriau-Routhiau, 2010).

Chapitre II : Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

I- Présentation des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) sont des affections caractérisées par une inflammation chronique de la paroi du tractus gastro-intestinal. Elles évoluent par phases de poussées entrecoupées de phases de rémission et aboutissent souvent à des complications digestives et extradiigestives (Podolsky, 2002 ; Calop *et al.*, 2008). Ces maladies touchent le plus souvent les sujets jeunes mais peuvent survenir à tout âge. Les patients atteints de MICI sont exposés à un risque élevé de cancer colorectal (Xi et Itzkowitz, 2008).

Les MICI se présentent principalement sous deux formes : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) (Figure 7A). Ces deux affections partagent une base physiopathologique commune, une présentation clinique similaire mais se différencient par la localisation anatomique et l'aspect histologique des lésions au niveau de l'intestin (Beck, 2003 ; Xavier et Podolsky, 2007). Lorsque le diagnostic ne permet pas la distinction entre une MC et une RCH, la colite est dite indéterminée (CI). Elle représente environ 10% des cas de MICI qui peuvent évoluer dans le temps vers une RCH ou une MC (Guindi et Riddell, 2004).

L'origine des MICI demeure à ce jour ambiguë. Elle fait intervenir des facteurs environnementaux, des susceptibilités génétiques, une altération du microbiote intestinal et une dérégulation de la réponse immunitaire (Kaser *et al.*, 2010; Dalal et Chang, 2014).

I.1. Classification clinique des MICI :

I.1.1 La maladie de Crohn (MC) :

La maladie de Crohn fut observée pour la première fois par le chirurgien allemand, Wilhelm Fabry en 1623 puis décrite officiellement par le gastro-entérologue Burrill Crohn en 1932 qui lui a donné son nom (Crohn *et al.*, 1932). Cette maladie est caractérisée par une inflammation transpariétale qui peut toucher tout le tube digestif de manière successive ou simultanée, avec une atteinte iléale ou iléo-colique droite plus fréquente (Figure 8A).

Les lésions observées dans la MC sont habituellement segmentaires, asymétriques et séparées par des zones saines (Figure 7B). Le diagnostic histologique est porté après la mise en évidence d'un infiltrat inflammatoire lympho-plasmocytaire, d'une hyperplasie lymphoïde transmurale et de la présence de granulomes épithéloïdes (Figure 7C). La couche de mucus est rarement altérée (Geboes, 2003). Par ailleurs, la MC est une maladie progressive qui peut présenter des complications sévères comme l'apparition de sténoses et de fistules (Baumgart et Sandborn, 2007).

I.1.2 La rectocolite hémorragique (RCH) :

La colite ulcéreuse ou rectocolite hémorragique fut différenciée de la dysenterie bactérienne par Samuel Wilks en 1859 (Wilks, 1859) puis elle a été décrite par Arthur Hurst en 1931 (Hurst, 1931). La RCH est caractérisée par des ulcérations superficielles et hémorragiques qui apparaissent de manière continue le long de la muqueuse colique (Figure 7B). En fonction de l'étendue de l'atteinte colique, la RCH est classée en trois types qui sont : la proctite (colite limitée au rectum), la colite distale (colite affectant le côté gauche du côlon) et la pancolite (colite affectant l'ensemble du côlon). Par ailleurs, une autre forme de RCH plus sévère mais plus rare peut survenir chez certains patients ; c'est la colite fulminante (Geboes, 2003; Baumgart et Sandborn, 2007). D'un point de vue histologique, la RCH est caractérisée par un infiltrat inflammatoire hétérogène limité à la muqueuse et la sous muqueuse, des cryptites et des abcès cryptiques (Figure 7C). Contrairement à la MC, la couche du mucus est altérée dans la RCH (Appleman, 2008 ; Larsson *et al.*, 2011). Les complications digestives dans la RCH sont nombreuses ; l'apparition d'un mégacôlon toxique constitue une complication grave qui peut survenir lors d'une poussée aigüe (Evans, 2000).

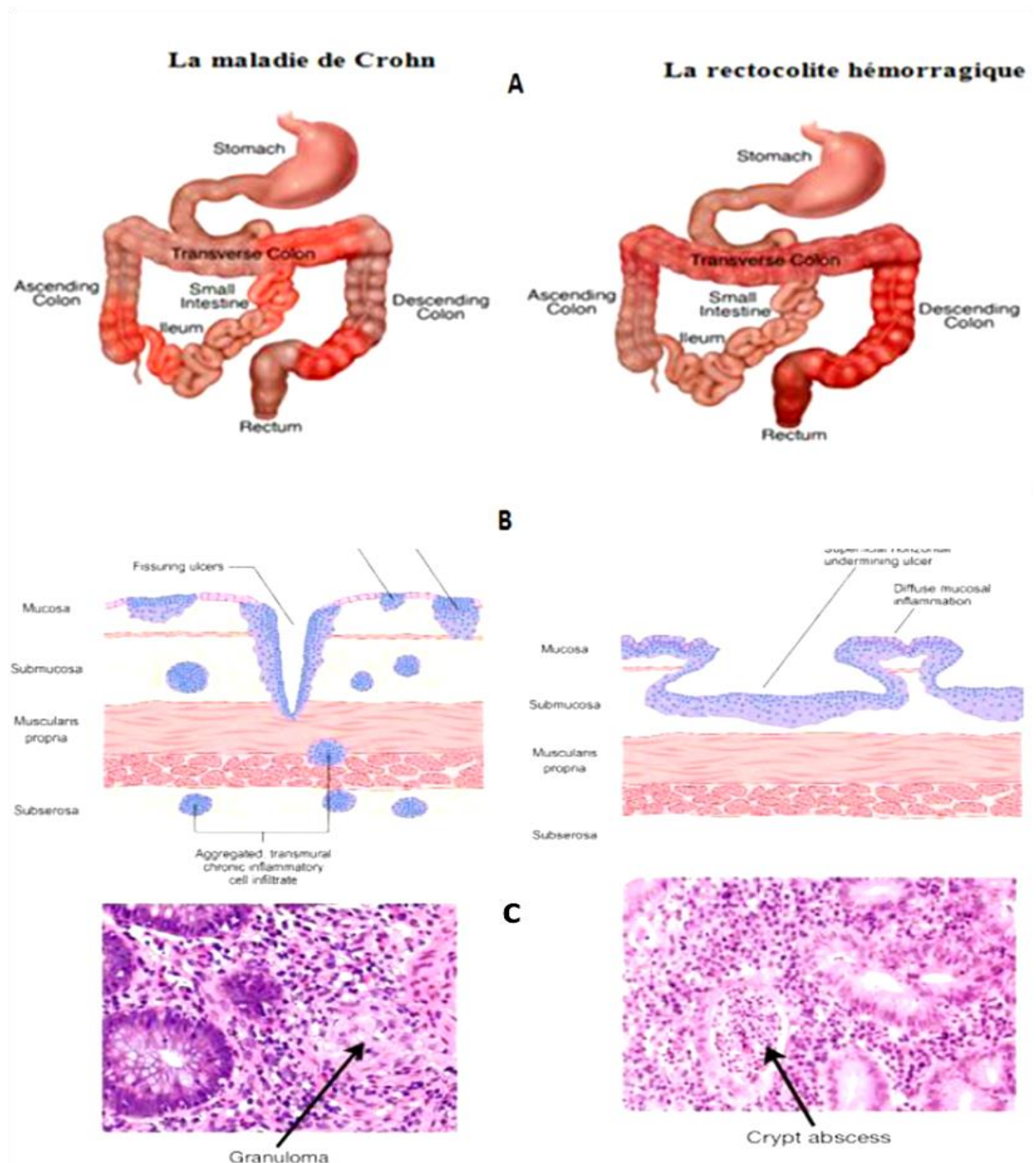


Figure 7: Caractéristiques anatomo-histo-pathologiques de la RCH et de la MC (Modifiée d'après: Grabsch, 2013 ; John Hopkins Medicine Institution, Xavier et Podolsky, 2007) (A): Localisation anatomique des lésions au niveau du Côlon. (B) : Caractéristiques des lésions au niveau de la paroi colique (C) : Aspect histologique de la RCH et de la MC.

I.2 Symptomatologie et diagnostic des MICI :

Les principaux symptômes évocateurs des MICI sont: les diarrhées, les douleurs abdominales associées à des ténésmes (besoins urgents d'aller à la selle), fatigue, fièvre et

amaigrissement. La RCH entraîne souvent des diarrhées chroniques avec émissions glairo-sanglantes chez le patient (Weil et Batteux, 2003).

De nombreuses manifestations extra-digestives sont également associés aux MICI, les plus fréquemment observées sont : les atteintes articulaires (Arthrites, arthralgies), cutanéomuqueuses (Erythème noueux, ulcération buccales), oculaires (uvéites) (Lamoril *et al.*, 2007) et hépatobiliaires (la cholangite sclérosante primitive « CSP »). Elles peuvent apparaître avant ou en même temps que les manifestations digestives, constituant parfois de véritables maladies associées aux MICI (Weil et Batteux, 2003).

Le diagnostic des MICI est un diagnostic d'exclusion qui est dans la majeure partie des cas, porté lors de la première poussée sur des arguments essentiellement cliniques (manifestations digestives et antécédents familiaux). Toutefois, il ne peut être établi qu'en présence d'arguments endoscopiques, radiologiques, histologiques et sérologiques. Des analyses bactériologiques et parasitologiques des selles à la recherche de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia*, *Shigella*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Giardia lamblia* et *Entamoeba histolytica* sont également nécessaires pour écarter toute origine infectieuse (Hendrickson *et al.*, 2002).

Les marqueurs sérologiques ASCA (anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae*) et pANCA (anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles) sont d'une aide précieuse au diagnostic différentiel entre la MC et la RCH. Cependant, ils ont de nombreuses limitations, en particulier leur sensibilité modérée. D'autres marqueurs sérologiques tels que le taux d'hémoglobine, la numération des leucocytes, l'élévation de la vitesse de sédimentation et de la CRP, ainsi qu'une hypoalbuminémie (Farahet *et al.*, 1999) sont également utiles pour confirmer l'impression clinique de la sévérité de la maladie et pour suivre l'évolution clinique de la poussée sévère.

Par ailleurs, des marqueurs fécaux telle que la calprotectine fécale (CF) dérivant des neutrophiles constitue un bio marqueur fécal fiable. Elle est utilisée notamment pour la distinction entre les atteintes organiques (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) et les atteintes fonctionnelles (syndrome de l'intestin irritable) (Van Rheenen *et al.*, 2010).

I.3 Epidémiologie des MICI :

L'incidence des MICI varie considérablement dans le monde en raison de leur caractère multifactoriel. Elle se situe entre 0.1-16/100000 habitants pour la MC et entre 0.5-24.5/100000 habitants pour la RCH. Les données épidémiologiques disponibles montrent une forte incidence des MICI dans les pays industrialisés suivant un gradient géographique Nord–Sud décroissant. En effet, l'Amérique du nord, la Grande Bretagne et le nord de l'Europe, présentent l'incidence et la prévalence les plus élevées. Toutefois, des variations ethniques et raciales au sein de ces pays ont pu être constatées. En effet, Il semblerait que l'incidence des MICI soit plus élevée dans les populations blanches et juives Ashkénazes que dans d'autres groupes suggérant l'existence d'une prédisposition génétique à ces maladies (Lakatos, 2006, Cosnes *et al.*, 2011).

Au cours des 50 dernières années, l'incidence et la prévalence des MICI semblent être en augmentation dans pratiquement toutes les régions du monde. Le gradient Nord-Sud tend alors à diminuer. Ces données reflètent l'impact de l'industrialisation et la mondialisation dans la progression des MICI (Molodecky *et al.*, 2012). En effet, l'amélioration des conditions d'hygiène, la diminution des maladies infectieuses et des helminthiases dans les pays en voie de développement corréleront positivement avec l'augmentation de l'incidence des MICI dans ces pays. Ces observations sont en faveur de « l'hypothèse de l'hygiène » selon laquelle, l'augmentation du statut socio-économique et du niveau d'hygiène contribuent au développement des MICI (Molodecky et Kaplan, 2010 ; Actis, 2016).

En Algérie, les données répertoriées par Pr Boucekkine entre 1980 et 1998 dans la région centre et par le Dr Hammada entre 2003 et 2007 dans la région Est indiquent que les MICI sont des maladies émergentes et classent l'Algérie parmi les pays à moyenne incidence (Hammada *et al.*, 2011).

Les MICI surviennent généralement chez le sujet jeune avec un pic d'occurrence qui se situe entre 15 et 30ans. Un second pic d'occurrence entre 60 et 70 ans est également observé. Les MICI touchent aussi bien les hommes que les femmes. Cependant, le sexe

ratio est légèrement en faveur des femmes dans la MC. Au contraire, dans la RCH une légère prédominance masculine est observée (Cosnes *et al.*, 2011).

I.4 Etiologie des MICI :

Les MICI sont des affections à étiologie complexe. L'hétérogénéité des données épidémiologiques et des manifestations cliniques plaide en faveur d'une étiologie multifactorielle impliquant des facteurs génétiques, environnementaux et immunitaires (Figure8). Plusieurs hypothèses ont été rapportées en vue de l'élucidation des mécanismes à l'origine de l'inflammation chronique caractéristique de ces affections. Une de ces hypothèses soutient qu'une rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes de la flore endogène serait à l'origine de l'activation anormale du système immunitaire chez des individus génétiquement prédisposés (Kaser *et al.*, 2010 ; Cario 2012 ; Neurath, 2014).

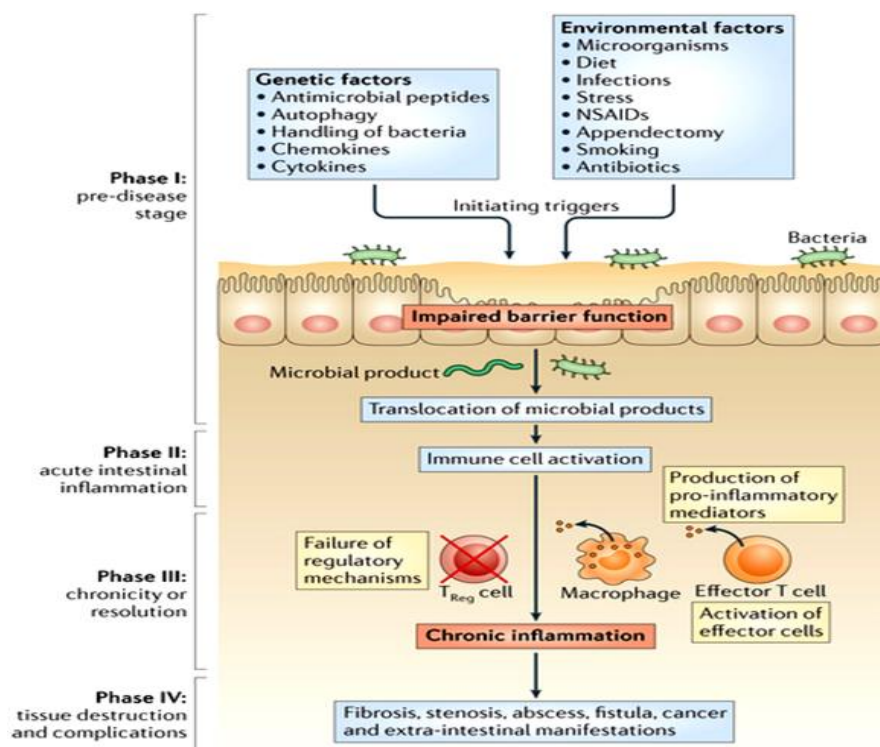


Figure 8: Les facteurs de risque incriminés dans les MICI(Neurath, 2014). Certains facteurs génétiques et environnementaux, induisent l'altération de la barrière épithéliale intestinale favorisant la translocation bactérienne et l'activation soutenue du système immunitaire muqueux. Cette activation est caractérisée par une dérégulation de la balance physiologique entre les lymphocytes T effecteurs et T régulateurs (Treg).

I.4.1 Facteurs génétiques:

La part génétique dans l'étiologie des MICI est très importante. Elle repose principalement sur la présence d'une concordance phénotypique plus élevée chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes (Matricon *et al.*, 2010). Elle est d'autant plus soutenue par les études d'agrégation familiale qui révèlent que plus de 20% des patients atteints de MICI présentent un antécédent familial. Cette prédisposition reste toutefois moins claire pour la RCH que pour la MC (Moller *et al.*, 2015).

En 2001, les études portant sur les liaisons génétiques ont conduit à l'identification du premier gène de prédisposition aux MICI et plus particulièrement à la MC, le gène NOD2/CARD15 (Hugot *et al.*, 2001 ; Ogura *et al.*, 2001). Cette découverte a également permis de mettre en exergue l'implication de la réponse immunitaire innée dans la physiopathologie des MICI (Figure 10). En effet, le gène NOD2 /CARD15 est majoritairement exprimé par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales. Il code pour une protéine cytoplasmique NOD2 qui fait partie de la famille des récepteurs NLRs (NOD-like receptor). La protéine NOD2 reconnaît le motif MDP (Muramyl-Dipeptide) dérivé des peptidoglycanes (PGN) de la paroi bactérienne des bactéries commensales et de certains micro-organismes pathogènes. Elle module la réponse immunitaire innée, notamment à travers la stimulation de la production de substances antibactériennes telles que les α -défensines par les cellules de Paneth (Wehkamp *et al.*, 2005). Elle induit également l'autophagie ; un processus impliqué dans la clairance des bactéries intracellulaires (Cooney *et al.*, 2010 ; Boukercha, 2015).

Trois mutations majeures du gène NOD2 ont été décrites dans la population caucasienne. Ces mutations affectent l'habilité du système immunitaire inné à reconnaître le composant bactérien MDP et à initier une réponse immunitaire adéquate. La réponse immunitaire innée devient alors défaillante vis-à-vis des antigènes commensaux favorisant alors l'apparition d'une réponse immunitaire adaptative (Watanabe *et al.*, 2004). Des études récentes portant sur l'analyse des polymorphismes du gène NOD2 dans la population algérienne ont révélé la présence de ces mutations chez les patients atteints de MICI (Meddour *et al.*, 2014 ; Boukercha *et al.*, 2015).

Les études de criblage du génome par association (Genome-Wide-Association-Studies, GWAS) ont permis l'identification de nombreux autres gènes de susceptibilité ou de protection des MICI. Ces études ont montré l'implication de plusieurs voies cellulaires cruciales dans l'homéostasie intestinale notamment celles assurant la fonction de barrière, la défense antimicrobienne, la régulation de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, le stress du réticulum (Becker *et al.*, 2015; De Lange et Barrett, 2015 ;). Ces études ont également permis de confirmer l'implication du processus d'autophagie dans la MC et ce, grâce à la découverte des gènes de susceptibilité ATG16L1 et IRGM reliés à ce phénomène (Figure 9) (Hampe *et al.*, 2007 ; Rioux *et al.*, 2007, Boukercha, 2015).

L'implication de la population TH17 et de l'axe TH17/IL-23 dans la physiopathologie de la MC a également été confirmée, notamment à travers la mise en évidence de variations dans le gène codant du récepteur de l'IL-23 (IL-23R) (Barret et cardon, 2006 ; Duerr *et al.*, 2006 ; Meddour *et al.*, 2014). Des mutations dans les gènes codant l'IL-22, cytokine produite par les cellules ILC3, TH17 et TH22, ainsi que la sous unité IL-10R2 de son récepteur (IL-22R) ont également été associées aux MICI (Glocker *et al.*, 2009 ; Silverberg *et al.*, 2009). Des polymorphismes au niveau des gènes codant les TLRs dont le TLR-4 ont également été rapportés. Ces polymorphismes contribueraient à la perte de tolérance du système immunitaire vis-à-vis des bactéries commensales (Shen *et al.*, 2010).

Par ailleurs, des études gènes-candidats à grande échelle utilisant une puce dédiée « Immunochip[®] » ont montré l'existence de locus communs entre les MICI et d'autres maladies auto-immunes ou inflammatoires complexes tels que le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante. Ces données suggèrent l'existence de facteurs génétiques communs à ces pathologies (Figure 9) (Jostine *et al.*, 2012 ; Lees *et al.*, 2011 ; De Lange *et al.*, 2015)

Enfin, la prédisposition génétique aux MICI semble nécessaire mais insuffisante pour expliquer leur développement. En effet, les agrégations ethniques et familiales, la concordance imparfaite entre les jumeaux monozygotes et la présence de variations de gènes de susceptibilité aux MICI chez des sujets sains suggèrent l'implication de facteurs non génétiques tels que les facteurs environnementaux et épigénétiques dans l'apparition des MICI (Ek *et al.*, 2014 ; Boukercha *et al.*, 2015).

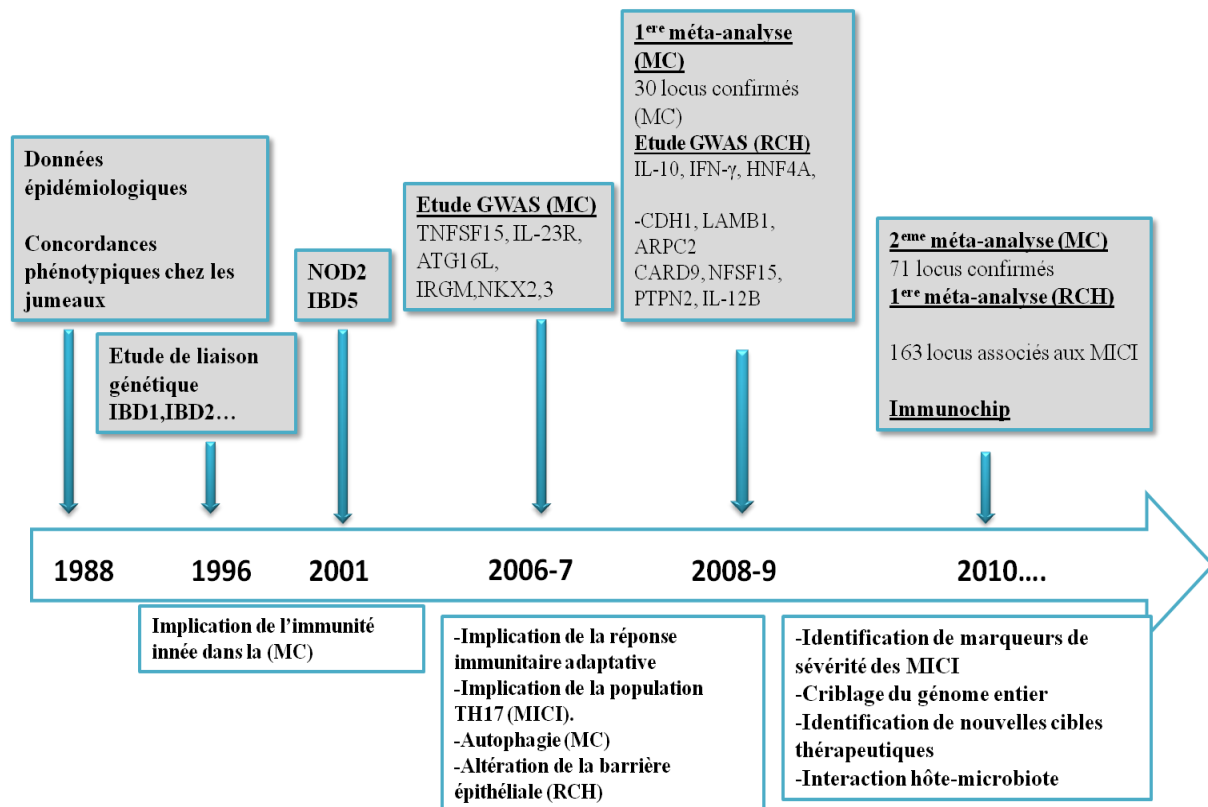


Figure 9 : Chronologie de la mise en évidence des gènes de susceptibilité aux MICI.
(Modifiée d'après : International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium (IIBDGC), De Lange *et al.*, 215)

I.4.2 Facteurs environnementaux :

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'impact des facteurs environnementaux sur l'homéostasie du système immunitaire et du microbiote intestinal au cours des MICI. Parmi les nombreuses théories proposées, l'hypothèse de l'hygiène semble se confirmer. En effet, la prise d'antibiotiques ainsi que la diminution de l'exposition aux organismes entériques, particulièrement les helminthes durant l'enfance affecte la maturation du système immunitaire muqueux favorisant ainsi l'apparition des MICI (Weinstock & Elliott, 2009; Ponder, 2013). En outre, l'amélioration des conditions de stockage des aliments apparue avec le développement de la réfrigération a introduit l'hypothèse de la chaîne du froid. En effet, l'exposition fréquente à des agents infectieux psychotrophes telles que *Listeria monocytogene* et *Yersinia ssp* contribuerait à l'installation d'une dysbiose et l'activation inappropriée du système immunitaire chez les sujets à risque (Hugot *et al.*, 2003).

Par ailleurs, le tabagisme et l'appendicectomie figurent parmi les facteurs non infectieux les plus étudiés. Le tabac constitue un facteur de risque dans la MC; il aggrave l'évolution de la maladie et provoque l'apparition de poussées plus fréquentes. Dans la RCH, le tabagisme est, au contraire, un facteur protecteur; il améliore les symptômes alors que son arrêt aggrave le cours évolutif de la maladie. Le tabac semble exercer des effets bénéfiques dans la RCH en augmentant la sécrétion du mucus et en modulant le système immunitaire muqueux (Danese *et al.*, 2004).

De façon générale, les facteurs environnementaux infectieux et non infectieux auraient en commun la capacité d'induire la rupture de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et l'altération de la réponse immunitaire ou du microbiote intestinal (Molodecky et Kaplan, 2010).

I.4.3 Facteurs immunologiques et physiopathologie des MICI :

La perturbation de la réponse immunitaire dans les MICI débiterait probablement par une défaillance dans les mécanismes de reconnaissance des motifs bactériens et des signaux de danger par les récepteurs de la réponse immunitaire innée tels que les TLRs (Toll Like Receptor) et les NODs. En effet, chez les patients atteints de MICI, les récepteurs TLR-4 et TLR-2 sont surexprimés au niveau des cellules épithéliales intestinales. La stimulation du TLR-4 par exemple, récepteur répondant principalement au LPS bactérien, conduit à l'activation de la réponse immunitaire via le facteur de transcription NF- κ B (Vamadevan *et al.*, 2010 ; Shen *et al.*, 2010). Il en résulte alors la production aberrante de différents médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et le monoxyde d'azote (NO) (Zhang *et al.*, 1999). Certaines cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNF- α et l'IL-1 β induisent l'expression des molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1) et leurs ligands homologues (Mac-1, $\alpha_4\gamma_7$) par les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. L'expression de ces molécules permet le recrutement des monocytes et des polynucléaires neutrophiles circulant en périphérie vers le site actif de l'inflammation. Cette étape est particulièrement importante dans l'initiation de l'inflammation (Figure 11) (Reimund *et al.*, 1996).

Le dysfonctionnement du système immunitaire aurait comme conséquence la perturbation de la balance immuno-physiologique entre les cellules effectrices (TH1, TH2, TH17) et les cellules immunorégulatrices (Treg). En effet, une prédominance du profil TH1 à l'origine de la production de l'IFN- γ et de l'IL-12 caractérise la MC (Parronchi *et al.*, 1997) (Figure 10). En revanche, un profil TH2 marqué par une production accrue de l'IL-4, l'IL-5 et de l'IL-13 caractérise la RCH (Figure 11) (Fuss *et al.*, 1996). En outre, des taux élevés de l'IL-17A, l'IL-23, l'IL-22 et l'IL-21 produits par les cellules TH17 sont également retrouvés au niveau de la muqueuse colique des patients atteints de MICI (Sarra *et al.*, 2010). L'IL-23 joue un rôle particulièrement important dans le développement de l'inflammation intestinale en inhibant l'activation des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ et en maintenant l'expression et l'expansion du profil TH17 (McGovern et Powrie, 2007 ; Sarra *et al.*, 2010 ; Powrie, 2012). Récemment, les travaux de notre équipe réalisés sur des patients atteints de MICI en phase active ont confirmé l'importance de l'axe IL-17A/IL-23 dans la pathogénèse des MICI. Ces études ont également permis de mettre en évidence la présence d'une corrélation positive entre les cytokines de la voie TH17 (IL-17A, IL-23 et IL-6) et la production accrue de monoxyde d'azote à l'échelle systémique (Rafa *et al.*, 2013).

Le monoxyde d'azote (NO) est un composé radicalaire très réactif, synthétisé à partir de la L-arginine, par une famille spécifique d'enzymes appelées les NO Synthases (NOS). Les cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ /TNF- α , IL-1 β) et le LPS bactérien induisent l'expression de la NOS inductible (iNOS/ NOS-2) responsable de la production accrue du NO par les macrophages et les cellules épithéliales (Kolios *et al.*, 1998). Le NO exacerberait la réponse inflammatoire au cours des MICI en induisant le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et des monocytes (Belenky *et al.*, 1993 ; Kolios *et al.*, 1998). Il contribue également à l'altération des tissus indirectement, en s'associant avec l'anion superoxyde (O₂⁻) pour former le peroxy-nitrite (OONO⁻). Ce dernier est une molécule à fort potentiel oxydatif qui induit la peroxydation des lipides, l'endommagement de l'ADN et la dégradation des sucres (Beckman *et al.*, 1990; Rachmilewitz *et al.*, 1995).

Par ailleurs, la lamina propria des patients atteints de MICI abrite un nombre considérable de cellules NKT (CD161+). Ces dernières secrètent chez les patients atteints de la MC des taux élevés d'IFN- γ . En revanche, dans la RCH, elles sont à l'origine d'une production accrue de l'IL-13 (Figure 11). Ces deux cytokines (IL-13 et IFN- γ) augmentent la perméabilité intestinale en altérant les protéines de jonction et en induisant l'apoptose des cellules épithéliales favorisant alors la translocation bactérienne et l'exacerbation de la réponse immunitaire (Fuss *et al.*, 2008 ; Heller *et al.*, 2008).

La perte de tolérance au cours des MICI peut également s'expliquer par un fonctionnement inadéquat ou insuffisant des cellules immunorégulatrices (Treg) (Jacquot, 1998 ; Roncarolo *et al.*, 2001). La diminution de leur nombre notamment dans la MC, serait due à un phénomène de conversion des lymphocytes Treg en TH17 en présence d'un environnement cytokinique pro-inflammatoire riche en IL-6 et IL-1 β (Weaver et Hatton, 2009). En outre, une nouvelle population mixte TH1-TH17 capable de sécréter concomitamment de l'IL-17 et de l'IFN- γ durant la phase active de la MC a été rapportée (Rovedatti *et al.*, 2009 ; Sarra *et al.*, 2010).

La réponse inflammatoire chronique est d'autant plus exacerbée par la persistance des lymphocytes T effecteurs résistant à l'apoptose dans le site de l'inflammation (Mudter et Neurath, 2007) et le chimiotactisme des cellules TH17 et des cellules dendritiques par un mécanisme faisant intervenir la chimiokine CCL20 et son récepteur CCR-6 (Kaser *et al.*, 2004 ; Uchida *et al.*, 2015).

Les MICI sont également associées à une réponse immunitaire humorale exacerbée caractérisée par un déséquilibre entre les anticorps plasmocytaires protecteurs (IgA) et les anticorps (IgG) dirigés contre les antigènes du microbiote intestinal. En outre, le caractère auto-immun des MICI est conforté par la présence d'auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (pANCA), des anticorps anti-*saccharomyces cerevisiae* (ASCA) chez les patients atteints de la MC et de la RCH (Desreumeaux *et al.*, 2003).

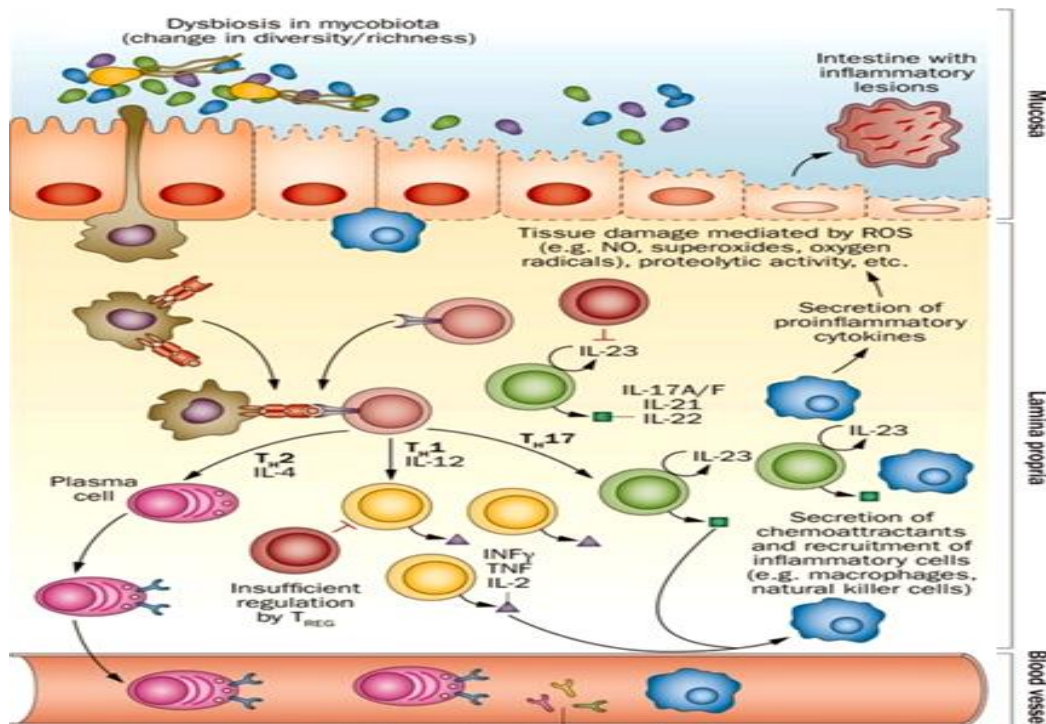


Figure 10 : Mécanismes immunopathologiques incriminés dans la maladie de Crohn. (modifiée à partir de Mukherjee *et al.*, 2014). (ROS : Reactive Oxygen Species ; NO : nitric oxide)

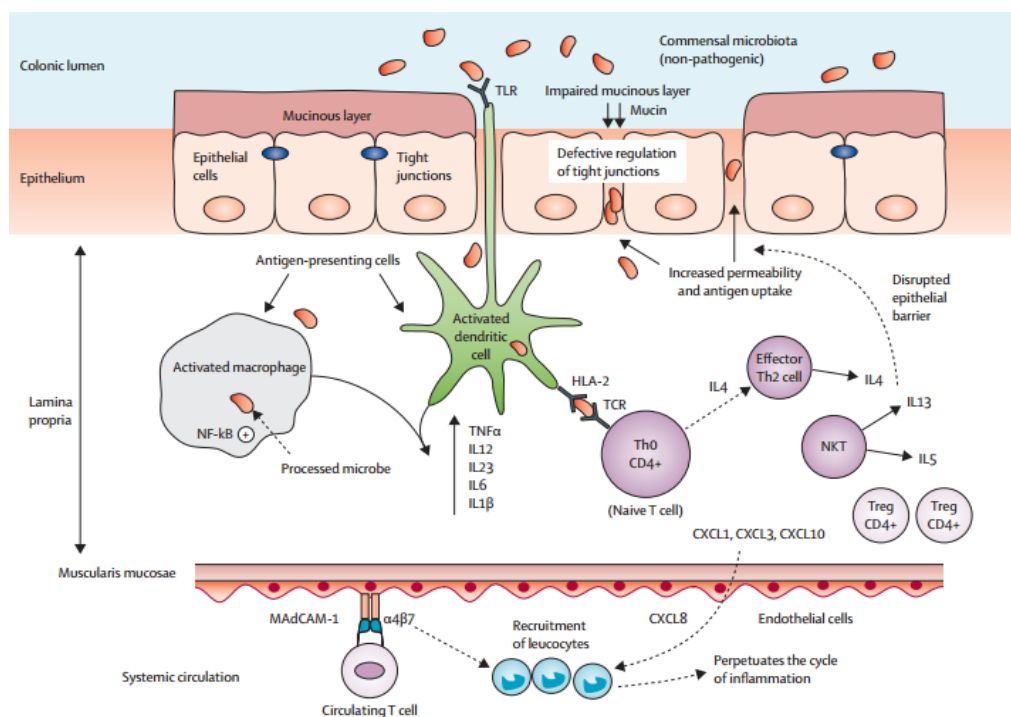


Figure 11 : Mécanismes immunopathologiques incriminés dans la rectocolite hémorragique (Ordás *et al.*, 2012).

I.4.4 Le microbiote intestinal dans les MICI :

L'implication du microbiote intestinal dans l'étiologie des MICI est soutenue par la mise en évidence d'agents microbiens et/ou leurs composants au niveau des lésions inflammatoires intestinales. Celles-ci, sont le plus souvent localisées au niveau du côlon et de l'iléon, zones où se trouve la plus forte concentration en micro-organismes (Frank *et al.*, 2007). Par ailleurs, la présence des anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), anti-porine OmpC d'*Escherichia coli* et des anticorps anti-séquence I2 de *Pseudomonas fluorescens* dans les MICI, et en particulier dans la MC, soutient l'hypothèse d'une rupture de tolérance vis-à-vis de la flore entérique endogène (Landers *et al.*, 2002).

L'état de dysbiose décrit dans les MICI est caractérisé par une diminution de la biodiversité de la flore commensale et une augmentation du nombre de microorganismes pathogènes. En effet, plus de 30% de bactéries inhabituelles ont été retrouvées au niveau de la flore fécale des patients atteints de MICI. Malgré l'augmentation quantitative de la masse microbienne, la biodiversité de la flore s'avère réduite chez ces patients. La variation de la composition du microbiote et la diminution de certaines bactéries commensales corrélient négativement avec la sévérité des MICI. En effet, les patients en phase de rémission présentent une composition du microbiote similaire à celle du sujet sain (Swidsinski *et al.*, 2005 ; Sokol *et al.*, 2008).

En outre, chez les patients atteints de la MC iléale, une forte densité d'*Escherichia coli* entéroadhérentes et entéroinvasives (ECEI) a été retrouvée (Willing *et al.*, 2009). En revanche, une diminution du nombre de *Faecalibacterium prausnitzii* ainsi que des bifidobactéries et des lactobacilles a également été observée chez les patients atteints de la MC (Sokol *et al.*, 2008; Willing *et al.*, 2009). *F.prausnitzii* est une bactérie qui appartient à la famille des Firmicutes. Elle possède de nombreux effets anti-inflammatoires notamment, à travers la sécrétion de métabolites capables d'inhiber l'activation de la voie NF- κ B et la production de l'IL-8 (Sokol *et al.*, 2008).

Le microbiote intestinal des patients atteints de la RCH est également altéré. En effet, une dysbiose a été observée au niveau des régions inflammatoires du côlon. Des taux élevés de bactéries sulfato-réductrices (Swidsinski *et al.*, 2002) et des entérobactéries de type *Escherichia coli* entéroadhérantes ont été observés au niveau de la muqueuse colique (Lucke *et al.*, 2006; Fava et Danese 2011). Une diminution du nombre de *Faecalibacterium prausnitzii* a également été mise en évidence chez les patients atteints de RCH (Sokol *et al.*, 2009).

II. Les modèles expérimentaux de MICI :

Les modèles expérimentaux de MICI ont été décrits il y a plus de 55ans par Kriszner et Elchepp (Kirsner et Elchlepp, 1957). Actuellement, il existe plus de 50 modèles induits chez le rongeur. Ils sont généralement catégorisés selon le mode d'induction de l'inflammation intestinale en quatre catégories : les modèles induits chimiquement, les modèles induits par transfert adoptif de cellules immunitaires, les modèles de colite spontanée et les modèles obtenus après manipulation du matériel génétique. Ces modèles ne représentent pas toute la complexité de la pathologie humaine et ne peuvent en aucun cas remplacer les études chez l'homme. Ils restent néanmoins, un outil indispensable à la compréhension des mécanismes physiopathologiques des MICI et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Wirtz et Neurath, 2007 ; Gkouskou *et al.*, 2014).

II.1 Les modèles de colites chimio-induites :

Les modèles expérimentaux chimio-induits constituent un moyen simple et reproductible d'induction de colites inflammatoires chez le rongeur. Ils reposent généralement sur l'utilisation d'un agent cytotoxique tel que le DSS (Dextran sulfate sodium) qui altère la barrière épithéliale intestinale ou des haptènes tels que le TNBS et l'Oxazolone qui induisent une réaction hypersensibilité. Ces modèles ont largement contribué à la mise en évidence du rôle du microbiote dans le développement de l'inflammation intestinale (Wirtz et Neurath, 2007).

II.1.1 La colite expérimentale induite par le Dextran Sulfate Sodium (DSS) :

L'administration du Dextran sulfate sodium (DSS) induit chez les animaux (souris, rat, hamster) une colite dont les caractéristiques phénotypiques se rapprochent de la RCH à savoir : perte de poids, diarrhées hémorragiques, perte de l'organisation tissulaire du côlon, altération de la couche du mucus et une importante infiltration de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse colique (Okayasu *et al.*, 1990). La colite survient chez l'animal après consommation du DSS dissout dans l'eau de boisson pendant 4 à 7 jours. Cette durée est considérée comme un cycle.

L'alternance de trois cycles de DSS/eau de boisson, provoque une colite chronique (Okayasu *et al.*, 1990 ; Cooper *et al.*, 1993). Au delà de trois cycles de DSS, les animaux peuvent développer un cancer au niveau du côlon (Okayasu *et al.*, 2002). La réponse immunitaire durant la colite aigue, est de type TH1/TH17 caractérisée par une production importante des cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 et l'IL-17. En revanche, la réponse immunitaire durant la colite chronique, est de type TH2 caractérisée par une augmentation des taux de l'IL-4 et de l'IL-10 (Alex *et al.*, 2009 ; Chassaing *et al.*, 2014).

La sévérité et la progression de la colite induite par le DSS sont fortement influencées par la souche utilisée, son « background » génétique et la présence du microbiote intestinal. En effet, l'altération du microbiote par un traitement antibiotique réduit la sensibilité des souris au DSS (Hans *et al.*, 2000). La dysbiose intestinale semble également jouer un rôle crucial dans l'apparition de la colite. En effet, il a été démontré que la sévérité de l'inflammation corrèle avec l'augmentation des entérobactéries et des bactéries à Gram négatif dégradant le mucus telles que *Akkermansia muciniphila* (Hakansson *et al.*, 2014).

Le DSS est un polysaccharide héparine-like contenant plus de 3 groupements sulfate par molécule de glucose. Son mécanisme d'action dans l'induction de la colite est toujours mal défini. Toutefois, il semble exercer un rôle cytotoxique direct sur l'épithélium intestinal. En effet, malgré un poids moléculaire très élevé, le DSS peut pénétrer à l'intérieur des cellules par pinocytose et exercer un effet génotoxique directe sur l'ADN (Tardieu *et al.*, 1998). Par ailleurs, la transformation des groupements sulfates du DSS en sulfides d'hydrogène par les bactéries sulfato-réductrices présentes dans le côlon interfère avec le métabolisme du butyrate (Roediger *et al.*, 1997).

L'altération de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale permet l'intrusion des bactéries et l'activation du système immunitaire muqueux (Ni *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'apparition d'une colite aigue chez des souris SCID déficientes en lymphocytes T et B suggèrent que la réponse immunitaire innée est suffisante pour l'induction de l'inflammation. Toutefois, lorsque la réponse adaptative est mise en place, elle semble aggraver la colite (Dieleman *et al.*, 1994).

II.1.2 La colite induite par un haptène : TNBS /Oxazolone

L'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) et l'oxazolone sont considérés comme des haptènes de par leur capacité à rendre immunogène des protéines de la muqueuse colique ou du microbiote intestinal. L'administration intra-rectal du TNBS induit chez les souris une colite similaire à la MC (Strober *et al.*, 2002). La colite est caractérisée par une inflammation transmurale et une infiltration de la lamina propria par les cellules TCD4+, les neutrophiles et les macrophages. La réponse immunitaire est de type TH1 marquée par une production accrue de l'IL-12 et de l'IFN- γ (Alex *et al.*, 2009). L'administration répétée de faibles doses de TNBS induit chez les souris une réponse immunitaire de type TH1/TH17. Cette réponse évolue par la suite vers une réponse de type TH2 qui favorise le développement d'une fibrose intestinale à travers la production accrue de l'IL-13 et du TGF- β (Valatas *et al.*, 2015).

En revanche, l'administration intra-rectale de l'oxazolone/éthanol induit une colite de type TH2 similaire à la RCH chez l'homme (Heller *et al.*, 2002). Les altérations tissulaires observées dans ce modèle sont superficielles et confinées au niveau du côlon distal. Elles sont caractérisées par une déplétion des cellules caliciformes et un important infiltrat inflammatoire composé de neutrophiles et de macrophages. La colite aigue est caractérisée par la présence de taux élevés de l'IL-13 et de l'IL-4 produits par les cellules NKT et les lymphocytes T respectivement. Récemment, il a été démontré que la production de l'IL-13 est régulée positivement par les cytokines IL-9 et IL-33 appartenant à la voie TH2. En effet, des taux élevés de ces cytokines sont retrouvés au cours de la colite induite par l'oxazolone (Camelo *et al.*, 2012; Gerlach *et al.*, 2014; Valatas *et al.*, 2015).

II.2 Modèles de colite spontanée :

Les souris C3H/HeJBir et SAMP1/Yit ont la particularité de développer une colite spontanée, en absence d'induction chimique ou de manipulation génétique. L'inflammation est chronique et liée à des mutations génétiques spontanées. Les Souris C3H/HeJBir développent une colite limitée à la région iléo-cæcale et au côlon droit (Cong *et al.*, 1998). Cette colite est caractérisée par un profil cytokinique de type TH1 (IFN- γ)

qui survient entre 3-4 semaines pour disparaître à partir de la 10^{ème} semaine (Valatas *et al.*, 2015). Les souris C3H/HeJBir portent une mutation nulle du gène TLR-4. Leurs cellules TCD4⁺ sont fortement réactives aux antigènes du microbiote intestinal. Les souris SAMP1/Yit, développent quant à elles une iléite terminale chronique spontanée 10 semaines après leur naissance (Kiesler *et al.*, 2015). L'iléite serait causée par une augmentation de la perméabilité intestinale. Elle est similaire à la MC et se caractérise par une réponse immunitaire de type TH1/TH2 à l'origine d'une forte production des cytokines : IFN- γ , TNF- α , IL-13 et IL-15 (Kiesler *et al.*, 2015).

II.3 Modèles génétiques :

Les modèles transgéniques ou Knockout (KO) sont couramment utilisés pour étudier les effets de l'altération de la barrière intestinale sur la survenue de la colite. Parmi les modèles génétiques existants, le modèle de souris déficientes en IL-10 reste le plus utilisé. Ces souris (IL-10^{-/-}) présentent des lésions intestinales qui peuvent affecter l'ensemble de l'intestin mais sont souvent retrouvées au niveau du duodénum, du jéjunum et du côlon proximal. L'augmentation de la perméabilité intestinale et la présence du microbiote jouent un rôle crucial dans le développement d'une colite semblable à la MC caractérisée par à une activation importante des cellules TH1 (Kuhn *et al.*, 1993).

II.4 Modèle de colite induite par transfert adoptif de cellules:

La réalisation de ce modèle est survenue après la découverte que le transfert adoptif des cellules T naïves CD4⁺CD45RB^{high} à des souris immunodéprimées (SCID, Nude et RAG^{-/-}) induit une colite chronique qui se développe 5 à 10 semaines suivant le transfert (Powrie *et al.*, 1994). La colite est caractérisée par une inflammation transmurale et une déplétion des cellules caliciformes. Ce modèle permet l'étude des événements précoces de la colite (Kiesler *et al.*, 2015). Il a largement contribué à la mise en évidence du rôle des cellules Treg (FoxP3⁺), du TGF- β et de la molécule de co-stimulation CTLA-4 dans la suppression de la colite (Read *et al.*, 2000). Il a également contribué à la mise en évidence du rôle crucial du microbiote dans le maintien de l'homéostasie intestinale et la régulation du système immunitaire (Mazmanian *et al.*, 2008).

III.Traitements des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin:

Les stratégies thérapeutiques conventionnelles des MICI ont pour but d'atténuer l'inflammation, d'induire une rémission clinique et de prévenir à long terme le risque de rechute et de complications (koch, 2003). À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement en mesure de guérir ces maladies. Le choix du traitement dépend de la pathologie à traiter, de l'intensité des symptômes ainsi que de la sévérité et de l'étendue des lésions (*Lemann et Allez* ,2004). Il repose essentiellement sur trois classes thérapeutiques : les aminosalicylés, les corticoïdes et les immunosuppresseurs. En cas d'échec du traitement médical ou de complications graves, le traitement chirurgical s'impose.

III.1 Les dérivés aminosalicylés:

Les dérivés de l'Acide salicylique (les 5-aminosalicylates ou mésalazine) sont des molécules anti-inflammatoires indiquées dans le traitement des poussées légères à modérées de la RCH et de la forme colique de la MC. Ces molécules agissent de façon topique au niveau du côlon où elles inhibent le métabolisme de l'acide arachidonique limitant ainsi la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires. Elles inhibent également la voie de synthèse des leucotriènes responsables du recrutement des cellules immunocompétentes, l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la production du monoxyde d'azote (*Bantel et al.*, 2000).

III.2 Les corticoïdes :

Ce sont des anti-inflammatoires stéroïdiens qui agissent à différents niveaux de la cascade inflammatoire. Ils sont indiqués dans le traitement des poussées sévères des MICI. Au niveau des macrophages, les corticoïdes régulent négativement la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6) et des chimiokines. Ils agissent également sur les lymphocytes T en inhibant leur recrutement et prolifération. La corticothérapie est souvent accompagnée par l'apparition de nombreux effets indésirables ainsi que par un risque élevé de cortico-dépendance chez les patients (*Taylor et Irving*, 2011).

III.3 Les immunosuppresseurs :

Les immunosuppresseurs sont des agents anti-prolifératifs utilisés dans le traitement à long terme des formes actives et sévères de MICI ainsi que dans les formes corticodépendantes et corticorésistantes de la MC. Les immunosuppresseurs diminuent l'action des cellules NK et des cellules T cytotoxiques. Ils inhibent la prolifération lymphocytaire par l'interférence avec la synthèse des acides nucléiques purinergiques. Leur utilisation de façon précoce dans la prise en charge des MICI est de plus en plus encouragée, elle permettrait d'obtenir une rémission globale qui persiste à l'arrêt du traitement (Ordás *et al.*, 2011). La prescription des immunosuppresseurs nécessite toutefois, une surveillance régulière du patient car ces derniers peuvent entraîner des infections opportunistes et autres complications graves tels que les désordres lymphoprolifératifs (Sokol et Beaugerie, 2009).

III.4 Les Biothérapies ciblées : Anticorps anti-TNF- α

Les études approfondies des mécanismes inflammatoires de nombreuses pathologies auto-immunes telle que la polyarthrite rhumatoïde ont été à l'origine de l'élaboration des anticorps anti-TNF- α . Ces anticorps (infliximab, adalimumab) ont considérablement amélioré la prise en charge des MICI, notamment les formes sévères et réfractaires aux traitements énumérés précédemment (Figure 12) (Reenaers *et al.*, 2009). Les anti-TNF sont capables de reconnaître spécifiquement les formes solubles et transmembranaires du TNF- α , de s'y lier en formant des complexes stables, et ainsi d'inhiber leur action. Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée principalement par les monocytes et les macrophages. Cette cytokine contribue à l'amplification de la réaction inflammatoire en augmentant la production de l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 ainsi que l'expression des molécules d'adhésion (Baumann et gauldie, 1994; Touil-Boukoffa, 1998 ; Begue *et al.*, 2006). Elle perpétue également la réponse inflammatoire en augmentant la perméabilité intestinale et la translocation bactérienne. Le taux de sécrétion du TNF- α est fortement élevé au niveau local et systémique chez les patients atteints de MICI (Van Deventer *et al.*, 1997 ; Rafa *et al.*, 2010 ;) et au cours de la colite expérimentale induite par le DSS (Soufli *et al.*, 2015).

Cependant, le traitement avec les anti-TNF comporte certains risques comme: l'hypersensibilité au principe actif, les réactions cutanées et neurologiques, le développement de tuberculose et de pneumonie ainsi qu'un risque élevé d'apparition de lymphome (Mowat *et al.*, 2010 ; Stallmach *et al.*, 2010) d'où la nécessité de développer de nouvelles biothérapies. Par ailleurs, d'autres moyens de blocage du TNF- α à l'échelle locale sont en cours d'essais. Ils visent à minimiser les effets secondaires liés à l'administration systémique des anti-TNF- α . Dans ce cadre, les travaux de Vandenbroucke et al suggèrent l'utilisation de la souche probiotique *L. lacis* modifiée génétiquement afin de délivrer au niveau intestinal, des nanobodies dirigés contre le TNF- α (Vandenbroucke *et al.*, 2010).

III.5 Les futures cibles thérapeutiques des MICI :

De nombreuses cibles thérapeutiques visant à réguler l'inflammation dans les MICI sont en cours d'essais cliniques. Il s'agit, entre autres, d'anticorps monoclonaux anti-IL-12p40/IL-23, anti-IL-6 et anti-IL-17A ou l'administration de cytokines immunorégulatrices comme l'IL-10 recombinante (Melmed et Targan, 2010). En outre, l'inhibition des voies de signalisation intracellulaires des cytokines (JAK-STAT) ou encore des intégrines et leurs récepteurs responsables de l'adhésion leucocytaires aux cellules endothéliales sont des approches thérapeutiques en cours d'étude (Figure 12) (Goldberg *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses stromales (CSMs) semble être une stratégie thérapeutique prometteuse en raison de la capacité de ces cellules à réparer les dommages tissulaires au niveau de l'intestin d'une part et à atténuer la réponse inflammatoire, d'autre part (Flores *et al.*, 2015).

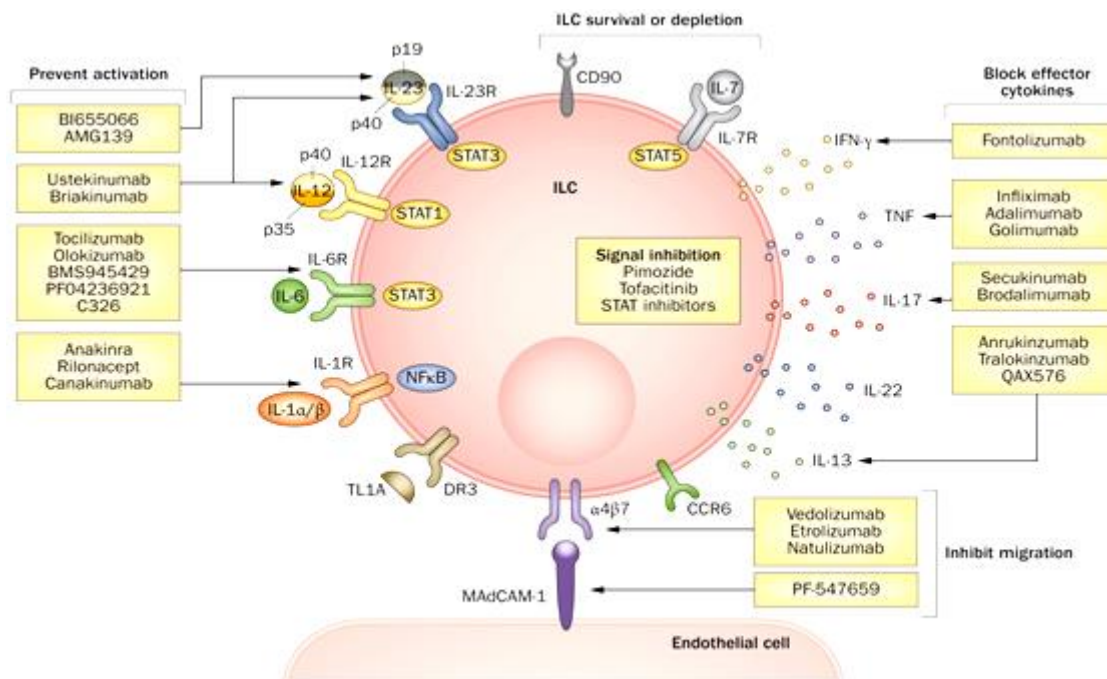


Figure 12: Les différentes cibles thérapeutiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Goldberg *et al.*, 2015).

III.6 Les thérapies alternatives/ complémentaires dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : pro, prébiotiques et symbiotiques

L'observation d'une dysbiose intestinale en faveur d'une flore pathogène dans les MICI a conduit à de nouvelles interrogations quant à l'intérêt thérapeutique de la manipulation du microbiote intestinal par des probiotiques, prébiotiques et symbiotiques en complément ou en substitut aux traitements actuels des MICI. Cette approche thérapeutique a pour but principal de rétablir l'équilibre de la microflore gastro-intestinale afin de réduire ou de prévenir l'inflammation intestinale (Marteau, 2006 : Hedin C *et al.*, 2007).

III.6.1 Les probiotiques :

Il existe de nombreuses études cliniques ayant évalué le potentiel thérapeutique des probiotiques tels les lactobacilles et les bifidobactéries utilisés seuls ou en combinaison dans les MICI. Les premiers résultats encourageants ont été obtenus chez des patients atteints de pochite (inflammation de la poche iléale après résection colique) traités avec le complexe probiotique VSL #3 (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B.*

longum, *B. breve*, *B. infantis* et *St. salivarius*) (Gionchetti *et al.*, 2000). Ce dernier s'est également montré efficace dans le maintien de la phase de rémission au cours de la RCH (Mimura *et al.*, 2004). L'étude de Venturi *et al.* effectuée sur des patients atteints de la RCH et ne répondant pas au traitement d'entretien à base de mésalazine a également démontré l'efficacité du VSL#3 dans le maintien de la phase de rémission. L'analyse de la flore fécale de ses patients a révélé une augmentation du nombre de bifidobactéries et de lactobacilles. Ces résultats reflètent l'impact des probiotiques dans la modulation de la composition du microbiote intestinal en faveur des bactéries bénéfiques (Venturi *et al.*, 1999). Par ailleurs, des travaux réalisés sur un modèle de colite expérimentale induite par le DSS ont révélé que les propriétés anti-inflammatoires du VSL#3 sont dues à l'interaction des motifs d'ADN CpG non méthylés bactériens avec le récepteur intracellulaire TLR9 présent dans les cellules dendritiques plasmocytoides. (Rachmilewitz *et al.*, 2004). Une fois activées, ces DCs favorisent l'expansion des cellules Treg. (Bilsbough *et al.*, 2003) et produisent de l'IFN- α doté de propriétés anti-inflammatoires (Katakura *et al.*, 2005). Par ailleurs, d'autres essais réalisés en double aveugle sur des patients atteints de la RCH ont montré que la souche non pathogène *E. coli* Nissle 1917 exerce des effets similaires à la mésalazine (Kruis *et al.*, 2004).

Dans la maladie de Crohn, la supplémentation en *Lactobacillus GG* à des formes pédiatriques a été associée à une augmentation des taux d'IgA au niveau de l'intestin. La levure *Saccharomyces boulardii* s'est aussi montrée efficace dans le maintien de la phase de rémission (Guslandi *et al.*, 2002). Toutefois, les preuves de l'efficacité des probiotiques dans le traitement de la maladie de Crohn restent, à l'heure actuelle, encore insuffisantes.

III.6.2 Les prébiotiques :

Les prébiotiques sont généralement des oligosaccharides (fructo-oligosaccharides, inuline, lactulose) non digestibles dans l'intestin grêle, résistants à l'acidité gastrique et à l'hydrolyse enzymatique. Leur fermentation dans le côlon stimule la croissance des bactéries bénéfiques dont les lactobacilles et les bifidobactéries (Roberfroid, 2007). Les prébiotiques constituent de ce fait des « traitements écologiques non vivants » qui modulent la flore entérique endogène, augmentent la synthèse des acides gras à chaînes

courtes (Butyrate, acétate et propionate), renforcent la fonction de barrière de l'épithélium et régulent les réponses immunitaires locales et systémiques (Marteau, 2006).

III.6.3 Les symbiotiques :

L'association d'un probiotique et d'un prébiotique spécifique forme un symbiotique. Ce dernier permet d'augmenter la survie et la persistance des probiotiques au niveau du côlon. Une étude randomisée en double aveugle, réalisée sur 18 patients atteints de la RCH ; a permis de démontrer l'efficacité d'un symbiotique issu de la combinaison de *B longum*, l'inuline et des oligofructoses dans l'inhibition de la production locale des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL1- β (Furrie *et al.*, 2005).

III.7 La transplantation de microbiote fécal (FMT) :

Cette thérapie consiste à transférer des selles à partir d'un donneur sain à un patient atteint de MICI afin de rétablir la dysbiose intestinale. Bien qu'elle soit actuellement indiquée dans le traitement des infections à *Clostridium difficile*, le mécanisme exact de la transplantation fécale sur la muqueuse reste inconnu. De nombreuses hypothèses suggèrent que l'apport d'une flore fécale à partir d'un donneur sain pourrait remplacer la flore altérée des patients. Cette thérapie pourrait alors être d'un grand intérêt dans le traitement des formes sévères de MICI qui ne répondent pas au traitement conventionnel ou aux thérapies alternatives (Borody *et al.*, 2013).

Chapitre III : Les probiotiques

I. Les probiotiques :

La découverte des probiotiques revient à Elie Metchnikoff. Il y a de cela près d'un siècle, lorsqu'il observa que la longévité des paysans bulgares était liée à leur consommation régulière de lait fermenté riche en bactéries lactiques (Metchnikoff, 1907 ; Metchnikoff, 1908). Le terme probiotique provenant du grec « pro bios » signifie « en faveur de la vie ». En 1989, Fuller définit les probiotiques comme un « supplément alimentaire microbien vivant agissant au bénéfice de l'animal hôte en améliorant l'équilibre microbien intestinal » (Fuller, 1989). Depuis, cette définition a évolué et en 2001, l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) ont officiellement formulé la définition des probiotiques comme « micro organismes vivants qui, une fois administrés en quantité adéquate, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2001). En 2003, Clancy propose le terme « immunobiotiques » pour désigner les micro-organismes probiotiques dotés de propriétés immunomodulatrices (Clancy, 2003).

Actuellement, les principaux groupes bactériens utilisés comme probiotiques sont les bactéries Gram positif appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. En outre, la levure *Saccharomyces boulardii* et la souche *E. coli* Nissle sont couramment utilisées. Les probiotiques sont présents, principalement, dans les produits laitiers fermentés, les compléments alimentaires et les médicaments.

Parmi les effets bénéfiques avérés des probiotiques figurent l'amélioration de la digestion du lactose, la diminution des diarrhées dans le cadre des antibiothérapies et le traitement des diarrhées d'origines virales ou bactériennes (Hardy *et al.*, 2013).

I.1 Critères de sélection des bactéries d'intérêt probiotique :

Les bactéries potentiellement probiotiques proviennent pour la plupart de la flore entérique de l'homme. Pour être considéré comme probiotique, le micro-organisme doit répondre à certains critères résumés dans le tableau 1:

Tableau 1 : Principaux critères de sélection des probiotiques (adapté à partir de Azizpour *et al.*, 2009)

Critères de sécurité	- Identification taxonomique ; - Identification phénotypique et génotypique ; - Testé <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> - Sans danger pour l'être humain - Considéré comme GRAS (Generally Recognized As Safe)
Critères fonctionnels	- Résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires ; - Adhérence à la muqueuse épithéliale intestinale et persistance dans le tractus gastro-intestinal ; - Posséder des propriétés antimicrobiennes ; - Antagoniste envers les germes pathogènes
Critères technologiques	- Stabilité durant le traitement technologique et le stockage ; - Production à grande échelle ; - Résistance aux phages.

Cependant certains de ces critères comme l'adhérence et la viabilité des probiotiques dans l'intestin sont sujettes à controverse. En effet, il a été démontré que les cellules bactériennes non viables sont également capables d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte (Sanders, 2003).

I.2. Renforcement de la barrière épithéliale intestinale et modulation du système immunitaire muqueux par les probiotiques :

Les probiotiques participent à l'homéostasie intestinale à travers leurs effets directs et indirects sur la modulation du microbiote intestinal et du système immunitaire muqueux (Rambaud, 1993) (Figure 13). Ils renforcent la fonction de barrière de l'épithélium en entrant en compétition avec les bactéries pathogènes pour les sites d'adhérence au niveau de l'épithélium intestinal (Gross *et al.*, 2008). Ils agissent de manière indirecte en modifiant les conditions de la niche écologique intestinale. En effet, les probiotiques libèrent des substances antibactériennes qui inhibent la croissance et la prolifération des micro-organismes pathogènes. De plus, les bactéries lactiques telles que les lactobacilles produisent de l'acide lactique qui diminue le pH de l'intestin le rendant impropre à la colonisation par les germes pathogènes (Hardy *et al.*, 2013).

Les propriétés immunomodulatrices des probiotiques ont été rapportées dans de nombreuses études. Celles-ci peuvent être pro/anti-inflammatoires et immunorégulatrices en fonction de la souche, de la formulation du probiotique et du statut immunologique de l'hôte (O'Toole et Cooney., 2008). En effet, certaines bactéries lactiques stimulent la réponse immunitaire innée en induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12, le TNF- α et l'IL-1 β (Bodera et Chcialowski, 2009). Ces cytokines augmentent l'activité phagocytaire des macrophages renforçant ainsi, les défenses antibactériennes de l'hôte. En outre, certaines souches probiotiques telles que *Lactobacillus GG*, *B. lactis* Bb-12 et *S. boulardii* augmentent la sécrétion des IgA au niveau de la muqueuse intestinale en induisant la production du TGF- β , l'IL-10 et l'IL-6 qui stimulent la maturation des cellules B (Rodrigues *et al.*, 2000 ; Rautava *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les probiotiques peuvent atténuer l'expression des cytokines pro-inflammatoires en interférant avec la voie NF- κ B d'une part et d'induire le développement des cellules dendritiques tolérogènes d'autre part. En effet, il a été démontré que les bactéries *L. reuteri* et *L. casei* interagissent avec les cellules dendritiques via les récepteurs C-type lectine et DC-SIGN pour induire la production de l'IL-10 (Smits *et al.*, 2005). Les bifidobactéries telle que *B. breve* induisent également la production de l'IL-10 après interaction avec le TLR-2 exprimé au niveau des cellules dendritiques CD103⁺ (Jeon *et al.*, 2012). L'IL-10 inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires de la voie TH1 et induit le développement des cellules Treg FoxP3⁺ (Re et Strominger, 2004 : Petrof *et al.*, 2004 ; Coombes *et al.*, 2007).

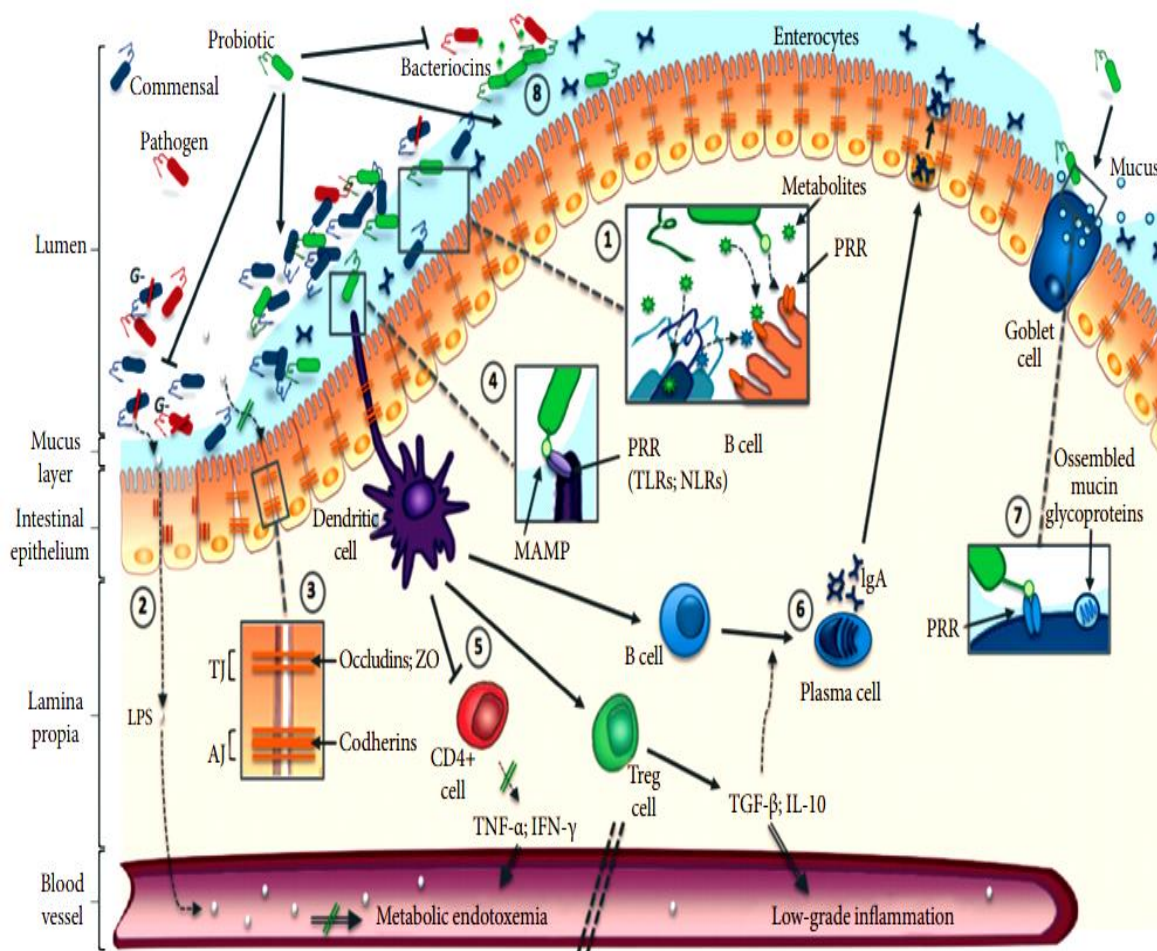


Figure13: Rôle des probiotiques dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Le Barz *et al.*, 2015). (1) Production de métabolites nécessaires à la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Ces métabolites sont également dotés de fonction immunomodulatrices ; (2,3) induction de l'expression des protéines de jonction qui préviennent l'augmentation de la perméabilité intestinale ; (4) l'interaction des probiotiques avec les PRR exprimés au niveau des cellules épithéliales et des cellules dendritiques régulent l'activation des voies de signalisation intracellulaires. Les probiotiques peuvent donc inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, la prolifération des lymphocytes CD4⁺ (5). Ils peuvent induire le développement des cellules Treg et des plasmocytes (6) ; (7) l'induction de la production du mucus par les cellules caliciformes. (8) la production de bactériocines qui inhibent la prolifération des bactéries pathogènes.

TJ: tight junctions; AJ : Adherens junctions; TLR: Toll-like receptor; NLR: NOD-like receptor; TNF- α : tumor necrosis factor α ; IFN- γ : interferon γ ; TGF- β : transforming growth factor β ; IL-10 : Interleukin 10.

Partie II : Matériel et Méthodes

I. Matériel

I. 1. Les animaux :

Les animaux utilisés dans notre étude sont des souris femelles BALB/c âgées entre 7-8 semaines, fournies par l'institut Pasteur-Algérie. Avant le début de la période expérimentale, un temps d'acclimatation d'une semaine au sein de l'animalerie de la faculté des Science Biologiques de l'USTHB a été respecté. Les souris ont eu un accès libre à l'eau et à une alimentation *ad libitum*.

I.2. Les échantillons sanguins de patients et de volontaires sains:

Les échantillons sanguins ont été obtenus à partir de patients atteints de la maladie de Crohn (MC) (n=27) et de la rectocolite hémorragique (RCH) (n=14). Les patients sont suivis au niveau du service de médecine interne de l'hôpital de Ain Taya ainsi qu'au niveau du service de gastroentérologie du CHU de Maillot. Tous les patients participant à la présente étude, en phase de poussée ou de rémission étaient sous thérapie. D'autres prélèvements sanguins ont également été effectués sur des volontaires sains (Témoins) (n=24).

Le sang a été recueilli dans des tubes héparinés à raison de 4ml par tube puis transporté à +4°C. Après décantation pendant 20 à 30 min, les plasma ont été récupérés et conservés à -45°C pour la réalisation de dosages ultérieurs. Les cellules sanguines ont été purifiées sur un gradient d'Histopaque pour l'obtention des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs).

Remarque : Avant chaque prélèvement, les patients ainsi que les volontaires sains ont signé un consentement éclairé requis par le comité d'éthique de l'Agence Algérienne de Recherche Thématique dans les Sciences de la Santé (ATRSS).

Le tableau 2 nous renseigne sur les données cliniques des patients.

Tableau 2: Caractéristiques cliniques des patients et des témoins

	Patients atteints de la maladie de Crohn (MC)	Patients atteints de la rectocolite hémorragique (RCH)	Donneurs sains (Témoins)
Nombre (n)	n=27	n=14	n=24
Moyenne d'âge (années)	34.40±11.29	37.57±15.28	24.30±5.232
Sexe (H : Homme /F : Femme)	8H/19F	8H /6F	8H/16F
Traitement administré	Aminosalicylés Immunosuppresseurs Corticoïdes	Aminosalicylés Immunosuppresseurs Corticoïdes	-

I.3.Probiotiques et prébiotiques :

Deux types de probiotiques ont été utilisés dans notre étude :

- **L'Ultrabiotique®** : C'est un cocktail de probiotiques lyophilisés et commercialisés sous forme de gélules. Chaque gélule contient 4×10^9 UFC de bactéries lactiques actives *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve* (Laboratoires Nutrisanté, Montaigu-France).
- **L'Ultralevure®** : Ce sont des gélules contenant la levure *Saccharomyces boulardii* sous formelyophilisée (Laboratoire Biocodex. France).

Ces micro-organismes répondent aux critères de sélection des probiotiques reliés à la sécurité, la survie, l'activité et à la persistance dans le tractus digestif (FAO/WHO, 2002).

Comme prébiotiques, nous avons utilisé l'inuline ($C_6H_{10}O_5$)_n H₂O.

1.4. Les milieux de culture :

- Le milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640) et le milieu DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium) sont des milieux nutritifs destinés respectivement à la mise en culture des PBMCs et des explants coliques. Ils ont été enrichis avec: 2Mm de L-Glutamine, des antibiotiques (Pénicilline à 1000UI/ml, Streptomycine 10mg/ml) et du Sérum de Veau Fœtal (SVF) préalablement

inactivé par la chaleur, à raison de 5% pour le RPMI et de 10% pour le DMEM (Sigma-Aldrich). Par ailleurs, nous avons également utilisé le RPMI 1640 incomplet et le Sérum de Veau fœtal inactivé pour la préparation des surnageants de culture des probiotiques.

- Le milieu BHIB « Brain-Heart Infusion Broth » ou bouillon cœur-cerveille est un milieu nutritif tamponné, utilisé pour la culture d'un très grand nombre de microorganismes. Il a été utilisé pour la préparation des surnageants de culture de l'Ultrabiotique®.

1.5. Les anticorps et kits de dosage ELISA :

Différents anticorps ont été utilisés dans l'analyse immuno-histochimique.

- Anti-iNOS (NOS-2) (Santa-Cruz, USA Biotechnology) ;
- Anti p65 NF-κB (Santa-Cruz, USA Biotechnology) ;
- Anti-TLR4 (Invitrogen Life Technologies)
- Anti-rabbit IgG-FITC (Life Technologies).

Nous avons utilisé des kits ELISA pour le dosage des cytokines :

- Le kit de dosage de l'IFN-γ murin (Invitrogen-Life Technologies) a été utilisé pour le dosage de l'IFN-γ dans les plasma des souris.
- Le kit de dosage de l'IL-22 (Biolegend®) a été utilisé pour le dosage de l'IL-22 dans les plasma des patients atteints de MICI et des volontaires sains.

1.6 Autres réactifs:

- Le Dextran Sulfate Sodium (DSS:PM=36.000-44.000/TdB. Consultancy AB, Sweden);
- Griess A: Naphtyl Ethylène Diamine (NED) (C₂₂H₂₀N₂, 2HCl);
- Griess B: Sulfanilamide (p-Aminobenzenesulfonamide, C₆H₈N₂O₂);
- Eukitt® (quick-hardening mounting. Fluka analytical, Sigma. Allemagne) ;
- 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma)
- Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich)

II. Méthodes :

II.1. Description du modèle expérimental :

II.1.1. Induction de la colite aigue par le Dextran Sulfate Sodium (DSS) :

La colite expérimentale a été induite chez les souris par l'administration quotidienne de 3% (m/v) de DSS dissout dans l'eau de boisson et ce, pendant cinq jours. Après induction de la colite, la solution de DSS a été remplacée par l'eau de boisson pendant cinq autres jours afin d'induire une phase de rémission (Figure 14B ; Figure 15). Nous avons adopté cette approche afin de mettre en évidence les effets thérapeutiques des probiotiques (l'Ultrabiotique®) après installation de la colite aigue.

II.1.2. Administration des probiotiques :

Le traitement des souris par les probiotiques a débuté à J3 et s'est poursuivi jusqu'à la fin de la période expérimentale. Les probiotiques ont été dissout dans du lait écrémé UHT à une concentration de 10^9 UFC /ml. La suspension a été incubée pendant 1 h à 37°C afin d'assurer une bonne dissolution des bactéries lyophilisées dans le lait. Les probiotiques ont été administrés aux souris par voie intra-gastrique à l'aide d'une sonde de gavage.

L'état général des souris a été observé quotidiennement durant la période expérimentale. L'évolution de la colite a été suivie grâce à un score d'activité de la maladie (DAI : Disease Activity index) établi par Murthy et al (Murthy *et al.*, 1993).

- *Index d'activité de la maladie « Disease Activity Index (DAI) » :*

Le DAI reflète l'évolution de la colite; il est calculé en graduant sur une échelle de 0 à 4 la perte de poids, la consistance des selles et la présence de diarrhées hémorragiques. La moyenne des scores de ces trois paramètres constitue le DAI (Tableau 3)

Tableau3: Calcul de l'index d'activité de la maladie (DAI).

Score	Perte de poids	Présence de sang dans les selles	Consistance des selles
0	<1%	Négatif	normale
1	1-5%	-	-
2	2-10%	Positif	Selles molles
3	10-20%	-	-
4	>20%	Hémorragie	Diarrhée

II.1.3. Les groupes expérimentaux :

Après la période d'acclimatation, les souris ont été randomisées puis réparties en quatre lots (n=6-12) Le tableau 4 nous renseigne sur les différents groupes expérimentaux utilisés dans notre étude.

Tableau 4: Caractéristiques des différents groupes expérimentaux

Groupe expérimental	Description
DSS	3% de DSS dissout dans l'eau pendant 5 jours + 5 jours d'eau de boisson
DSS+ Prb	3% de DSS dissout dans l'eau pendant 5 jours + 5 jours d'eau de boisson. Gavage de 200µl d'une suspension de 10^9 UFC/ml de probiotiques pendant 7 jours à partir de J3.
Prb	Gavage de 200µl d'une suspension de 10^9 UFC/ml de probiotiques pendant 7 jours.
Ctrl	Les souris ont reçu de l'eau de boisson uniquement (aucun traitement).

Abréviations : **Ctrl** : Contrôle ; **Prb** : Probiotiques.

II.1.4 Plasma :

À l'issue de la période expérimentale, les souris ont été sacrifiées. Le sang a été immédiatement prélevé par ponction cardiaque à l'aide d'une seringue contenant un anticoagulant, l'EDTA à 2.6%. Il a été recueilli dans des tubes puis centrifugé à 10000 rpm pendant 10min. Le plasma a été récupéré puis conservé à -45°C pour le dosage ultérieur du monoxyde d'azote et de l'IFN- γ .

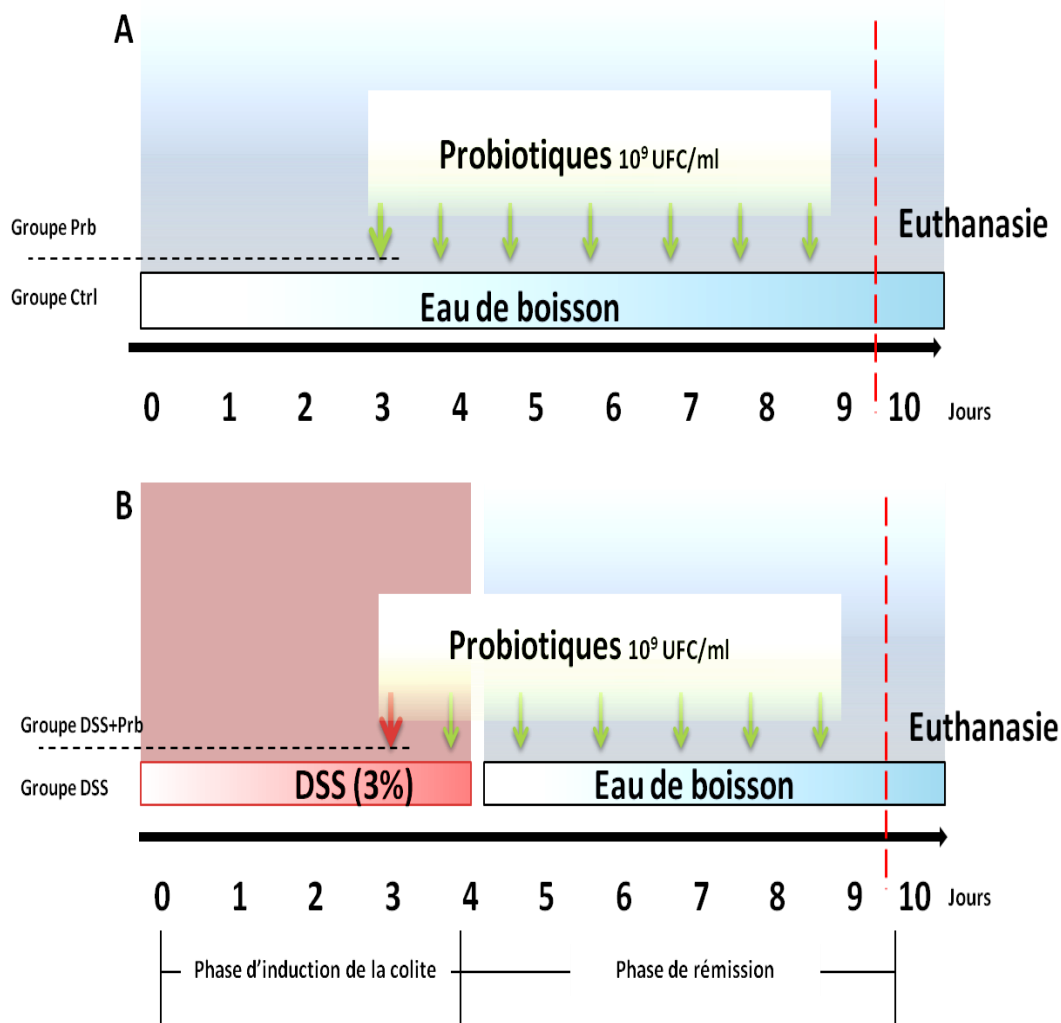


Figure 14 : Schéma illustrant le déroulement des différentes phases de la mise au point du modèle expérimental. A) Administration des probiotiques aux souris « saines ». B) Traitement des souris « malades » atteintes d'une colite induite avec 3% de DSS par les probiotiques.

II.1.5 Récupération des organes :

Après ouverture de la cavité abdominale des souris, la rate et le côlon ont été délicatement récupérés et pesés. La longueur du côlon depuis le coecum jusqu'à l'anus a été mesurée à l'aide d'un support gradué.

II.1.6 Culture des explants coliques des souris :

Les explants coliques sont obtenus à partir du côlon distal. Ils ont été découpés en petits fragments de 5mm environ. Plusieurs lavages ont été effectués avec du tampon phosphate salin stérile (PBS, pH=7.2-7.4) additionné de 1% d'une solution d'antibiotiques. La mise en culture des biopsies coliques a débuté par une phase d'adhérence. Les fragments ont été déposés dans des microplaques à fond plat de 48 puits en présence de 10µL de milieu de culture. Ils ont été incubés pendant 2h à 37°C en présence de 5% de CO₂ pour permettre leur adhérence. À l'issue de cette phase, une quantité suffisante de DMEM complet a été rajoutée dans les puits pour la mise en culture. Après 24h d'incubation, les surnageants de culture ont été récupérés puis centrifugés pendant 10 minutes à 10000 rpm. Ils ont été conservés à -20°C jusqu'au moment du dosage du NO.

II.1.7 Etude anatomopathologique :

L'analyse anatomopathologique a débuté par un examen macroscopique du côlon. Ce dernier a été récupéré, lavé puis sa longueur a été mesurée sur un plan gradué. À partir de son extrémité distale un fragment de 4cm a été découpé puis pesé. Pour la réalisation de l'étude microscopique, des fragments de 0,5 cm ont été prélevés et fixés dans du formol tamponné à 10 % pendant 48h.

- **Etude histologique du côlon :**

Une fois les fragments coliques fixés par le formol, ils ont été soumis à plusieurs étapes avant d'être inclus dans des blocs de paraffine : déshydratation dans des bains d'alcool de concentration croissante (70°-90°-100°), éclaircissement dans du xylène puis imprégnation dans de la paraffine à 60°C. Lorsque les blocs de paraffine ont été formés, ils ont été maintenus à +4°C jusqu'à la réalisation des coupes. Chaque bloc a été débité en coupes de 4µm d'épaisseur qui ont été étalées et fixées sur des lames. Avant la coloration ou l'immunomarquage, les lames ont été déparaffinées par la chaleur et réhydratées à l'aide de plusieurs passages dans des bains de xylène, d'alcool à concentration décroissante (100°-90°-70°) et d'eau distillée.

Deux colorations histologiques ont été utilisées dans notre étude :

Coloration Hématoxyline & éosine : C'est une coloration topographique dite « de routine », elle est utilisée pour visualiser l'organisation générale d'un tissu et des éventuelles lésions ou changements dans l'architecture tissulaire. L'hématoxyline est un colorant nucléaire basique qui confère une teinte bleue à violette aux noyaux. En revanche, l'éosine est un colorant acide qui colore les protéines cytoplasmiques en rose (Stevens et Lowe, 1997).

Coloration spéciale au bleu Alcian : Le bleu Alcian est un colorant des mucopolysaccharides acides (Stevens et Lowe, 1997). Nous l'avons utilisé conjointement avec la coloration H&E pour mettre en évidence le mucus produit par les cellules caliciformes. Une fois les coupes colorées, elles ont été montées entre lames et lamelles à l'aide d'un liquide de montage, l'Eukitt® déposé au préalable sur la lame.

Un score histologique défini par Siegmund et al a été utilisé afin d'évaluer, sur une échelle de 0 à 6, la présence et l'étendue de l'infiltrat inflammatoire dans la muqueuse et la sous muqueuse, la perte des cryptes et la destruction de l'épithélium intestinal (Siegmund et al., 2001).

Tableau 5 : Calcul du score histologique

Paramètres	Description	Score
Infiltrat inflammatoire	Occasionnel dans la lamina propria	0
	Infiltrat cellulaire prédominant à la base des cryptes	1
	Infiltrat inflammatoire au niveau de la muqueuse	2
	Infiltrat transmurale	3
Domages tissulaires	Absence de dommages tissulaires	0
	Jusqu'à 50% de perte de cryptes	1
	50-100% de perte de cryptes avec un épithélium conservé	2
	Perte complète des cryptes avec perte de l'épithélium	3

- **Etude immuno-histochimique:**

Dans notre étude, nous avons voulu évaluer l'expression de la NOS-2, du NF- κ B et du TLR-4 par marquage immuno-histochimique.

Après déparaffinage et réhydratation, les sections tissulaires ont été soumises à un démasquage des sites antigéniques au bain marie à 98°C pendant 40min. Pour éviter le bruit de fond, l'activité peroxydasique des fragments coliques a été inhibée par incubation des lames dans une solution d'eau oxygénée (H₂O₂) 0.3% pendant 5min. Les sites antigéniques non spécifiques ont été quant à eux saturés par immersion des lames, pendant 2h sous faible agitation, dans une solution contenant 5% de lait écrémé. Les coupes histologiques ont été incubées avec les anticorps primaires (anti-iNOS et anti-p65, dilués à 1/100) pendant une nuit à +4°C. Par la suite une incubation des lames avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (dilué à 1/1000) pendant 2h à température ambiante a été effectuée. La réaction immuno-histochimique est révélée à l'aide d'un substrat chromogène (DAB). Entre chaque étape, plusieurs lavages au PBS-Tween 20 ont été effectués. Enfin, les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer et montées entre lames et lamelles. Une fois séchées, les lames ont été visualisées au microscope optique.

Pour l'immunodétection du TLR-4 par immunofluorescence, les mêmes étapes de déparaffinage, réhydratation et de démasquage ont été suivies. Les sites antigéniques ont été directement saturés avec du lait écrémé 5%, pendant 2h sous faible agitation. Ensuite l'anticorps primaire anti-TLR-4 dilué à 1/100 a été déposé pendant une nuit à +4°C. Par la suite, l'anticorps secondaire anti IgG-FITC (Invitrogen Life Technologies, dilué 1/1000) a été déposé pendant 1 heure à température ambiante. Entre chaque étape, plusieurs lavages au PBS-Tween 20 ont été réalisés. Les coupes ont été montées entre lames et lamelles et visualisées au microscope inversé à fluorescence.

II.2 Analyse transcriptomique par la PCR en temps réel :

L'ARN total a été extrait à partir du côlon de chaque souris avec du Trizol® (Invitrogen). L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu après retro-transcription d'un µg d'ARN total à l'aide d'une transcriptase reverse SuperScriptII (Invitrogen) et d'hexamères nucléotidiques générés au hasard, selon les recommandations du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée en utilisant le système de détection iCycler iQ (Bio-Rad) et la technologie SYBR Green (Finnzymes Oy). La β -actine a été utilisée comme contrôle endogène afin de valider l'efficacité de l'amplification. Les résultats sont représentés comme expression relative des ARNm par rapport au groupe 'Ctrl' ou au groupe 'DSS'. L'expression relative d'un gène a été calculée par la méthode $\Delta\Delta C_q$.

Les amorces "primers" (Invitrogen) utilisées dans notre étude sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 6: Liste des amorces

Primer sens et antisens	
β -actine	S-CGCAAAGACCTGTATGCCAAT AS- GGGCTGTGATCTCCTTCTGC
FoxP3	S-CAGCTGCCTACAGTGCCCCTAG AS- CATTGCGCAGCAGTGGGTAG
NOS-2	S-CGCAAAGACCTGTATGCCAAT AS- GGGCTGTGATCTCCTTCTGC
CCR-6	S-CCTCACATTCTTAGGACTGGAGC AS- GGCAATCAGAGCTCTCGGA
IL-6	S- GACAACCTTGGCATTGTGG AS- ATGCAGGGATGATGTTCTG
TGF- β	S-CACCGGAGAGCCCTGGATA AS- TGTACAGCTGCCGCACACA
IL-22	S-CTGCCTGCTTCTCATTGCCCTGTG AS-GATGTACGGCTGCTGGAAGTTGG
IL-22R	S-ACA GCT GCC CTG CTT CTT AT AS- ATT TGGGAG TGG AGA GGA TG
IL-33	S-TGAGACTCCGTTCTGGCCTC AS- CTCTTCATGCTTGGTACCCGAT

Abréviations : S :sens ; AS :-anti-sens.

II.3 Dosage plasmatique de l'IFN- γ et de l'IL-22:

Le dosage de l'IFN- γ a été effectué au niveau des plasma des souris BALB/c des différents groupes expérimentaux. Quant au dosage de l'IL-22, il a été réalisé au niveau des plasma des patients atteints de MICI et des donneurs sains. Les mesures ont été réalisées à l'aide de kits spécifiques conformément aux instructions du fabricant. Il s'agit d'un dosage immuno-enzymatique de type sandwich. Les résultats sont exprimés en pg/ml. Le seuil de détection des kits utilisés sont de 2pg/ml pour l'IFN- γ et de 16pg/ml pour l'IL-22.

II.4. Préparation des surnageants de culture des probiotiques et induction des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) :

II.4.1 Préparation des surnageants de culture des probiotiques :

- *Surnageant de culture de Saccharomyces boulardii (sSb) :*

Le surnageant de culture (sSb) a été obtenu après mise en culture de 100mg/ml de *Saccharomyces boulardii* sous forme lyophilisée (Ultralevure®) dans du RPMI1640 pendant 24h à 37°C. Par la suite, la suspension cellulaire a été centrifugée à 10000 rpm pendant 30 min. Le surnageant a été récupéré puis filtré à l'aide d'un filtre à seringue avec une taille de pores de 0,22 μ m afin d'éliminer toutes les cellules de *S. boulardii*.

- *Surnageant de culture de l'Ultrabiotique® (sPro) :*

Les probiotiques ont été mis en culture dans le milieu BHIB à raison de 2×10^8 UFC/ml pendant 24h. À l'issue de cette étape, ils ont été mis en culture pendant 48h, dans du milieu de culture RPMI1640 enrichi avec 20% de SVF et 3% d'inuline. Le surnageant de culture des probiotiques a été récupéré et centrifugé à 10000rpm pendant 1h à +4°C. Il a été ensuite filtré à l'aide d'un filtre à seringue 0,22 μ m.

II.4.2 Récupération et induction des cellules mononuclées du sang périphérique :

La séparation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) a été réalisée sur un gradient de densité, en utilisant du Ficoll-Histopaque®. La densité du Ficoll utilisé ($d=1,077$) est supérieure à celle des PBMCs et inférieure à celle des granulocytes et des érythrocytes. Le sang a été d'abord dilué (V/V) avec du PBS stérile ($pH=7.2-7.4$) puis déposé sur un volume de Ficoll. Après centrifugation à 2800 rpm pendant 15 min, les érythrocytes et les polynucléaires neutrophiles forment un culot au fond du tube, alors que les PBMCs forment un anneau à l'interface du milieu Ficoll. L'anneau de PBMC a été récupéré et a subi un lavage avec du PBS stérile. Les résidus de globules rouges ont été éliminés avec un tampon de lyse ACK suivi d'un autre lavage au PBS stérile. Par la suite, le culot cellulaire a été resuspendu dans un volume approprié de RPMI1640 complet. Après avoir effectué le test de viabilité au bleu de Trypan, les cellules ont été mises en culture à raison de 10^6 cellules/ml en présence et en absence de concentrations décroissantes (dilutions) de surnageants de culture de l'Ultrabiotique® (sPro) et de l'Ultralevure® (sSb) : 1/2, 1/8, 1/32. Les cellules ont été mises en culture à 37°C, sous atmosphère humide en présence de 5% de CO₂. Après 20 à 24h d'incubation, l'état des cellules a été vérifié au microscope à phase inversée. Les surnageants de culture ont été récupérés, centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min et conservés à -40°C pour le dosage ultérieur du NO (Figure 16).

II.5 Dosages des nitrites résiduels dans le plasma et les surnageants de culture des explants coliques par la méthode de Griess modifiée:

La production du NO dans le plasma et les surnageants de culture a été mesurée indirectement à travers la quantification des nitrites (NO₂⁻), métabolites physiologiquement stables du NO par la méthode de Griess modifiée (Touil-Boukoffa *et al.*, 1998). L'échantillon à doser a été mélangé avec les réactifs de Griess et l'eau distillée puis incubé à l'obscurité pendant 15min. Le produit de cette réaction est un colorant azoïque qui absorbe à 543 nm. L'extrapolation de la valeur des DO obtenues sur la courbe étalon $DO = f [NaNO_2]$ établie antérieurement à partir d'une solution mère de NaNO₂ 1Mm, permet de déterminer les concentrations de nitrites résiduels.

Les concentrations de nitrites dans le surnageant de culture des explants coliques des souris ont été normalisées au poids de chaque explant et exprimées en $\mu\text{M}/\text{mg}$.

II.6 Analyse statistique :

Les résultats présentés ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ l'Ecart Standard à la Moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel statistique Graphpad Prism 6.01 (Graphpad Inc). La comparaison statistique entre les différents groupes expérimentaux (Ctrl, Prb, DSS, DSS+Prb) a été réalisée par l'analyse de variance (ANOVA) ou le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Le test de student (*t*-test) et le test non paramétrique de Mann et Whitney ont été utilisés pour la comparaison statistique des taux de cytokines entre les témoins sains et les patients atteints de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique. L'analyse statistique pour mesurer les effets des surnageants de culture de probiotiques *ex vivo* a été réalisée avec le test non-paramétrique de Friedman. Dans l'ensemble des analyses, la différence est considérée comme significative si la valeur du P statistique est inférieure à 0,05.

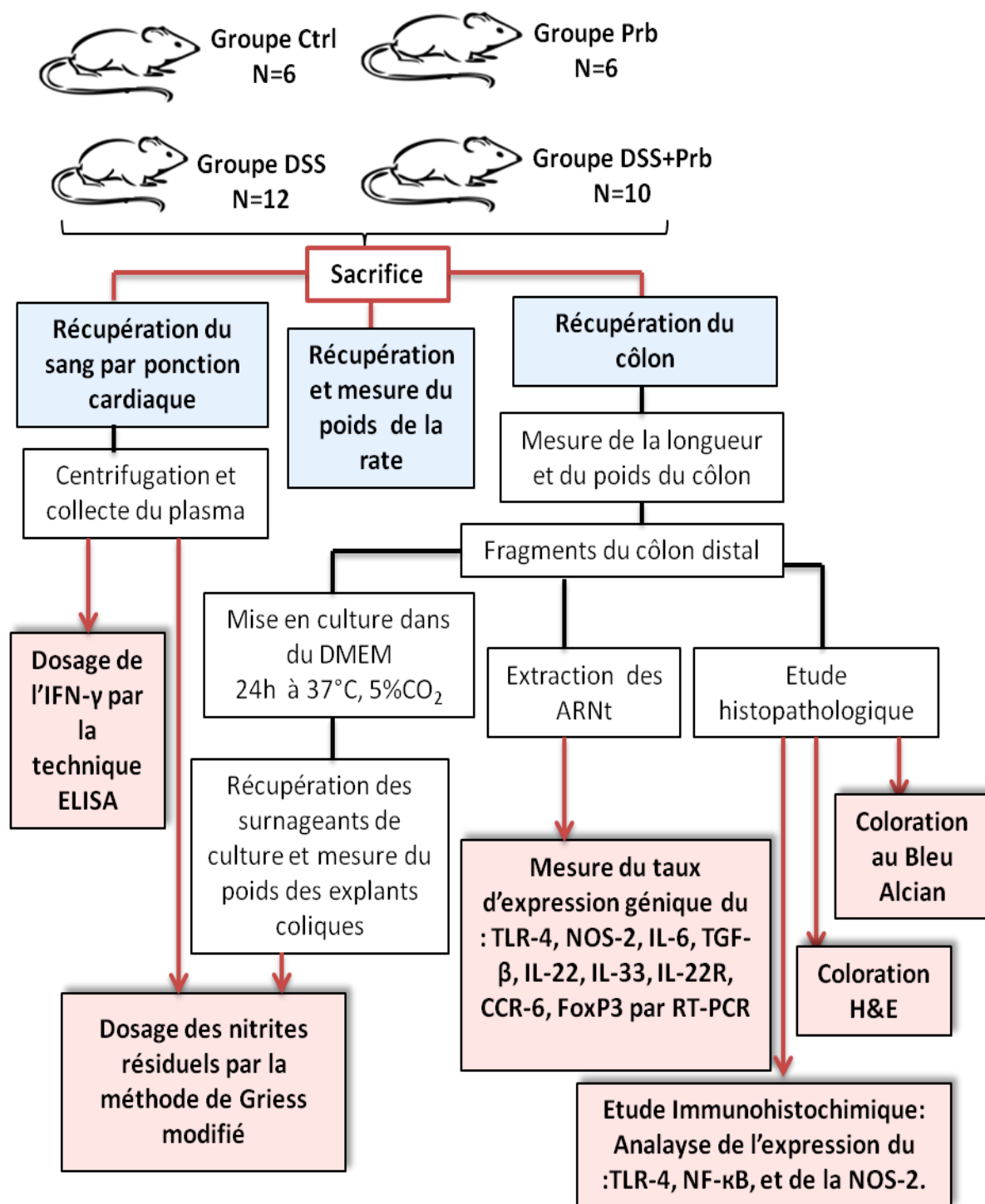


Figure15:Démarche expérimentale suivie dans l'étude de l'effet thérapeutique des probiotiques au cours de la colite expérimentale induite par le DSS.

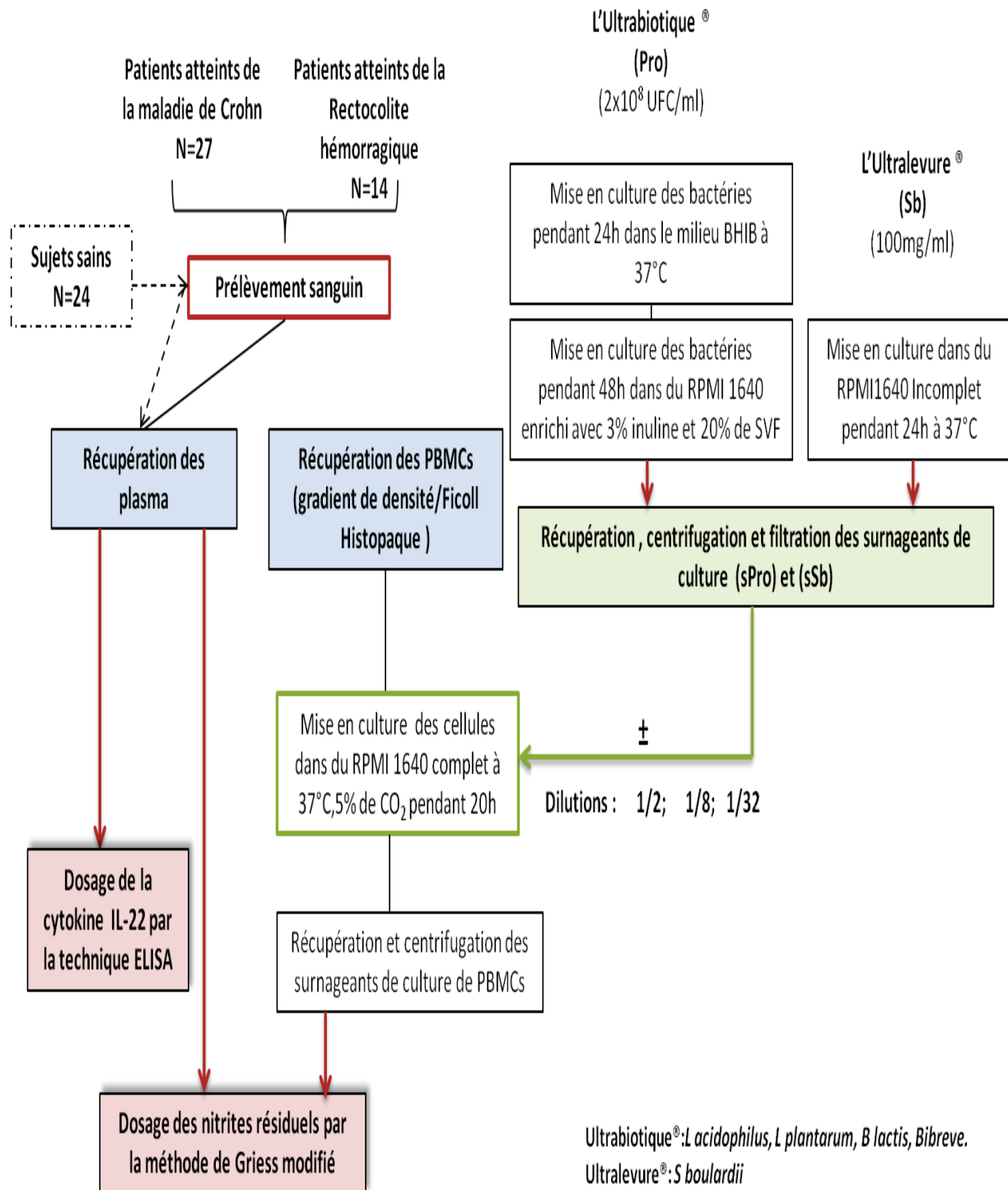


Figure 16: Démarche expérimentale suivie dans l'étude de l'effet des surnageants de culture de l'Ultrabiotique® et de l'Ultralevure® sur la production du NO par les PBMCs de patients atteints de MICI.

Partie III: Résultats et discussion

Partie I : Effets de l'administration thérapeutique des probiotiques sur l'induction de la phase de rémission au cours de la colite expérimentale.

L'observation d'une dysbiose chez les patients atteints de MICI a introduit le concept de thérapie alternative à base de probiotiques (Marteau, 2006). En raison de leurs propriétés régulatrices de l'homéostasie intestinale, de nombreux travaux de recherche se sont intéressés à l'étude de leur rôle dans l'induction et le maintien de la phase de rémission dans les MICI. Bien que leur utilisation comme stratégie thérapeutique semble de plus en plus prometteuse et pourrait être envisagée, leur mécanisme d'action fait l'objet d'amples discussions et de nombreuses investigations d'actualité.

La présente étude s'intègre dans la continuité des travaux menés par notre équipe ayant montré le rôle préventif et immunomodulateur d'un cocktail de probiotiques : l'Ultrabiotique[®], au cours de la colite expérimentale (Abdelouhab *et al.*, 2012 ; Toumi *et al.*, 2013). Dans cette première partie de notre travail, nous avons concentré nos efforts sur l'évaluation de l'efficacité de l'Ultrabiotique[®] dans le traitement de la colite aiguë induite expérimentalement avec le Dextran Sulfate Sodium (DSS) chez des souris BALB/c. Afin d'y parvenir, nous avons dans ce sens, mis au point un modèle de colite sévère qui inclut une phase de rémission. Cette phase permet l'étude des mécanismes de régulation cellulaire ainsi que les processus de réparation tissulaire. Les résultats obtenus dans cette partie de notre travail ont fait l'objet d'une publication internationale (Toumi *et al.*, 2014). Des résultats complémentaires ont également été apportés dans ce manuscrit.

I.1 Étude de l'effet de l'administration thérapeutique des probiotiques (Ultrabiotique[®]) sur l'atténuation des symptômes cliniques de la colite :

Dans notre étude, la période expérimentale s'est étendue sur dix jours (de J0 à J10) (Figure 17A). Tout au long de cette période, nous avons suivi l'évolution de la colite en nous basant sur un ensemble de paramètres cliniques (DAI et variation du poids corporel). Le DAI rassemble les scores de la perte de poids, les saignements rectaux et la consistance des selles qui reflètent la sévérité de l'inflammation. La variation du poids corporel indique la persistance de l'inflammation (Murthy *et al.*, 1993).

L'administration de 3% de DSS dans l'eau de boisson des souris pendant 5 jours (de J0 à J4) a induit une colite aigue sévère. Après seulement 24h, de nombreux symptômes cliniques sont apparus chez les souris du groupe 'DSS' : fatigue, poils hérissés ainsi que l'apparition de selles molles. À partir de J3, un début de saignement rectal a été observé. À la fin de la période d'induction de la colite aigue, c'est-à-dire J5, toutes les souris du groupe 'DSS' souffraient d'une diarrhée hémorragique ainsi que d'une importante perte de poids (Figure 17B). Par conséquent, un DAI élevé a été enregistré dans ce groupe (Figure 17 C).

À partir de J5, nous avons arrêté l'apport du DSS dans l'eau de boisson des souris pour induire une phase de rémission ou de « récupération » (Figure 17A). Cette période s'est étendue de J5 jusqu'à J10. Les souris du groupe 'DSS' ont continué à présenter un DAI élevé ainsi qu'une évolution négative du poids corporel et ce, malgré l'absence de DSS dans leur eau de boisson (Figure 17 B, C). De plus, comme indiqué dans la figure 17D, un taux de mortalité de 50% a été enregistré dans ce groupe. Ainsi, il apparaît clairement que dans nos conditions expérimentales, les souris du groupe 'DSS' ont développé une colite sévère dont les processus inflammatoires ne semblent pas s'atténuer durant la phase de rémission.

Le traitement des souris du groupe 'DSS+Prb' par les probiotiques a débuté à J3. Ce jour coïncide avec l'apparition des saignements rectaux et l'accentuation des symptômes cliniques. De J0 à J4, nous avons observé une similitude dans l'évolution du DAI et du poids corporel des souris du groupe 'DSS' et celles appartenant au groupe 'DSS+Prb' (Figure 17 B, C). Le traitement des souris par les probiotiques a induit une amélioration de l'état général des souris du groupe 'DSS+Prb' en comparaison avec le groupe 'DSS'. En effet, nous avons remarqué une atténuation rapide des saignements rectaux ainsi qu'une évolution positive du poids corporel (Figure 17B). De même, une diminution significative du DAI a été observée (Figure 17C)($p < 0.01$). Par ailleurs, nous avons également relevé une amélioration du taux de survie dans ce groupe (Figure 17D).

Les souris du groupe 'Prb,' traitées uniquement par les probiotiques, n'ont montré aucun signe particulier.

Les observations cliniques relatives aux signes et aux symptômes de la colite nous permettent, dores et déjà, de suggérer l'instauration d'un effet bénéfique des probiotiques à travers l'induction et l'accélération de la phase de rémission.

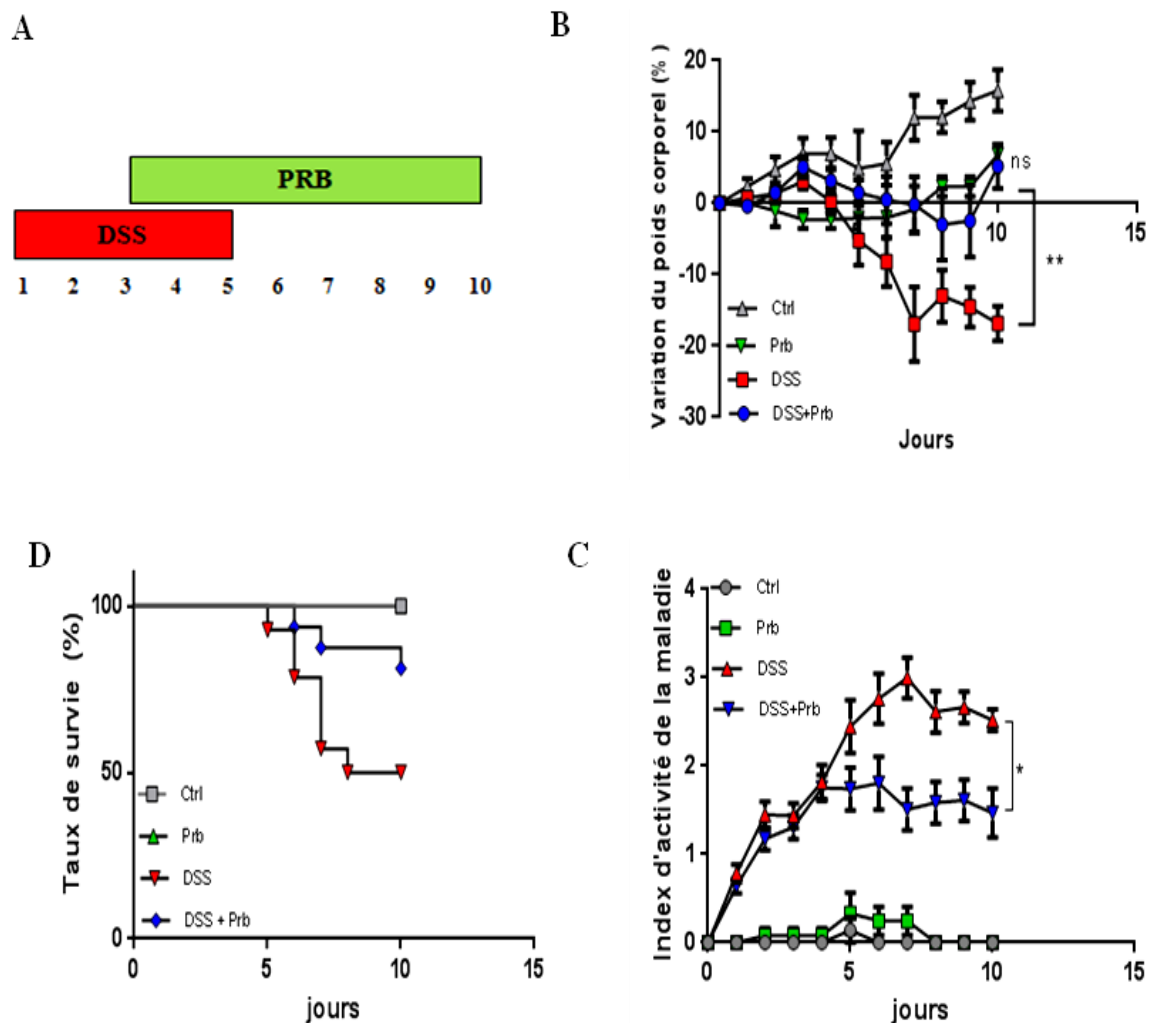


Figure 17: Effet des probiotiques sur l'amélioration des symptômes cliniques chez les souris BALB/c. A) Plan expérimental ; B) Variation du poids corporel (%); C) Index d'Activité de la Maladie (DAI). D) taux de survie (%) Ctrl (n=6): groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; DSS (n=12) : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; DSS+Prb (n=10): lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; Prb (n=6): lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (ns : $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

I.2 Etude de l'effet des probiotiques sur la réparation des dommages tissulaires et sur le renforcement de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal:

I.2.1 Etude de l'effet thérapeutique des probiotiques sur les altérations macroscopique du côlon :

La variation de la longueur et du poids du côlon constitue un indicateur important de l'atteinte colique. Ainsi, après sacrifice des souris à J10, les côlons ont été soigneusement prélevés pour les analyses macroscopiques et microscopiques (Figure 18A).

L'administration du DSS a induit une diminution hautement significative de la longueur du côlon des souris du groupe 'DSS' ($p < 0.0001$). En effet, nous avons enregistré une longueur moyenne de 4.97 ± 0.35 cm dans ce groupe alors que la longueur moyenne du côlon enregistrée dans le groupe 'Ctrl' était de 8.78 ± 0.26 cm. De plus, le poids relatif du côlon du groupe 'DSS' était significativement élevé par rapport au groupe 'Ctrl' ($p < 0.001$) (Figure 18 B, C). Ces résultats concordent avec les observations cliniques et suggèrent la persistance de l'atteinte colique chez les souris du groupe 'DSS', notamment du point de vue histologique.

L'évaluation de la longueur et du poids du côlon chez les souris du groupe 'DSS+Prb' a révélé une longueur moyenne du côlon significativement élevée (7.5 ± 0.37 cm vs 4.97 ± 0.35 cm ; $p < 0.001$) et, au contraire, un poids relatif du côlon significativement bas ($p < 0.05$) par rapport au groupe 'DSS'. Comparativement au groupe 'Ctrl', nous avons noté avec intérêt l'absence de différences significatives dans la longueur et le poids relatif du côlon du groupe 'DSS+Prb' (Figure 18 B, C) ($p > 0.05$). Ces résultats seraient en faveur d'une amélioration des altérations histologiques suite au traitement des souris par les probiotiques.

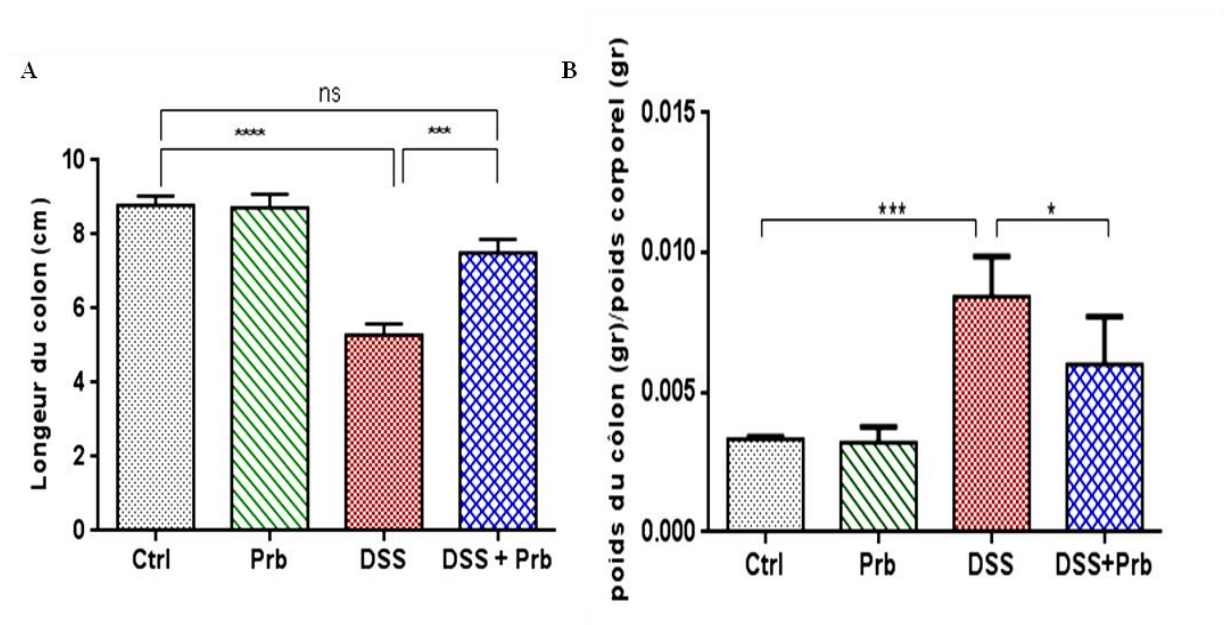


Figure18: Effet des probiotiques sur les altérations macroscopiques du côlon.

A) Moyenne de la longueur du côlon, **B)** Poids relatif du côlon/poids corporel. **Ctrl (n=6):** groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; **DSS (n=6) :** lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; **DSS+Prb (n=8) :** lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; **Prb (n=6):** lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (ns : $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

I.2.2 Etude de l'effet thérapeutique des probiotiques sur les altérations microscopiques du côlon :

- *Etude histologique*

Au cours de notre étude, nous avons employé une coloration de routine, l'hématoxyline et l'éosine afin de vérifier l'effet de l'administration des probiotiques sur la structure de l'épithélium intestinal et l'infiltrat inflammatoire.

Les altérations tissulaires observées dans la colite expérimentale induite par le DSS sont similaires à celles retrouvées dans la RCH survenant chez l'humain ; c'est-à-dire, une architecture de la muqueuse profondément endommagée où siègent des abcès cryptiques et un important infiltrat inflammatoire hétérogène.

La figure 19 indique les scores histologiques retrouvés chez les différents groupes expérimentaux après analyse de l'ensemble des lames histologiques. Les critères utilisés pour l'analyse histologique sont la présence de l'infiltrat inflammatoire et l'étendue des lésions tissulaires.

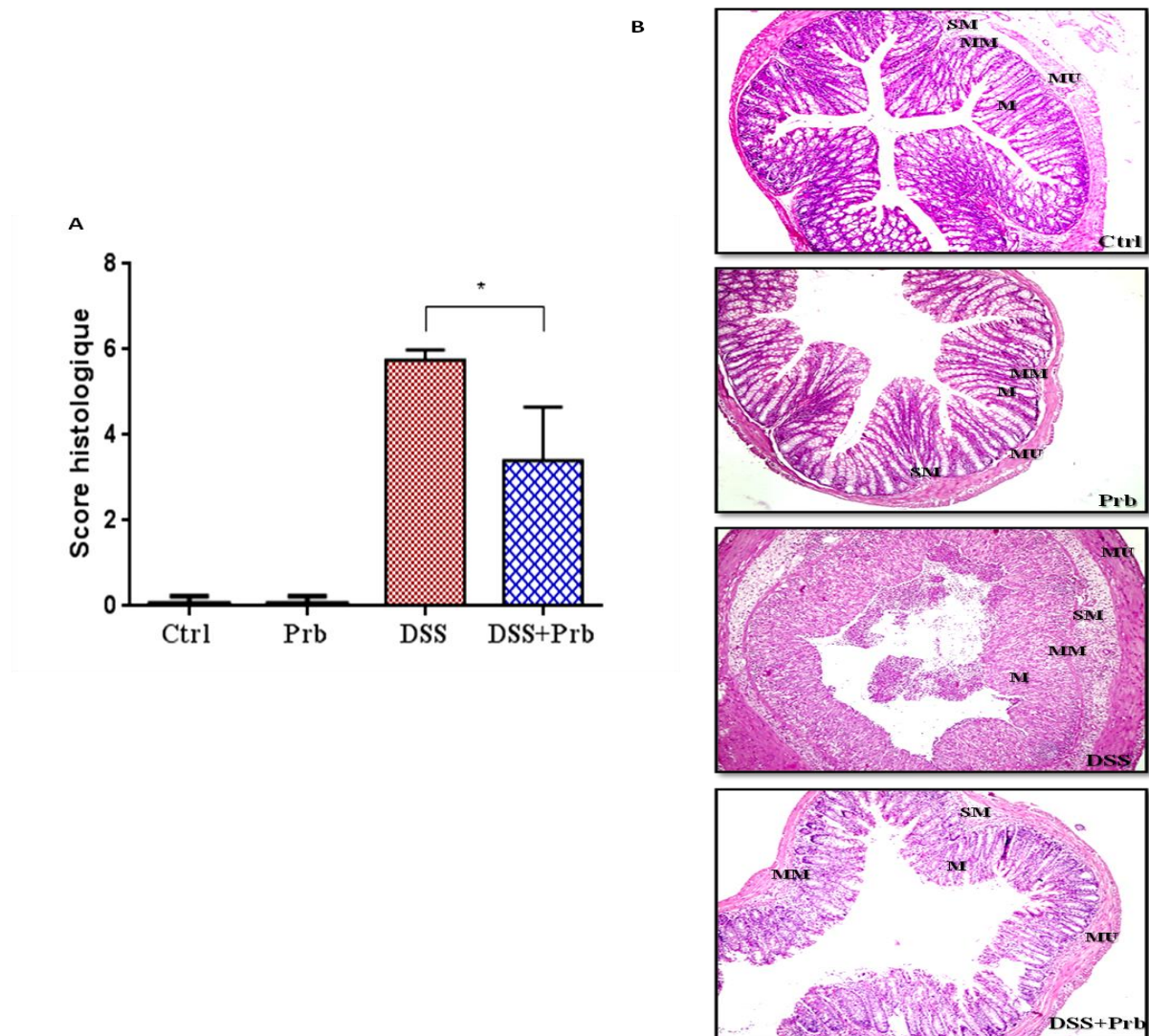


Figure19: Score de l'analyse histologique du côlon.

A) Score histologique **B)** photomicrographies montrant de la structure histologique du côlon à faible grossissement (**GX10**). **Ctrl (n=6)**: groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; **DSS (n=6)** : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; **DSS+Prb (n=8)** : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; **Prb (n=6)**: lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (Muqueuse (**M**), musculaire muqueuse (**MM**), sous muqueuse (**SM**) et musculature (**MU**) ; *p<0.05)

L'observation microscopique des fragments coliques des souris du groupe 'Ctrl' montre une organisation architecturale bien conservée. Cette organisation se présente sous forme de couches constituées de l'intérieur vers l'extérieur par: la muqueuse (M), la musculaire muqueuse (MM), la sous-muqueuse (SM) et la musculuse (MU), comme indiqué sur les figures 19A et 20A1. Au niveau de la muqueuse, l'épithélium s'invagine pour former les cryptes ou glandes de Lieberkühn (Figure 20 A2) qui sont soutenues par la lamina propria (chorion). Celle-ci est parsemée d'une faible quantité de cellules mononuclées. Les cryptes sont composées de plusieurs types de cellules dont les cellules caliciformes productrices de mucus (figure 20 A2).

Un score histologique maximal a été attribué aux souris du groupe 'DSS' (Figure 19A). En effet, l'examen histologique du côlon de ces souris a révélé une architecture tissulaire profondément altérée comparativement aux souris du groupe 'Ctrl'. L'administration du DSS a provoqué de nombreuses altérations tels que la perte complète des cryptes, la formation d'œdèmes sous muqueux, l'atrophie de la muqueuse colique ainsi qu'un épaissement de la musculuse. Une perte complète de l'épithélium bordant la lumière intestinale, une déplétion des cellules caliciformes ainsi qu'un infiltrat inflammatoire hétérogène très dense constitué notamment de cellules poly-morpho-nucléaires, de lymphocytes et de plasmocytes ont été retrouvés chez toutes les souris du groupe 'DSS'. En outre, nous avons également noté la formation d'abcès cryptiques (présence de neutrophiles dans la lumière des cryptes) au niveau de la muqueuse colique des souris du groupe 'DSS'. À l'échelle macroscopique, ces modifications se traduisent vraisemblablement par le raccourcissement significatif de la longueur du côlon.

L'examen microscopique des fragments coliques provenant des souris du groupe 'DSS+Prb' a révélé une meilleure organisation tissulaire du côlon en comparaison avec le groupe 'DSS'. Cette amélioration s'est traduite par une diminution significative du score histologique en comparaison avec le groupe DSS ($p < 0.05$) (Figure 19A). Comme nous le montre les figures 20 D1, D2 et D3, la muqueuse colique du groupe 'DSS+Prb' est bien stratifiée et présente de nombreux signes de réparation tissulaire et de restauration de la barrière épithéliale. En effet, nous avons noté avec intérêt la présence d'un aspect régénératif des cryptes ainsi qu'une ré-épithélialisation de la muqueuse colique.

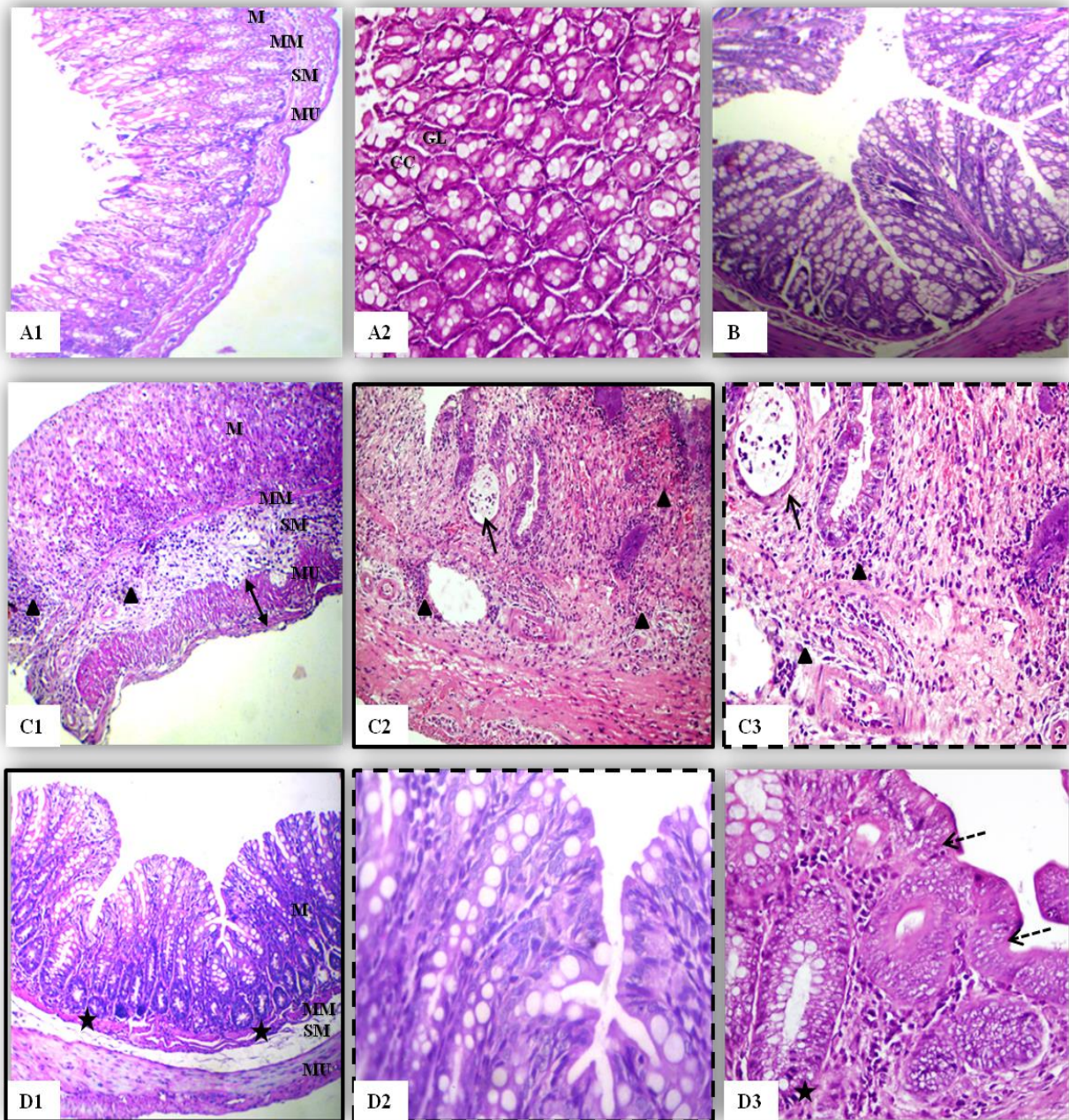


Figure 20: Photomicrographies de la structure histologique du côlon distal.

(A1, Gx100) groupe 'Ctrl' : coupe longitudinale au niveau de la paroi colique. (A2, Gx400) : coupe transversale de la muqueuse montrant les glandes de Lieberkühn (GL) et les cellules caliciformes CC) ; (B, Gx100) : groupe Prb ; (C1, Gx100 ; C2, Gx200 ; C3, Gx400) : groupe 'DSS' : altération étendue de la muqueuse (M), épaissement de la musculature (MU) ($\longleftrightarrow$), présences d'infiltrat cellulaire dans la muqueuse et sous muqueuse (SM) ($\blacktriangleright$), déplétion des cellules caliciformes et présence d'abcès cryptiques ($\rightarrow$) (D1, GX100 ; D2, GX400xZn ; D3, GX400) groupe DSS+Prb : organisation architecturale stratifiée, aspect régénératif des glandes au niveau de la muqueuse ($\star$), ré-épithélialisation de la muqueuse ($\dashrightarrow$) (Coloration hématoxyline-éosine ; Zn : Zoom numérique, (MM) ; musculature muqueuse)

Par ailleurs, nous avons noté, une diminution de l'infiltrat inflammatoire au niveau du chorion ainsi que l'absence d'œdèmes sous muqueux chez les souris du groupe 'DSS+Prb' (Figure 20 D1). L'atténuation de l'inflammation colique chez ces souris serait due probablement aux propriétés anti-inflammatoires des probiotiques exercées au niveau du côlon.

Enfin, l'examen histologique des fragments coliques provenant des souris saines traitées uniquement par les probiotiques (groupe 'Prb') n'a montré aucune différence en comparaison avec les souris du groupe 'Ctrl' (figure 19, 20B).

I.2.3 Etude de l'effet des probiotiques sur la production du mucus par les cellules caliciformes au cours de la colite expérimentale :

Étant une composante intégrante de la barrière épithéliale intestinale, le mucus joue un rôle pivot dans la protection de l'organisme contre l'invasion bactérienne et dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal. Cependant, dans les MICI et en particulier dans la RCH, la couche de mucus est endommagée (Larsson *et al.*, 2011). Afin de mettre en évidence l'influence des probiotiques sur la production du mucus par les cellules caliciformes, nous avons procédé à la coloration spécifique au bleu Alcian qui donne une teinte bleuâtre aux mucines.

L'analyse microscopique du côlon des souris du groupe 'DSS' a montré une coloration bleue "quasiment" absente au niveau de la muqueuse (Figure 21 C1, C2) en comparaison avec le groupe "Ctrl" (Figure 21 A). Cette observation indique la perte des glandes de Lieberkühn et la déplétion des cellules caliciformes au niveau de la muqueuse colique suite au traitement des souris par le DSS. Ces données confirment l'installation d'une colite sévère chez les souris de ce groupe. Ils nous permettent également de suggérer que les processus anti-inflammatoires nécessaires à la résolution de l'inflammation ainsi que les mécanismes de réparation tissulaires sont insuffisants pour atténuer la colite.

Par rapport au groupe 'DSS', nous avons noté avec intérêt, la présence d'un nombre important de cellules sécrétrices de mucus au niveau de la muqueuse colique des souris appartenant au groupe 'DSS+Prb' (Figure 21 D1, D2). Ces résultats concordent avec ceux

rapportés dans notre précédente étude (Toumi *et al.*, 2013). Ils confirment une fois de plus, l'implication bénéfique des probiotiques dans le renforcement de la barrière épithéliale.

En outre, nous avons observé une très forte coloration au bleu Alcian chez les souris du groupe 'Prb' en comparaison avec le groupe 'Ctrl' traduisant une très forte production de mucus (Figure 21 B).

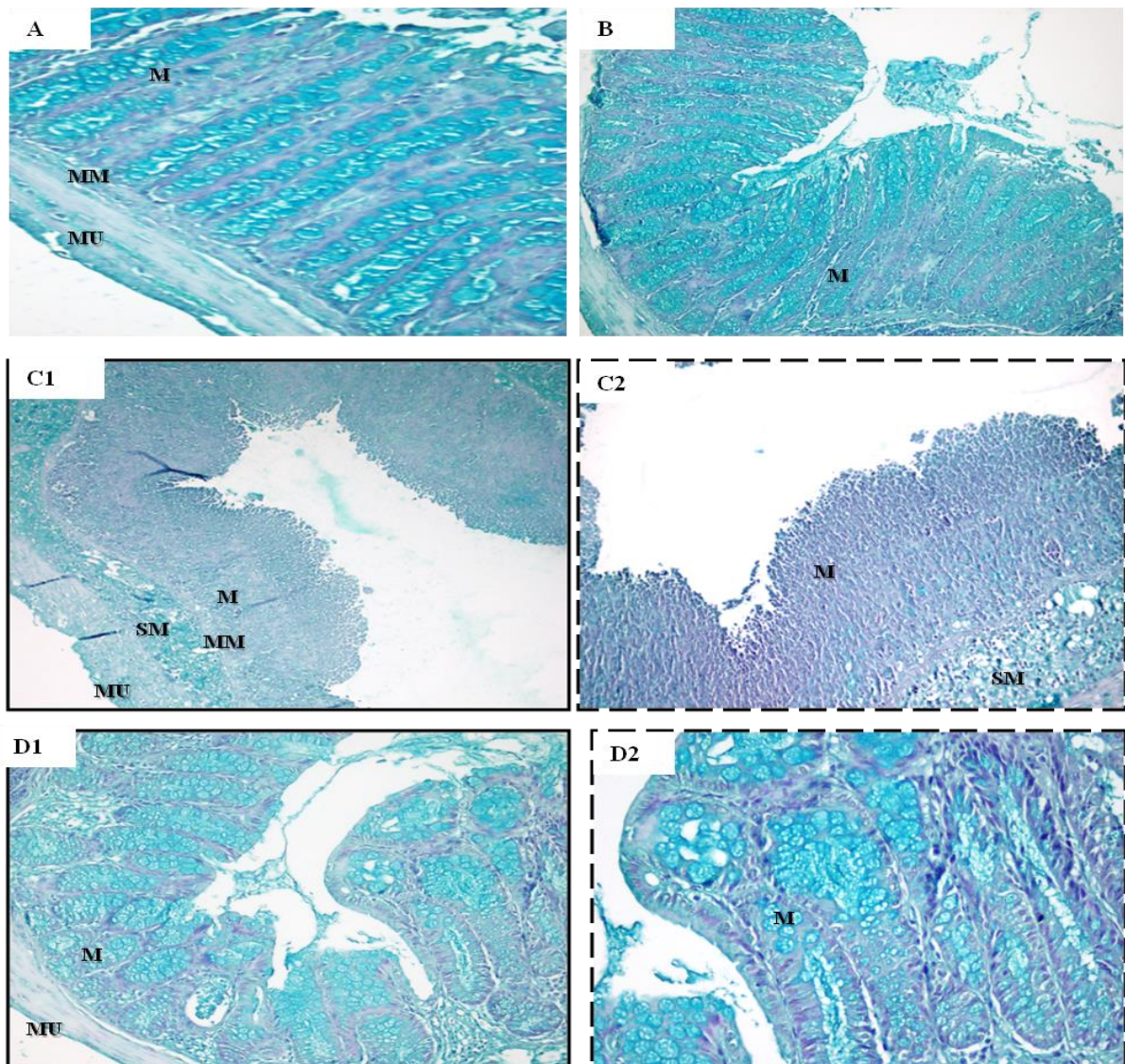


Figure21: Photomicrographies représentatives de la production du mucus au niveau du côlon distal. (A, Gx400) groupe Ctrl ; (B, Gx100) groupe Prb ;(C1, Gx100 ; C2, Gx200) Groupe DSS ;(D1, Gx200 ; Gx400) groupe DSS+Prb. (Muqueuse (M), musculaire muqueuse (MM), sous muqueuse (SM) et musculature (MU).

I.2.4. Etude de l'effet des probiotiques sur l'expression génique de l'IL-22, de son récepteur IL-22R et de l'IL-33 :

De nombreuses études ont suggéré l'implication des cytokines IL-22 et IL-33 dans les mécanismes de réparation et cicatrisation des lésions tissulaires intestinales. Ces dernières semblent promouvoir la régénération des cellules épithéliales et la restitution des cellules caliciformes (Li *et al.*, 2014 ; Groß *et al.*, 2012). De ce fait, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence des probiotiques sur leur expression au niveau du côlon distal.

En raison de la faible reproductibilité des dosages de cytokines dans les homogénats tissulaires par la technique ELISA, nous avons procédé à des dosages par RT-PCR à partir des ARN extraits du côlon distal.

- ***Expression génique de l'IL-22 et de l'IL-22R :***

Les figures 22A et 22B montrent respectivement le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-22 et de son récepteur IL-22R chez les différents groupes expérimentaux.

Comparativement au groupe 'Ctrl', aucune différence significative dans le taux d'expression des transcrits de l'IL-22 n'a été observée chez les souris du groupe 'DSS' (Figure 22A). En revanche, nous avons enregistré une augmentation significative de l'expression des transcrits de son récepteur IL-22R, au niveau du côlon distal des souris du groupe 'DSS' ($p < 0.05$).

Les souris traitées par des probiotiques (groupe 'DSS+Prb') ont montré de manière intéressante, des taux élevés des transcrits de l'IL-22 comparaison faite avec le groupe 'DSS' et le groupe 'Ctrl' (Figure 22A). La différence reste cependant statistiquement non significative. Nous avons également enregistré une augmentation très significative des transcrits de l'IL-22R chez ces souris comparativement au groupe 'Ctrl' (Figure 22B) ($p < 0.01$).

Par ailleurs, une augmentation concomitante de l'ARNm de l'IL-22 ($p < 0.05$) et de son récepteur (IL-22R) a été observée chez les souris du groupe 'Prb' en comparaison avec le groupe 'Ctrl' (Figure 22A, B).

La production insuffisante de l'IL-22 durant la phase de rémission chez les souris du groupe 'DSS' retarde probablement, la régénération des cryptes et la production du mucus qui est essentielle au maintien de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.

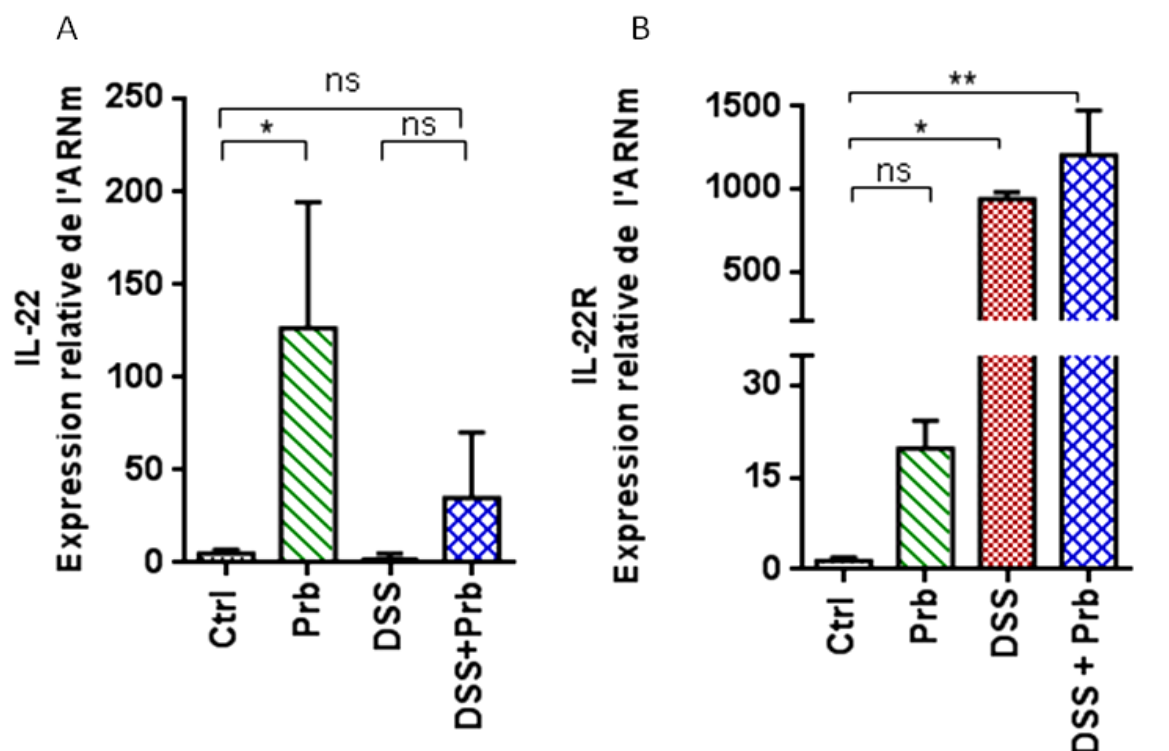


Figure 22: Expression relative de l'ARNm de l'IL-22 (A) et de son récepteur IL-22R (B) au niveau du côlon distal.

Ctrl (n=4): groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; **DSS (n=4) :** lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; **DSS+Prb (n=4) :** lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; **Prb (n=4):** lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

- **Expression génique de l'IL-33 :**

L'analyse de des taux d'expression des transcrits de l'IL-33 au niveau du côlon des souris du groupe 'DSS' et du groupe 'Ctrl' n'a pas montré de différence significative ($p > 0.05$). En revanche, chez les souris du groupe 'DSS+Prb', nos résultats ont révélé une surexpression du gène codant l'IL-33. À ce titre, il est intéressant de noter une augmentation significative des transcrits de l'IL-33 dans le groupe 'DSS+Prb' par rapport au groupe 'DSS' et au groupe 'Ctrl' ($p < 0.05$) (Figure 23).

Par ailleurs, la comparaison des taux de l'expression génique de l'IL-33 entre les souris du groupe 'Prb' et les souris du groupe 'Ctrl' a montré une augmentation non significative des taux de transcrits de l'IL-33 ($p > 0.05$) (Figure 23).

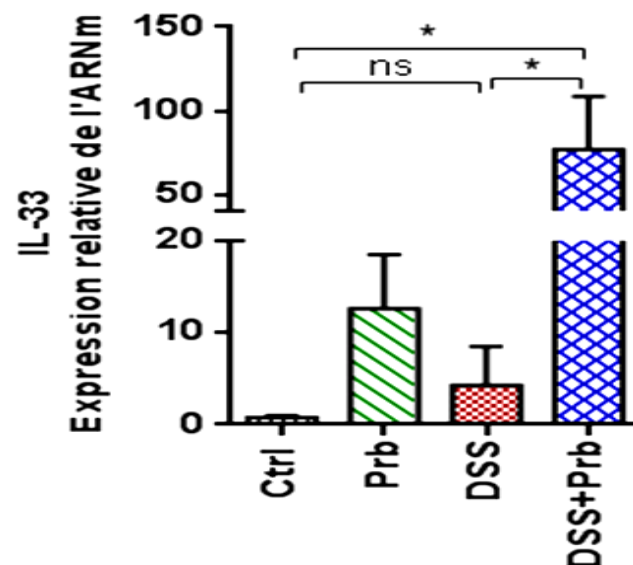


Figure 23: Expression relative de l'ARNm du récepteur IL-33 au niveau du côlon distal. Ctrl (n=4): groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; DSS (n=4) : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; DSS+Prb (n=4) : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; Prb (n=4): lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$).

Compte tenu des résultats obtenus et représentés ci-dessus, nous pouvons suggérer que la régulation de l'expression de l'IL-22 et de l'IL-33 au niveau du côlon figure parmi les mécanismes déployés par les probiotiques pour initier les processus de réparation tissulaire.

I.3 Étude des propriétés immunomodulatrices des probiotiques sur la réponse immunitaire locale :

L'altération de la barrière épithéliale par le DSS favorise l'intrusion des bactéries et des antigènes luminaux dans le chorion. La reconnaissance de ces antigènes par différents récepteurs tels que les TLRs induirait l'activation de nombreuses voies de signalisation, notamment la voie NF- κ B et la libération de différents médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et le NO (Kawai et Akira, 2010). La surexpression de ces médiateurs pro-inflammatoires contribuerait à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et à l'apparition des lésions tissulaires dans les MICI. Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet immunomodulateur des probiotiques en ciblant l'expression de ces différents acteurs de la réponse immunitaire.

I.3.1 Effet des probiotiques sur l'expression du TLR-4 au niveau du côlon distal:

A) Etude de l'expression génique du TLR-4 :

L'étude de l'expression génique du TLR-4 a été réalisée par RT-PCR à partir des ARNm extraits du côlon distal.

Comme indiqué dans la figure 24A, l'analyse des transcrits a révélé une surexpression hautement significative des transcrits du TLR-4 chez les souris du groupe 'DSS' en comparaison avec les souris du groupe 'Ctrl' ($p < 0.01$). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Giahi et al ayant rapporté une surexpression du gène codant le TLR-4 au cours de la colite expérimentale induite par le DSS (Giahi *et al.*, 2012).

En revanche, le traitement des souris avec les probiotiques (groupe 'DSS+Prb') a induit une diminution significative de l'expression génique du TLR-4 en comparaison avec le groupe 'DSS' ($p < 0.05$) (Figure 24B). Par ailleurs, le traitement des souris « saines » uniquement avec des probiotiques (groupe 'Prb') a induit une augmentation non significative de l'ARNm du TLR-4 au niveau du côlon en comparaison avec le groupe 'Ctrl' ($p > 0.05$) (Figure 24A).

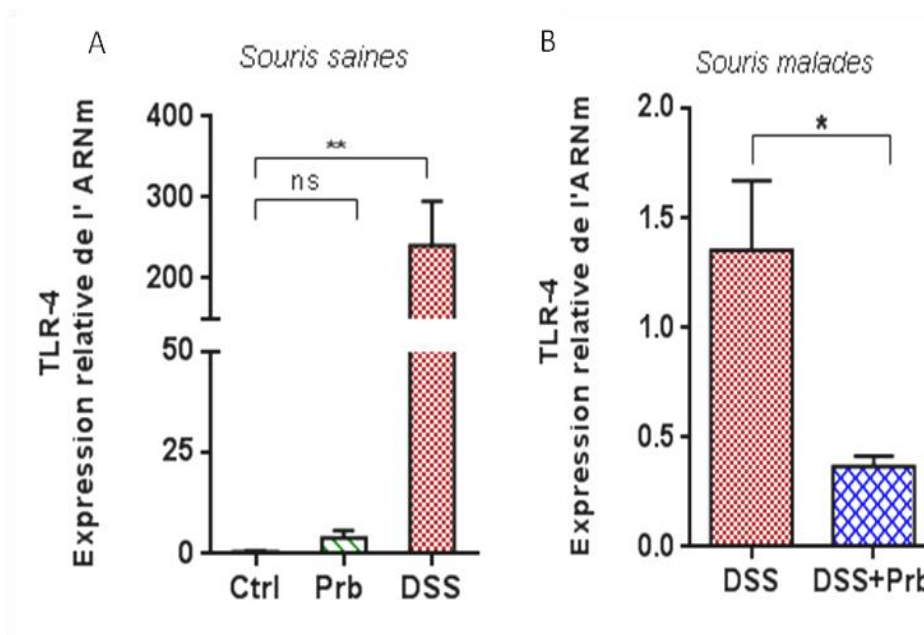


Figure 24: Expression relative de l'ARNm du TLR-4 au niveau du côlon distal.

A) Evaluation de l'effet de l'administration du DSS et des probiotiques à des souris témoins « souris saines » ; **B)** Evaluation de l'effet des probiotiques administrés aux souris atteintes d'une colite induite par le DSS « souris malades ». **Ctrl (n=4)**: groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; **DSS (n=4)** : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; **DSS+Prb (n=4)** : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; **Prb (n=4)** : lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

B) Etude de l'expression *in situ* du TLR-4 par immunofluorescence :

Les données obtenues à partir de l'étude de l'expression *in situ* du TLR-4 chez les différents groupes expérimentaux s'alignent avec les résultats de l'analyse transcriptomique, rapportés ci-dessus. En effet, l'immunomarquage du TLR-4 au niveau du côlon distal a révélé une forte expression de ce récepteur chez les souris du groupe 'DSS' par rapport aux souris du groupe 'Ctrl' (Figure 25 C1). De plus, comme le montre la figure 25 C2, l'immunoréactivité du TLR-4 (révélée par l'immunofluorescence) est particulièrement intense au niveau de la lamina propria où l'infiltrat inflammatoire est très dense.

Comparativement au groupe 'DSS', nous avons constaté chez les souris traitées par les probiotiques (groupe 'DSS+Pr') une baisse considérable de l'immunofluorescence. Cette observation reflète la diminution de l'expression du TLR-4 au niveau de la muqueuse (Figure 25 D1), mais aussi au niveau de la lamina propria (Figure 25D2). Par ailleurs,

aucune différence notable n'a été relevée chez les souris du groupe 'Prb' par rapport au groupe 'Ctrl' (Figure 25B).

Les résultats obtenus nous permettent de suggérer que les probiotiques exercent un rôle anti-inflammatoire à travers l'engagement d'un mécanisme impliquant la régulation négative de l'expression du TLR-4.

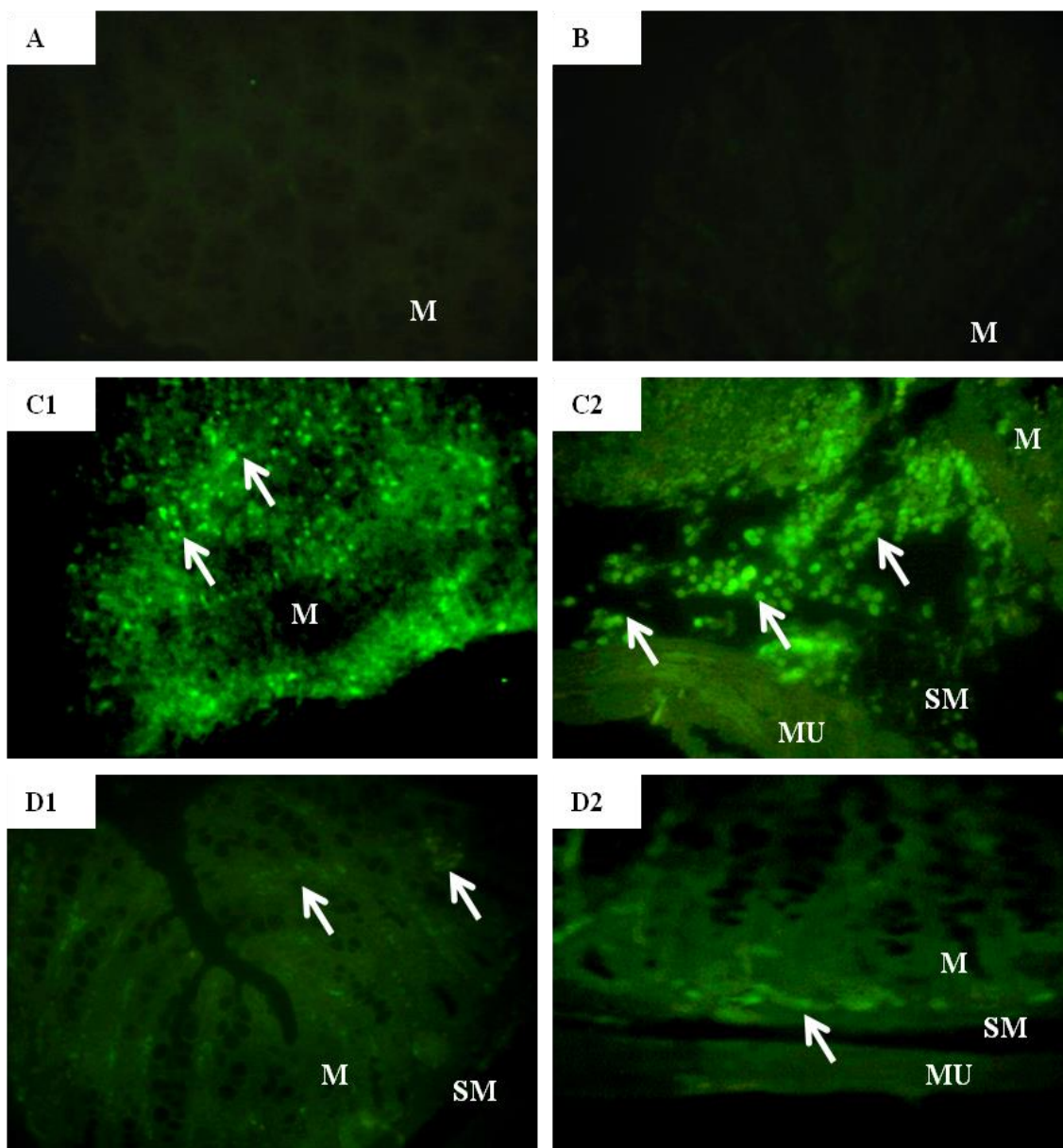


Figure 25: Etude de l'expression *in situ* du TLR-4 au niveau du côlon distal. (A) groupe Ctrl ; (B) groupe Prb. (C1, C2) groupe DSS ; (D1, D2) groupe DSS+Prb. (Gx200. (—→) : Immunoréactivité du TLR-4 ; Muqueuse (M) ; sous muqueuse (SM).

I.3.2 Etude de l'effet des probiotiques sur la voie de signalisation intracellulaire NF- κ B :

En tenant compte des résultats obtenus, il est probable que l'effet anti-inflammatoire des probiotiques implique également une régulation négative de la voie de signalisation NF- κ B. De ce fait, nous avons réalisé une étude immuno-histochimique sur les fragments coliques des souris afin de déterminer l'expression de ce facteur chez les différents groupes expérimentaux.

La figure 26 C1 montre la présence d'une forte expression de la sous unité P65 du NF- κ B au niveau de la muqueuse colique des souris du groupe 'DSS'. Comme pour les résultats de l'immuno-marquage du TLR-4, une forte expression du facteur de transcription NF- κ B a été observée au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse (Figure 26 C2). Nos résultats concordent avec les travaux récents ayant démontré une surexpression du NF- κ B au cours de la colite expérimentale induite par le DSS (Dou *et al.*, 2013; Soufli *et al.*, 2015). Dans ce contexte, nous avons également noté la présence d'une faible immunoréactivité au niveau de la lamina propria des souris des groupes 'Ctrl' (Figure 26A) et 'Prb' (Figure 26B)

Concernant les souris du groupe 'DSS+Prb', nos résultats mettent en évidence une nette régression de l'expression de la sous unité P65 du NF- κ B en comparaison avec les souris du groupe 'DSS' (Figure 26 D1, D2). Ces résultats nous permettent de suggérer que l'Ultrabiotique® a exercé un effet anti-inflammatoire en interférant avec la voie d'activation de ce facteur.

Rappelons que le NF- κ B induit l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires ainsi que des médiateurs pro-inflammatoires, notamment l'enzyme inductible NOS-2 responsable de la production accrue de monoxyde d'azote (NO) (Caamano et Hunter, 2002).

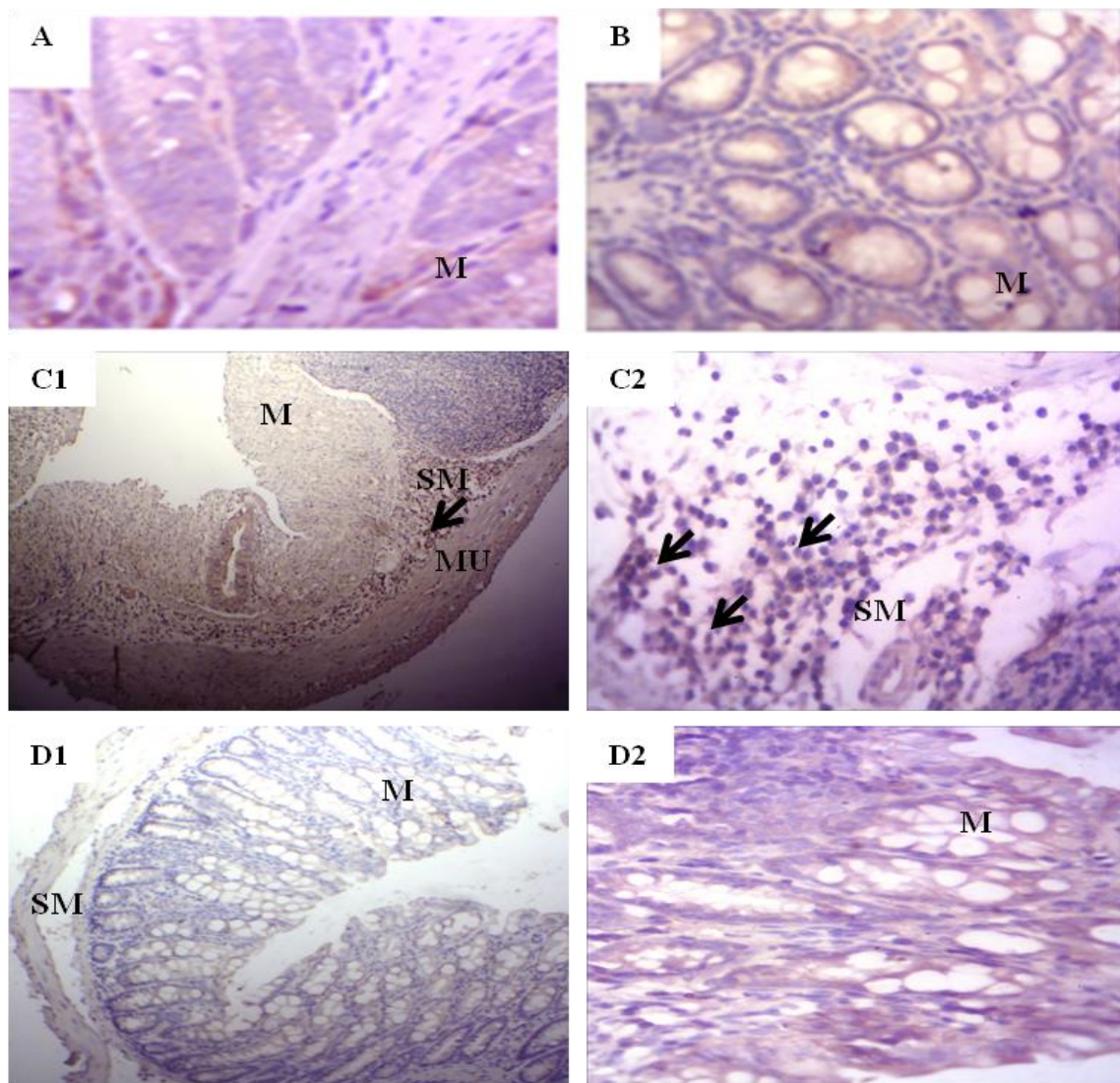


Figure 26: Etude de l'expression du NF- κ B au niveau du côlon. (A) groupe Ctrl ; (B) groupe Prb ; (C1 Gx100, C2 Gx400) groupe DSS ; (D1 x100, D2 Gx400) groupe DSS+Prb. ((→) immunomarquage positif ; Muqueuse (M) ; sous muqueuse (SM) ; Zn : Zoom numérique)

I.3.3 Etude de l'effet des probiotiques sur le système NOS-2/NO:

L'activation de la NOS-2 est régulée positivement au niveau transcriptionnel par plusieurs facteurs, notamment les cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α), le LPS et de nombreux composants bactériens ou viraux. Son expression est principalement induite après activation du facteur de transcription NF- κ B (Ignarro, 2000; Lowenstein *et al.*, 1998)

Les études menées par notre équipe sur des patients atteints de MICI ont mis en exergue le rôle délétère du monoxyde d'azote durant les phases de poussées et de rémissions survenant au cours des MICI (Rafa *et al.*, 2010 ; 2013). De même, nos travaux antérieurs conduits dans le même sens ont mis en évidence l'implication du monoxyde d'azote dans la survenue des lésions tissulaires au cours de la colite expérimentale induite par le DSS (Abdelouheb *et al.*, 2012 ; Toumi *et al.*, 2013 ; Soufli *et al.*, 2015). Dans la présente étude, nous avons voulu situer l'implication de ce bio-marqueur durant la phase de rémission de la colite aigue induite par le DSS. Nous nous sommes également penchés sur l'influence de l'administration thérapeutique des probiotiques sur sa modulation. Ainsi, nous avons étudié l'expression la NOS-2 au niveau du côlon distal des souris des différents groupes expérimentaux. Enfin, nous avons également cherché à déterminer le niveau de production local du NO sur un système *ex vivo* réalisé sur culture d'explants coliques.

A) Etude de l'expression génique de la NOS-2 :

L'analyse des transcrits a révélé une surexpression hautement significative du gène codant la NOS-2 chez les souris du groupe 'DSS' en comparaison avec les souris du groupe 'Ctrl' ($p < 0.01$) (Figure 27A).

La comparaison des taux d'expression génique de la NOS-2 chez les souris des groupes 'DSS' et 'DSS+Prb' a montré une différence significative. En effet, comme indiqué dans la figure 27 B, le taux d'expression de la NOS-2 chez les souris du groupe 'DSS+Prb' traitées par les probiotiques est nettement inférieur à celui retrouvé chez les souris du groupe 'DSS' ayant reçu uniquement de l'eau de boisson durant la phase de rémission. ($p < 0.05$).

Par ailleurs, l'administration des probiotiques seuls a également induit une augmentation des transcrits de la NOS-2 chez les souris du groupe 'Prb'. Cette augmentation demeure cependant statistiquement non significative ($p > 0.05$) (Figure 27 A).

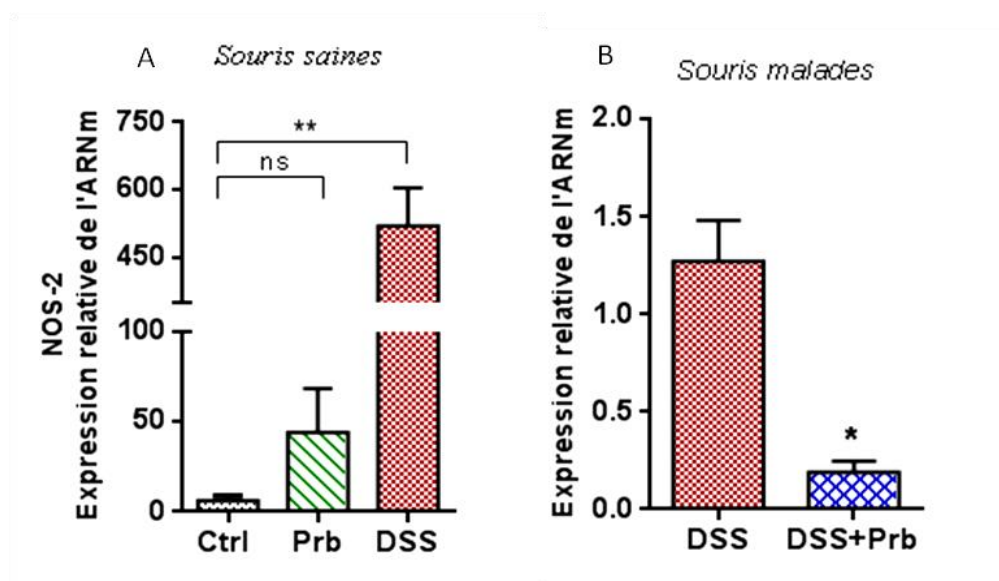


Figure 27: Expression relative de l'ARNm de la NOS-2 au niveau du côlon distal. A) Evaluation de l'effet de l'administration du DSS et des probiotiques à des souris témoins « souris saines » ; **B)** Evaluation de l'effet des probiotiques administrés aux souris atteintes d'une colite induite par le DSS « souris malades ». **Ctrl (n=4)**: groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; **DSS (n=4)** : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; **DSS+Prb (n=4)** : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; **Prb (n=4)**: lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

B) Etude de l'expression *in situ* de la NOS-2 par immuno-histochimie:

L'analyse immuno-histochimique a révélé la présence d'un fort marquage de la NOS-2 au niveau de la muqueuse colique des souris du groupe 'DSS' en comparaison avec les souris du groupe "Ctrl" (Figure 28C1). Il est intéressant de noter que les zones présentant une forte expression de la NOS-2 surexpriment également le TLR-4 et le facteur NF- κ B. En effet, le marquage de la NOS-2 est particulièrement intense au niveau du chorion où se trouve un important infiltrat de cellules immunitaires (Figure 28C2).

En ce qui concerne les souris du groupe 'DSS+Prb', leur traitement par des probiotiques a provoqué une régression de l'expression de la NOS-2 au niveau du côlon distal en comparaison avec les souris du groupe 'DSS' (Figure 28D1, 2). Ces résultats corrélaient avec les observations topographiques du côlon des souris du groupe 'DSS+Prb' montrant une diminution drastique de l'infiltrat inflammatoire au niveau de la muqueuse et de la

sous muqueuse. De plus une meilleure organisation tissulaire a été observée dans ce groupe. Par ailleurs, aucune différence n'a été relevée chez les souris du groupe 'Prb' en comparaison avec le groupe 'Ctrl' (Figure 28B).

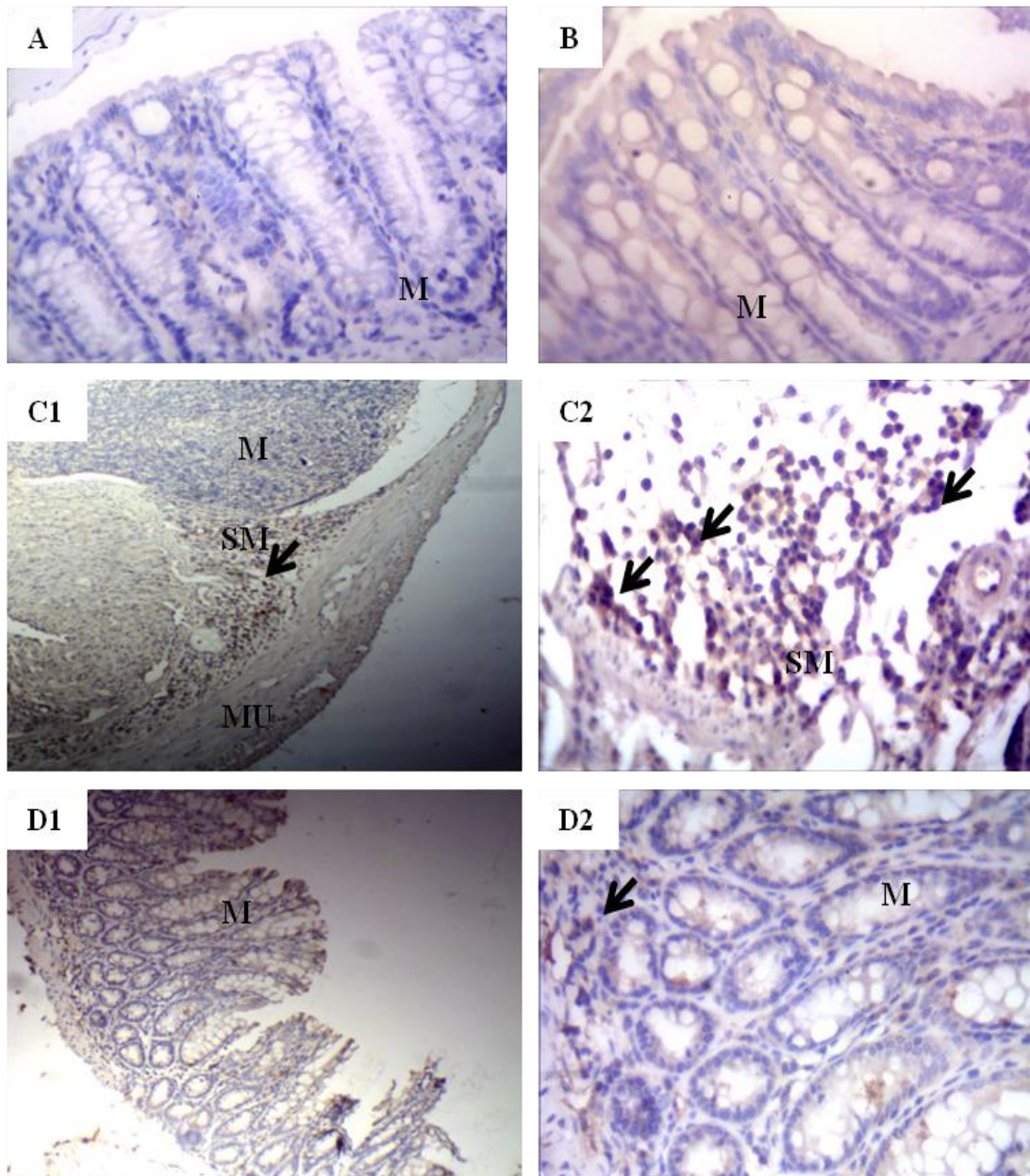


Figure 28 : Etude de l'expression de la NOS-2 au niveau du côlon. (A) groupe Ctrl ; (B) groupe Prb (Gx100xZn) ; C1 Gx100, C2Gx400) groupe DSS ; (D1 x100, D2 Gx400) groupe DSS+Prb. ((→) immunomarquage positif ; Muqueuse (M) ; sous muqueuse (SM) ; Zn : Zoom numérique)

C) Étude de l'effet des probiotiques sur la production *ex vivo* du monoxyde d'azote au niveau des surnageants de culture des explants coliques:

L'évaluation du taux de production du monoxyde d'azote (NO) a été réalisée à travers le dosage des nitrites (NO_2^- , métabolites physiologiquement stables du NO) par la méthode de Griess modifiée (Touil-Boukoffa *et al.*, 1998).

Comme décrit précédemment, le NO est un radical fortement réactif doté d'un fort potentiel antimicrobien. Cependant, produit en forte quantité par la NOS-2, il contribuerait à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et à l'apparition des dommages tissulaires. Nos résultats révèlent la présence d'une production accrue de NO au niveau des cultures d'explants coliques des souris du groupe 'DSS' en comparaison avec le groupe 'Ctrl' ($20,89 \pm 1,65 \mu\text{M} / \text{mg}$ vs $11,97 \pm 1,56 \mu\text{M} / \text{mg}$) (Figure 29). Ces résultats corréleront de façon positive avec l'expression génique de la NOS-2 au cours de la colite aigue. Ils reflètent également la persistance des processus pro-inflammatoires même après l'arrêt de l'administration du DSS. En effet, le NO est un puissant médiateur pro-inflammatoire produit principalement par le système "monocyte/ macrophage" en présence notamment de cytokines pro-inflammatoires inductrices de la NOS-2 (Lowenstein *et al.*, 1998).

La mesure des taux de nitrites au niveau des surnageants de culture des explants coliques a révélé une diminution hautement significative du taux de NO chez les souris du groupe 'DSS+Prb' en comparaison avec le groupe 'DSS' ($8,85 \pm 1,31 \mu\text{M} / \text{mg}$ vs $20,89 \pm 1,65 \mu\text{M} / \text{mg}$) (Figure 29). Ces résultats renforcent notre hypothèse selon laquelle les effets anti-inflammatoires des probiotiques passent par un mécanisme impliquant la diminution de production du NO.

Par ailleurs, le taux moyen de nitrites enregistré dans le groupe 'Prb' est de $14,71 \pm 2,86 \mu\text{M} / \text{mg}$. La comparaison de ces teneurs avec les taux de production des nitrites chez les souris du groupe 'Ctrl' ne montre aucune différence statistiquement significative (Figure 29).

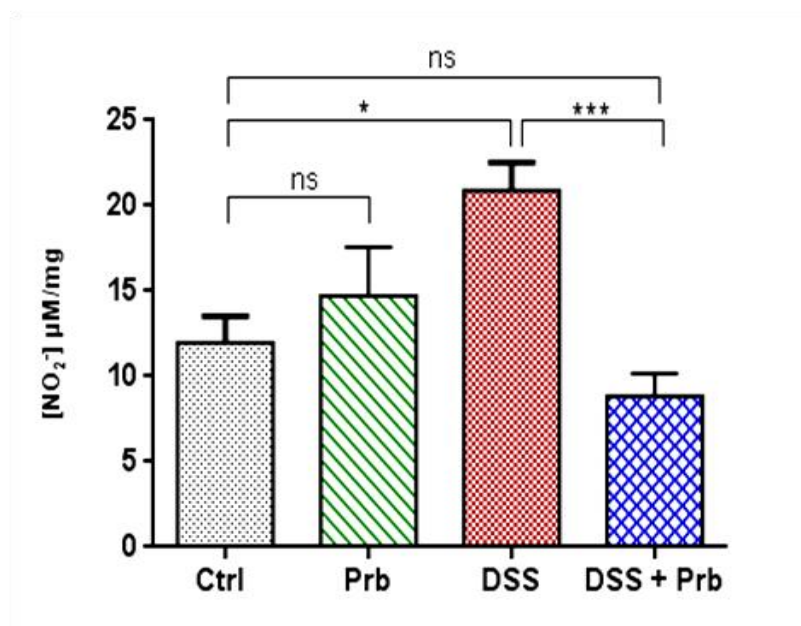


Figure 29: Effet des probiotiques sur la production *ex vivo* du NO au niveau des explants coliques. Ctrl (n=4): groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; DSS (n=4) : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; DSS+Prb (n=4) : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; Prb (n=4): lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (ns : $p > 0.05$; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

I.3.4 Etude de l'effet des probiotiques sur l'expression cytokinique au niveau du côlon distal des souris BALB/c :

A) Etude de l'effet des probiotiques sur l'expression de l'IL-6 et du TGF- β :

L'IL-6 figure parmi les acteurs principaux de la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Yamamoto *et al.*, 2000). Elle induit la production des cytokines pro-inflammatoires et augmente l'expression des protéines d'adhésion qui participent à la migration et à l'activation des cellules inflammatoires au niveau de l'intestin (Mudter et Neurath 2007). En revanche, le TGF- β est une cytokine immunorégulatrice dotée d'une forte activité immunosuppressive. De nombreux travaux sur des modèles expérimentaux de MICI ont mis en exergue l'importance du rôle du TGF- β dans l'atténuation de la colite expérimentale (Kulkarni *et al.*, 1993; Monteleone *et al.*, 2012).

En outre, l'IL-6 et le TGF- β orchestrent la différenciation des lymphocytes T vers un profil T régulateur de manière dose-dépendante (Liu *et al.*, 2008; Samanta *et al.*, 2008). De ce fait, il nous a semblé intéressant d'évaluer les effets des probiotiques sur l'expression colique de l'IL-6 et du TGF- β .

Les figures 30 et 31 présentent les niveaux des ARNm de l'IL-6 et du TGF- β pour les quatre groupes expérimentaux. Une augmentation significative des ARNm de l'IL-6 et du TGF- β a été retrouvée chez les souris du groupe 'DSS' par rapport au souris du groupe 'Ctrl' ($p < 0.01$) (Figure 30A, 31A).

Concernant l'effet des probiotiques durant la phase de rémission, nous avons noté avec intérêt une nette diminution au niveau de l'expression génique de l'IL-6 dans le groupe 'DSS+Prb' par rapport au groupe 'DSS' ($p < 0.05$) (Figure 30B). Au contraire, une augmentation statistiquement non significative a pu être observée au niveau des ARNm du TGF- β chez les souris du groupe 'DSS+Prb' (Figure 31B).

Chez les souris du groupe 'Prb', malgré qu'une augmentation soit observée au niveau de l'expression des ARNm de ces cytokines (TGF- β et IL-6), elle reste statistiquement non significative (Figure 30A, 31A).

Les données relevées ci-dessus, nous amènent à suggérer que les probiotiques utilisés dans notre étude contribuent à l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil immuno-régulateur nécessaire à la résolution de l'inflammation.

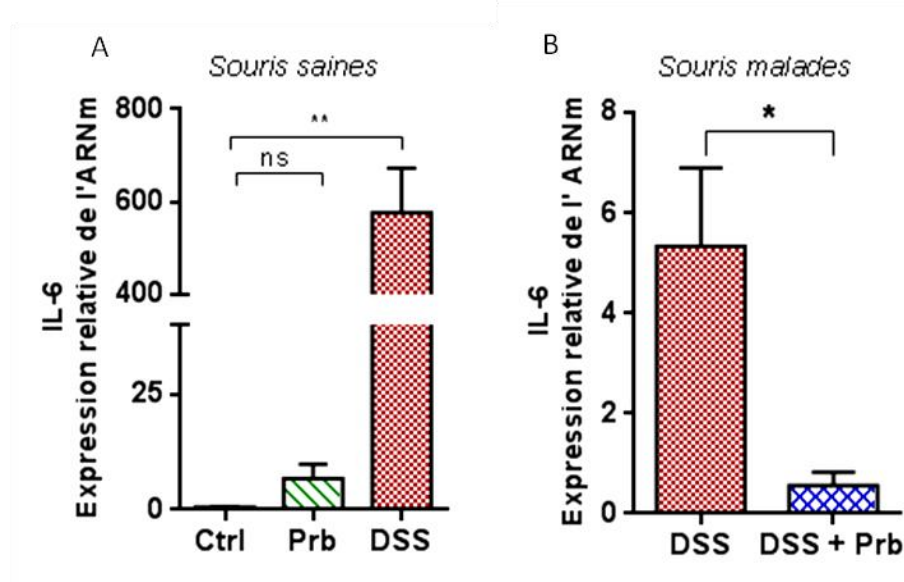


Figure30: Expression relative de l'ARNm de l'IL-6 au niveau du côlon distal. A) Evaluation de l'effet de l'administration du DSS et des probiotiques à des souris témoins « souris saines » ; B) Evaluation de l'effet des probiotiques administrés aux souris atteintes d'une colite induite par le DSS « souris malades ».

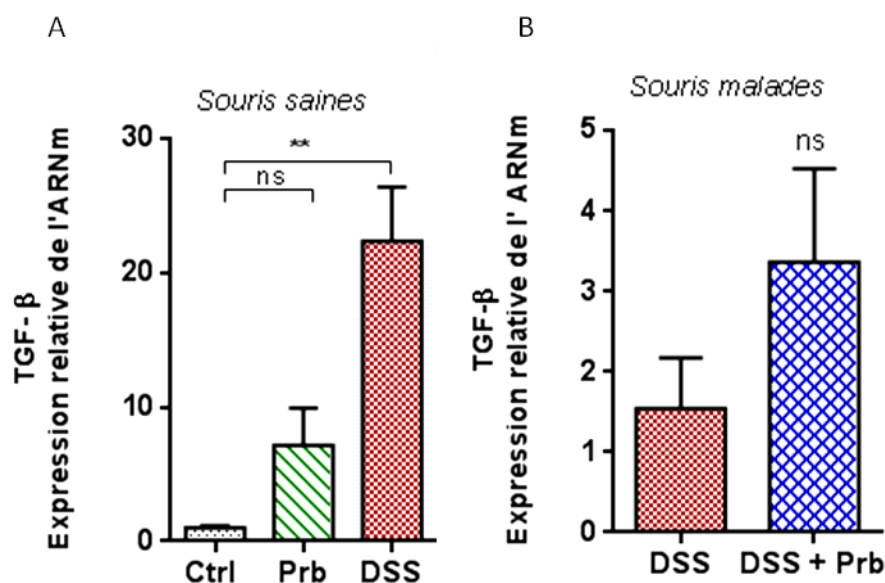


Figure31: Expression relative de l'ARNm du TGF-β au niveau du côlon distal. A) Evaluation de l'effet de l'administration du DSS et des probiotiques à des souris témoins « souris saines » ; B) Evaluation de l'effet des probiotiques administrés aux souris atteintes d'une colite induite par le DSS « souris malades ».

Ctrl (n=4): groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson; **DSS (n=4)** : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson; **DSS+Prb (n=4)** : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours; **Prb (n=4):** lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

B) Etude de l'effet des probiotiques sur l'expression du CCR-6 :

Dans le but de poursuivre la caractérisation des propriétés anti-inflammatoires et immunorégulatrices des probiotiques, il nous a semblé important d'étudier l'influence des probiotiques sur l'expression du récepteur de chimiokine, CCR-6. Ce dernier, constitue le récepteur exclusif du CCL20; une chimiokine hautement impliquée dans la migration et le recrutement des cellules inflammatoires (Uchida *et al.*, 2015).

L'analyse des transcrits du CCR-6 a révélé une augmentation hautement significative de ses ARNm chez les souris du groupe 'DSS' par rapport au souris du groupe 'Ctrl' ($p < 0.01$) (Figure 32A). Nos résultats ont également révélé une diminution significative de l'expression du CCR-6 chez les souris du groupe 'DSS+Prb' ayant reçu un traitement par les probiotiques en comparaison avec les souris du groupe 'DSS' ($p < 0.05$) (Figure 32B). Ces résultats suggèrent que les probiotiques pourraient diminuer l'amplitude de la réponse immunitaire au niveau du côlon en interférant avec les processus de migration et de recrutement des cellules inflammatoires. Par ailleurs, chez les souris du groupe 'Prb', une augmentation de l'expression des ARNm du CCR-6 a été observée mais elle reste statistiquement non significative ($p > 0.05$) (Figure 32A).

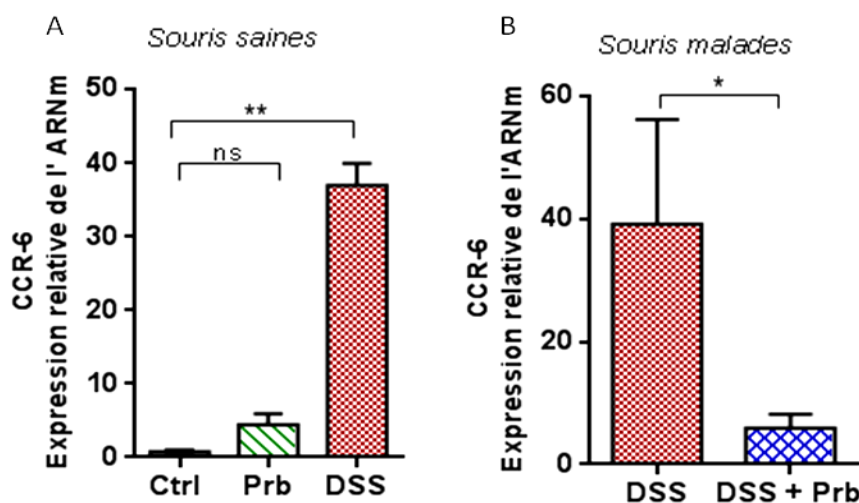


Figure 32: Expression relative de l'ARNm du CCR-6 au niveau du côlon distal. A) Evaluation de l'effet de l'administration du DSS et des probiotiques à des souris témoins « souris saines » ; B) Evaluation de l'effet des probiotiques administrés aux souris atteintes d'une colite induite par le DSS « souris malades ». (ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

C) Etude de l'effet des probiotiques sur l'expression du facteur de transcription FoxP3 :

En vue de la confirmation du rôle immuno-régulateur des probiotiques, nous avons recherché la présence de la population Treg au niveau du côlon. Pour cela, nous avons été amenés à l'étude de l'expression génique du facteur de transcription FoxP3, marqueur caractéristique la population Treg.

Comme le montre la figure 33 A, les souris du groupe 'DSS' présentent une augmentation non significative de l'expression génique du FoxP3 au niveau du côlon en comparaison avec les souris du groupe 'Ctrl' ($p > 0.05$). Concernant l'effet des probiotiques exercé au cours de la phase de rémission, nous avons noté avec intérêt une augmentation significative de l'expression de ce facteur chez les souris du groupe 'DSS+Prb' par rapport aux souris du groupe 'DSS' ($p < 0.05$) (Figure 33B). Ces résultats concordent avec d'autres travaux ayant démontré la capacité des probiotiques à orienter la réponse immunitaire vers un profil immunorégulateur (Karimi *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2010). Nos résultats justifient amplement la capacité des probiotiques à promouvoir une réponse immunorégulatrice nécessaire au retour de l'homéostasie intestinale. Par ailleurs, une augmentation non significative des transcrits de FoxP3 a été observée chez les souris du groupe 'Prb' ($p > 0.05$).

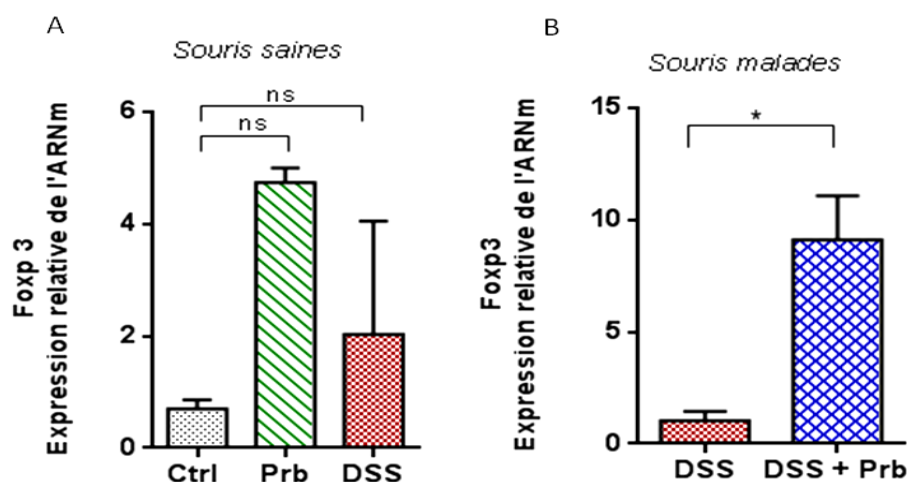


Figure33: Expression relative de l'ARNm du Foxp3 au niveau du côlon distal. A) Evaluation de l'effet de l'administration du DSS et des probiotiques à des souris témoins « souris saines » ; B) Evaluation de l'effet des probiotiques administrés aux souris atteintes d'une colite induite par le DSS « souris malades ». (ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$).

I.4 Evaluation des l'effet de l'administration orale des probiotiques sur la réponse immunitaire systémique:

Bien que l'inflammation induite par le DSS soit confinée principalement au niveau du côlon, il nous a semblé intéressant d'évaluer la réponse immunitaire systémique dans notre modèle d'étude. Il nous a également paru important d'explorer l'impact de l'administration des probiotiques par voie orale sur la réponse immunitaire systémique.

I.4.1 Mesure du poids de la rate:

La rate est un organe lymphoïde secondaire où se déroule la reconnaissance antigénique, c'est un organe riche en macrophages et en lymphocytes B et T. De ce fait, l'augmentation de la taille et du poids de la rate sont considérés comme des indicateurs importants de la réponse immunitaire systémique. À l'issue de chaque sacrifice, la rate a été prélevée et pesée. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative du poids relatif de la rate chez les souris du groupe 'DSS' en comparaison avec le groupe 'Ctrl' ($p < 0.0001$). En revanche, le traitement des souris avec les probiotiques a engendré une diminution hautement significative du poids relatif de la rate chez les souris du groupe 'DSS+Prb' en comparaison avec le groupe 'DSS' ($p < 0.0001$). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée chez les souris du groupe 'Prb' en comparaison avec le groupe 'Ctrl' ($p > 0.05$) (Figure 34).

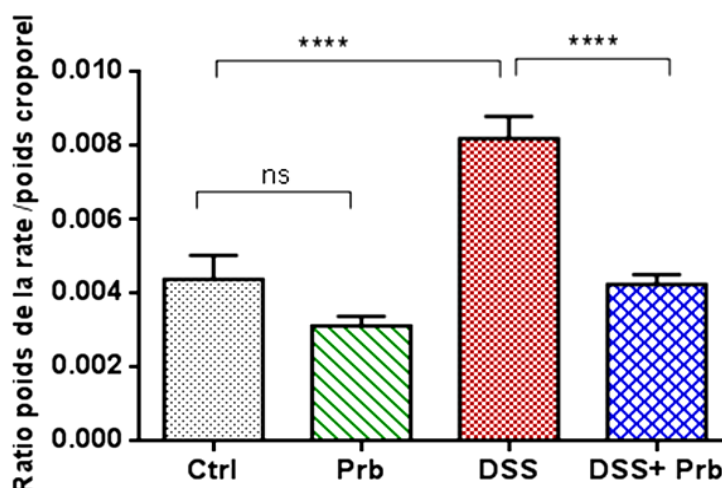


Figure 34: Poids relatif de la rate chez les différents groupes expérimentaux. Ctrl (n=6): groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; DSS (n=6) : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; DSS+Prb (n=8) : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; Prb (n=6) : lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours (ns p>0.05 ; **** p<0.0001).

1.4.2 Étude de la production du NO *in vivo* au niveau du plasma des souris BALB/c :

Notre étude a révélé la présence de teneurs systémiques élevées de NO chez les souris du groupe 'DSS' par rapport aux souris du groupe 'Ctrl' et ce, malgré l'induction d'une phase de rémission. En effet, nous avons enregistré dans le groupe 'DSS' un taux moyen de nitrites résiduels de $15,85 \pm 1,18 \mu\text{M}$, alors que le taux moyen retrouvé chez les souris du groupe 'Ctrl' était de $6,26 \pm 0,38 \mu\text{M}$ (p<0.0001) (Figure 35). Ces résultats confortent nos précédents travaux ayant montré la présence d'une production accrue de NO à l'échelle systémique au cours de la colite aigüe induite par le DSS (Toumi *et al.*, 2013; Soufli *et al.*, 2015).

Par ailleurs, la comparaison des teneurs plasmatiques en nitrites résiduels entre les souris du groupe 'DSS' ($15,85 \pm 1,18 \mu\text{M}$) et les souris du groupe 'DSS+Prb' ($7,67 \pm 0,71 \mu\text{M}$) a montré de manière évidente, une diminution significative du NO plasmatique chez les souris traitées par les probiotiques (p<0.001). De plus, la comparaison des taux de production du NO enregistrés dans le groupe 'DSS+Prb' et le groupe 'Ctrl' n'a montré aucune différence significative (p>0.05) (Figure 35).

En outre, aucune différence significative n'a été relevée chez les souris du groupe 'Prb' ($6,267 \pm 0,38 \mu\text{M}$) en comparaison avec le groupe 'Ctrl' ($7,86 \pm 0,63 \mu\text{M}$). Notons que les profils de production du NO *in vivo* et *in vitro* sont corrélés pour les différents groupes expérimentaux (Figure 35).

I.4.3 Étude de la production de l'IFN- γ *in vivo* au niveau du plasma des souris BALB/c :

Nos résultats ont mis en évidence la présence de taux d'IFN- γ significativement élevés chez les souris du groupe 'DSS' en comparaison avec le souris du groupe 'Ctrl' ($p < 0.05$) (Figure 36). Le traitement des souris par les probiotiques a induit une diminution significative des taux d'IFN- γ chez les souris du groupe 'DSS+Prb' en comparaison avec les souris du groupe 'DSS' ($p < 0.05$). Rappelons que l'IFN- γ constitue un inducteur essentiel de la NOS-2 dans les macrophages et les cellules épithéliales. Ainsi, nous avons noté la présence d'une corrélation positive entre les taux de production d'IFN- γ et de NO dans ces groupes. Par ailleurs, aucune différence significative dans les taux de production de l'IFN- γ entre les souris du groupe 'Prb' et du groupe 'Ctrl' n'a été observée ($P > 0.05$) (Figure 36).

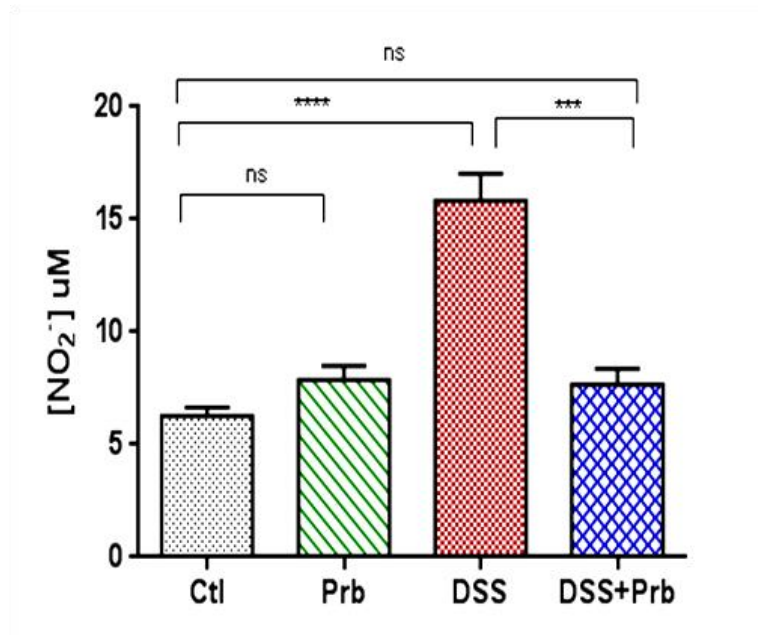


Figure 35: Effet des probiotiques sur la production *in vivo* du NO. Ctl (n=6): groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; DSS (n=6) : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; DSS+Prb (n=8) : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; Prb (n=6): lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (ns p>0.05; * p<0.05; *** p<0.001 ; **** p<0.0001).

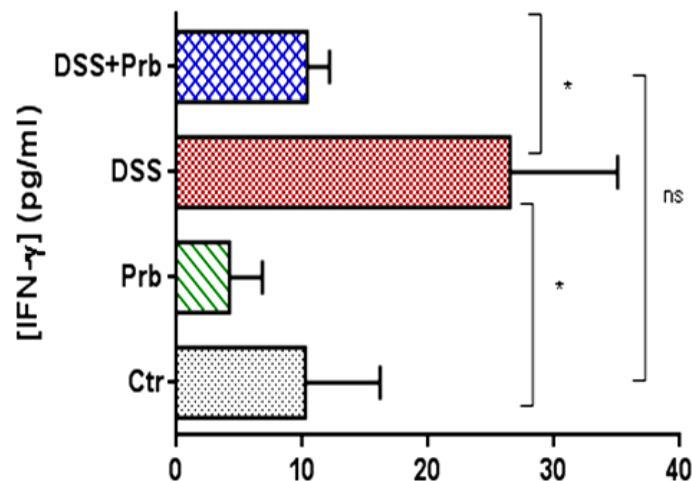


Figure 36: Effet des probiotiques sur la production *in vivo* de l'IFN-γ. Ctl (n=6): groupe contrôle ayant reçu l'eau de boisson ; DSS (n=6) : lot traité par le DSS pendant 5 jours suivie de 5 jours d'eau de boisson ; DSS+Prb (n=8) : lot ayant reçu le DSS pendant 5 jours et un traitement par des probiotiques pendant 7 jours ; Prb (n=6): lot traité uniquement par les probiotiques pendant 7 jours. (ns p>0.05 ; * p<0.05)

Partie II : Etude de l'effet immunomodulateur des probiotiques sur la production du monoxyde d'azote chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Dans la deuxième partie de notre thèse, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet des probiotiques sur la production *in vitro* du NO au niveau des PBMCs de patients atteints de MICI. Nous avons choisi d'étudier l'effet des métabolites présents dans les surnageants de culture de deux probiotiques : l'Ultrabiotique® et l'Ultralevure®. Ce dernier, est constitué de la levure *Sacharromyces boulardii* uniquement. L'utilisation des métabolites de probiotiques comme stratégies thérapeutiques alternative ou complémentaire dans les MICI présente l'avantage de réduire le risque de surinfection associée à l'administration de fortes concentrations de micro-organismes vivants et permet de mieux comprendre les mécanismes d'action des probiotiques dans la modulation de la réponse immunitaire.

Enfin, en raison du rôle crucial que joue l'IL-22 dans le renforcement de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, il nous a semblé intéressant d'évaluer ses taux plasmatiques chez les patients atteints de MICI recrutés dans notre étude.

Nous n'ignorons pas que l'effectif réduit des patients limite notre étude. Par conséquent, il serait nécessaire et intéressant d'élargir l'échantillonnage pour pouvoir confirmer les observations émanant de notre travail.

II.1 Évaluation de la production *in vivo* du NO chez les sujets sains et les patients atteints de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH) :

L'évaluation du taux de production du NO au niveau des plasma de patients et des sujets sains a été réalisée à travers la mesure des nitrites résiduels par la méthode de Griess Modifié (Touil-Boukoffa *et al.*, 1998).

La comparaison des taux de production du NO *in vivo* chez les patients atteints de MICI avec les témoins (donneurs sains) a révélé une augmentation significative de ces taux chez

les deux catégories de patients MC et RCH. Cette augmentation est plus importante chez les patients atteints de la MC ($19.87 \pm 1.2 \mu\text{M}$) que chez les patients atteints de la RCH ($14.32 \pm 2.04 \mu\text{M}$). Le taux de NO retrouvé dans le plasma des « témoins » est de $9.83 \pm 0.57 \mu\text{M}$. La comparaison des taux de production de NO entre les deux catégories de patients MC et RCH révèle la présence d'une différence statistiquement significative (Figure 37) ($p < 0.01$). Nos résultats concordent avec des travaux antérieurs mettant en évidence l'implication de cette biomolécule dans la physiopathologie des MICI (Kimura *et al.*, 1997; Rafa *et al.*, 2010) ainsi que dans d'autres maladies auto-immunes, telles que les uvéites Behçet (Guenane *et al.*, 2006 ; Belguendouz *et al.*, 2008).

II.2 Évaluation de la production *in vivo* de l'IL-22 chez les sujets sains et les patients atteints de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH) :

L'IL-22 est une cytokine de la famille de l'IL-10 produite par une grande variété de cellules immunitaires innées dont les cellules NK, les cellules lymphoïdes innées et les cellules épithéliales. Elle est également sécrétée par les lymphocytes TCD4+, notamment les lymphocytes Th17, Th1 et Th22. Le rôle de l'IL-22 et des cellules Th22 dans les MICI est toujours mal défini. Cependant, la plupart des données actuelles pointent fortement en faveur d'un rôle protecteur, anti-inflammatoire nécessaire au renforcement de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Sabat *et al.*, 2013).

L'étude de la production de l'IL-22 *in vivo* a montré la présence de taux significativement élevés chez les patients atteints de la maladie de Crohn en comparaison aux sujets sains ($p < 0,05$). Ces taux sont plus élevés chez les patients atteints de la MC par rapport à ceux atteints de la RCH ($p < 0,01$) (Figure 38). En outre, la comparaison des taux de production de l'IL-22 systémique entre les patients atteints de la RCH et des sujets sains n'a montré aucune différence significative ($p > 0.05$) (Figure 38). Nos résultats concordent avec d'autres études ayant mis en évidence la présence de taux plasmatiques élevés de l'IL-22 chez les patients atteints de la MC.

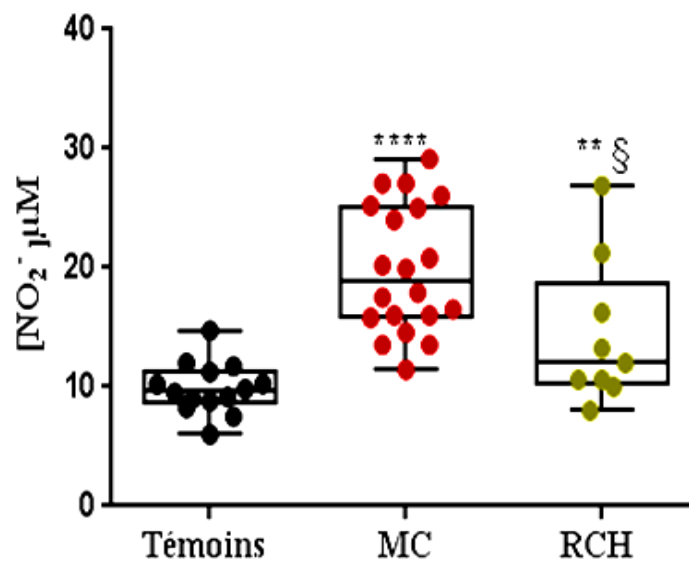


Figure 37: Taux de nitrites résiduel dans le plasma des patients atteints de la MC et de la RCH. Témoins (n=14) ; patients MC (n=20) ; patients RCH (n=9). (***P<0.0001). Une différence significative entre les patients atteints de MC et de RCH (#P<0.01)

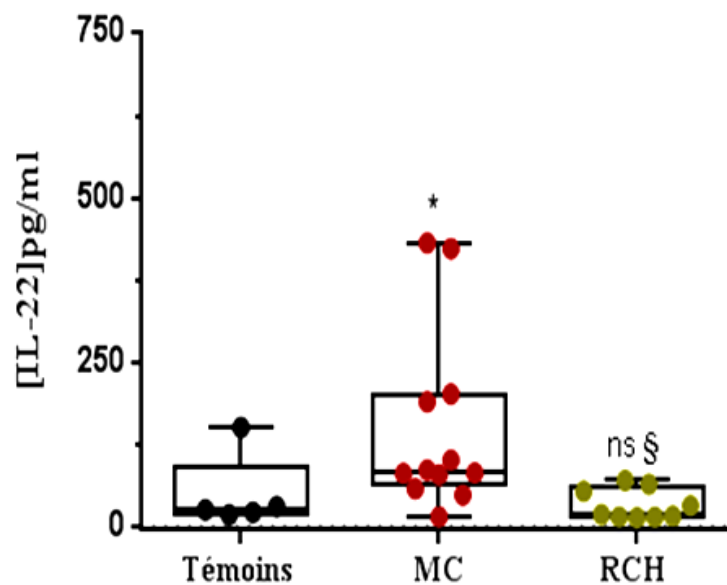


Figure 38: Taux de l'IL-22 dans le plasma des patients atteints de la MC et de la RCH. Témoins (n=5) ; patients MC (n=12) ; patients RCH (n=9). (*P<0.05). Une différence significative entre les patients atteints de MC et de RCH (§P<0.01)

II.3 Étude de l'effet des surnageants de culture des probiotiques sur de la production *in vitro* du NO par les PBMCs chez des patients atteint de MICI :

Dans le but d'évaluer l'effet immunomodulateur des métabolites de probiotiques sur la production *in vitro* du NO, des PBMCs des patients atteints de MICI ont été récupérées puis mises en culture avec des concentrations décroissantes (dilutions) de surnageants de culture de l'Ultrabiotique® (sPro) (1/2, 1/8, 1/32) ou de l'Ultralevure® (sSb) (1/8, 1/32). Après une incubation de 20h, les surnageants de culture des PBMCs ont été recueillis pour le dosage des nitrites résiduels par la méthode de Griess modifié (Touil-Boukoffa *et al.*, 1998).

L'évaluation de la viabilité cellulaire après mise en culture des PBMC a révélé la présence d'un effet cytotoxique en présence d'une forte concentration de sSb (dilution 1/2). Elle a par conséquent été éliminée de notre étude.

II.3.1 Étude de l'effet des surnageants de culture des probiotiques sur la production *in vitro* du NO par les PBMCs des patients atteints de la maladie de Crohn (MC) :

Nos résultats représentés dans la figure 39A montrent une diminution des taux de nitrites au niveau des PBMCs de patients atteints de la MC traités par différentes concentrations du surnageant de culture de l'Ultrabiotique® (sPro). Cette diminution est dose-dépendante et statistiquement significative pour la dilution 1/32. En effet, les taux moyens de nitrites résiduels enregistrés pour les différentes dilutions 1/2, 1/8 et 1/32 sont de $15 \pm 1.93 \mu\text{M}$; $11,84 \pm 2.1 \mu\text{M}$ et $10.61 \pm 1.27 \mu\text{M}$ respectivement. Le taux moyen de nitrites retrouvé au niveau des puits contrôles étant de $17.42 \pm 1.37 \mu\text{M}$.

Par ailleurs, de faible taux de production de nitrites ont été enregistrés au niveau des PBMCs traitées par différentes concentrations du surnageant de culture de l'Ultralevure® (sSb). La diminution de la production du NO est dose-dépendante. Elle semble être optimale à une faible concentration du surnageant de culture (sSb) (1/32) ($14.19 \pm 1.32 \mu\text{M}$). Le taux moyen de nitrites retrouvé au niveau des puits contrôles étant de $17.42 \pm 1.37 \mu\text{M}$ (Figure 39A).

II.3.2 Étude de l'effet des surnageants de culture des probiotiques sur la production *in vitro* du NO par les PBMCs des patients atteints de la rectocolite hémorragique (RCH) :

Le traitement des PBMCs de patients atteints de la RCH avec différentes concentrations de surnageants de culture de l'Ultrabiotique (sPro) a induit une diminution dans le taux de production de NO. En effet, des taux de nitrites de $7.81 \pm 1.19 \mu\text{M}$; $6.58 \pm 0.69 \mu\text{M}$ $5.83 \pm 1.18 \mu\text{M}$ ont été enregistrés pour les concentrations de 1/2, 1/8 et 1/32 respectivement. Le taux moyen de nitrites retrouvé au niveau des puits contrôles est de $10.10 \pm 1.2 \mu\text{M}$. La diminution du taux de production du NO est dose-dépendante et statistiquement significative pour les dilutions 1/8 et 1/32 (Figure 40A)

Par ailleurs, le surnageant de culture de l'Ultralevure[®] a également induit une diminution de la production du NO par les PBMCs de patients atteints de RCH. Comme indiqué dans la figure une diminution significative du taux de nitrites a été enregistrée pour la dilution 1/32 de l'Ultralevure[®] (Figure 40B).

L'ensemble de nos observations nous laisse supposer la présence d'un effet anti-inflammatoire potentiel des métabolites produits par l'Ultrabiotique[®] et l'Ultralevure[®] sur la production *in vitro* du NO dans la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique.

Maladie de Crohn (MC)

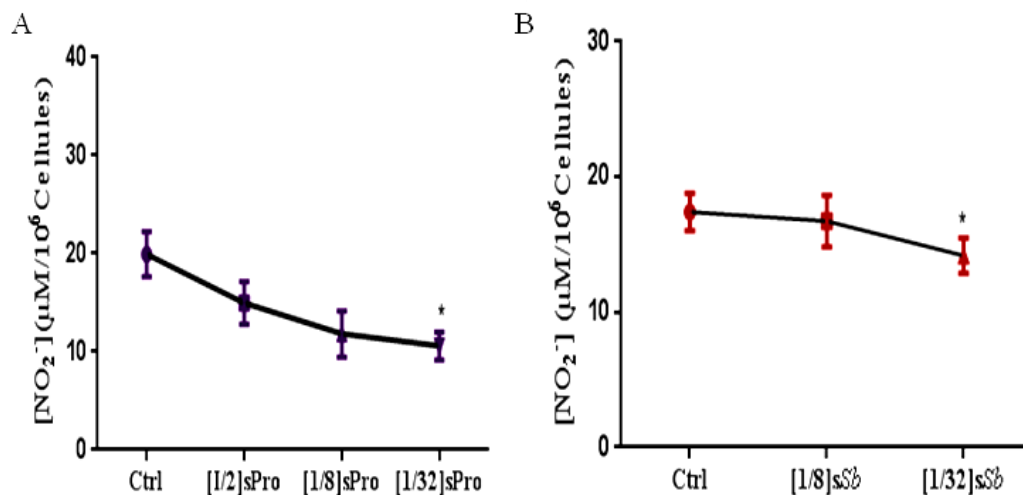


Figure 39: Etude de l'effet du surnageant de culture des l'Ultrabiotique® (sPro) (A) et de l'Ultralevure® (B) sur la production *in vitro* du NO par les PBMCs de patients atteints de la maladie de Crohn (n=10, p<0.05)

La rectocolite hémorragique (RCH)

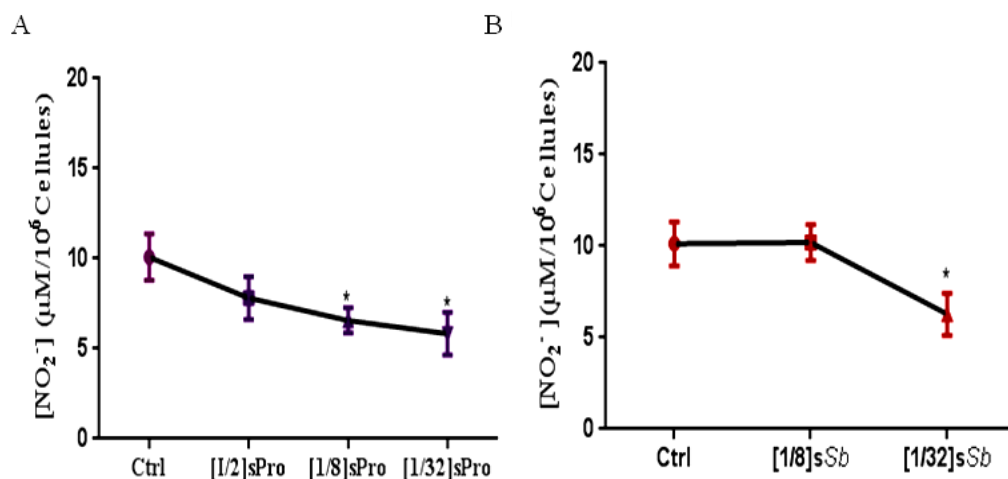


Figure 40: Etude de l'effet du surnageant de culture des l'Ultrabiotique® (sPro) (A) et de l'Ultralevure® (B) sur la production *in vitro* du NO par les PBMCs de patients atteints de la Rectocolite hémorragique (n=9, p<0.05)

Partie VI : Discussion générale

Partie VI

Discussion generale

À travers notre étude, nous avons voulu mettre en lumière les mécanismes à l'origine des propriétés immuno-modulatrices des probiotiques et de leurs métabolites. Pour cela, notre étude s'est articulée en deux parties : tout d'abord, dans un modèle murin de colite expérimentale mimant la rectocolite hémorragique chez l'homme, nous avons exploré les mécanismes d'action de l'Ultrabiotique®, un complexe probiotique formé de quatre souches bactériennes : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*. Puis, nous nous sommes intéressés aux propriétés immuno-modulatrices des métabolites et substances solubles générés par les probiotiques. Pour cela, nous avons ciblé la régulation de la production du NO au niveau des PBMCs de patients atteints de MICI en utilisant les surnageants de culture de l'Ultrabiotique® et d'un autre probiotique composé de la levure *Saccharomyces boulardii*. Nous rapportons dans notre étude, et ce pour la première fois, l'effet du surnageant de culture de l'Ultrabiotique® sur la modulation de la NOS-2 au niveau des PBMCs de patients atteints de MICI. Les propriétés anti-inflammatoires du surnageant de culture de l'Ultralevure® ont déjà été rapportées dans la littérature. Toutefois, il nous a semblé opportun d'évaluer ses capacités sur le mode de régulation du NO chez les patients recrutés dans notre étude.

Partie I : Etude de l'effet de l'administration thérapeutique des probiotiques sur l'induction de la rémission au cours de la colite expérimentale

La colite expérimentale induite avec le Dextran Sulfate Sodium (DSS) est l'un des modèles expérimentaux les plus utilisés en raison de sa simplicité, sa fiabilité et sa reproductibilité. En fonction de la durée et la fréquence de l'administration du DSS, les animaux peuvent développer une colite aigue, chronique ou encore des lésions dysplasiques (Okayasu *et al.*, 2002). Malgré certaines différences avec la pathologie humaine, ce modèle partage certaines bases physiopathologiques avec les MICI, notamment l'implication du microbiote dans la survenue de la colite ainsi que l'altération de l'intégrité de la barrière épithéliale. En effet, en perturbant la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, le DSS favorise l'accumulation et l'intrusion des bactéries au niveau de la muqueuse où elles activent une réponse inflammatoire (Ni *et al.*, 1996).

La démarche expérimentale entreprise dans notre étude comprend deux phases : une phase d'induction de la colite obtenue après administration de 3% de DSS (m/v) dans l'eau de boisson des souris BALB/c et une phase de rémission de cinq jours. Cette dernière survient suite à l'arrêt de l'administration du DSS.

Tout au long de la période expérimentale, les souris du groupe 'DSS' ont présenté des symptômes caractéristiques de la colite à savoir une importante perte de poids et l'apparition d'une diarrhée hémorragique. Le raccourcissement important de la longueur du côlon et l'augmentation de son poids relatif reflètent la sévérité de l'inflammation colique et la persistance des altérations tissulaires au niveau local. Par ailleurs, l'augmentation du poids de la rate traduit la présence d'une réponse immunitaire systémique.

Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que les souris du groupe 'DSS' ont développé une colite sévère dont les processus inflammatoires semblent persister même après arrêt de l'administration du DSS. Selon les travaux de Melgar *et al*, la rémission chez les souris BALB/c survient spontanément une semaine après l'arrêt de l'administration du DSS. Elle est caractérisée par une amélioration de l'état général des souris et une atténuation des lésions tissulaires localisées au niveau du côlon (Melgar *et al* ; 2005). En effet, de par son "background" génétique, la souche murine BALB/c est moins susceptible au DSS que les autres souches. Elle serait alors d'un grand intérêt dans les études ciblant les processus de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire. Les résultats que nous avons obtenus démontrent l'importance du microbiote intestinal et de l'environnement dans la survenue et l'étendue de la colite. En effet, les travaux de Melgar *et al* ont été réalisés sur des souris élevées dans des conditions exemptes de pathogènes spécifiques (SPF). Elles seraient donc probablement moins susceptibles à la colite que le type sauvage. Toutefois, il n'est pas exclu que si l'apport en eau durant la période de rémission avait été prolongé sur une plus longue période, l'inflammation se serait probablement résorbée.

L'administration thérapeutique des probiotiques a débuté à partir de J3 de la période expérimentale. À partir de ce jour, nous avons remarqué une accentuation des symptômes cliniques : fatigue, poils hérissés et présence de sang dans les selles. Ces paramètres

confirment l'installation de la colite et indiquent l'altération de l'organisation architecturale du côlon. Nos observations concordent avec celles de Cooper *et al* et de Benight *et al* (Cooper *et al.*, 1993 ; et Benight *et al.*, 2012).

Le traitement des souris avec les probiotiques a eu pour effet bénéfique l'amélioration des paramètres cliniques de la colite (DAI et poids corporel) chez les souris du groupe 'DSS+Prb'. Nous avons également constaté une augmentation du taux de survie dans ce groupe en comparaison avec le groupe 'DSS'. Nos résultats confirment le potentiel thérapeutique de l'Ultrabiotique® dans l'induction et l'accélération de la phase de rémission. Ils concordent avec les résultats rapportés par les travaux de Mar *et al.* Ces derniers ont mis en évidence les propriétés thérapeutiques du VSL#3, un cocktail de probiotiques formé par *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* et *St. salivarius*, au cours de la colite expérimentale induite par le DSS (Mar *et al.*, 2014). De plus, des essais cliniques ont montré que l'administration de ce probiotique induit une rémission chez 95% des patients atteints d'une RCH en poussée légère et ne répondant pas au traitement conventionnel (Bibiloni *et al.*, 2005). D'autres probiotiques ont également montré des effets bénéfiques telle que la levure *Saccharomyces boulardii* qui s'est avérée efficace dans la prévention des récives chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Guslandi *et al.*, 2002).

L'examen histologique des fragments coliques provenant des souris du groupe 'DSS' a révélé la présence de lésions épithéliales sévères accompagnées d'une infiltration cellulaire de la muqueuse colique. De ce fait, un score histologique maximal a été enregistré dans ce groupe. L'absence d'une couche de cellules épithéliales bordant la lumière intestinale, comme il a été constaté dans notre étude, favoriserait l'invasion microbienne et l'activation continue du système immunitaire muqueux. Par ailleurs, aucun signe de réparation tissulaire ou de régénération des cryptes n'a été observé dans le groupe 'DSS'. Au contraire, nous avons constaté la formation d'abcès cryptiques au niveau de la muqueuse colique. Ces abcès apparaissent suite à une migration trans-épithéliale des neutrophiles vers la lumière des cryptes, ce qui altère les protéines de jonctions et augmente la perméabilité intestinale.

Par ailleurs, nous avons également observé une perte des glandes de Lieberkühn et une déplétion des cellules caliciformes productrices de mucus. Ce dernier est composé de mucines, notamment de la MUC2 qui forment une barrière physico-chimique nécessaire au maintien de l'homéostasie intestinale. En effet, le mucus limite d'une part, le contact avec les antigènes bactériens et favorise d'autre part la rétention des molécules antibactériennes produites par les cellules de Paneth (Hardy *et al.*, 2015). Nos résultats sont en accord avec des études ayant rapporté une déplétion des cellules caliciformes au cours de la colite expérimentale induite avec du DSS (Renes *et al.*, 2002 ; Toumi *et al.*, 2013) ainsi que chez les patients atteints la RCH (Larsson *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été démontré que les souris déficientes pour le gène MUC2 développaient une colite spontanée et étaient plus sensibles au DSS que les souris du type sauvage (Van Der Sluis *et al.*, 2006).

L'altération de la production du mucus observée chez les souris du groupe 'DSS' pourrait être liée à une dérégulation de la production des cytokines IL-22 et IL-33 durant la phase de rémission. En effet, plusieurs études suggèrent un rôle protecteur de ces cytokines au cours des MICI, et ce, à travers l'induction de la production du mucus et la régénération des cellules épithéliales intestinales (Li *et al.*, 2014 ; Groß *et al.*, 2012). Dans ce cadre, les travaux de Mizoguchi, ont mis en évidence le rôle crucial de l'IL-22 dans l'atténuation de la sévérité de la colite et l'induction de la phase de rémission. Contrairement à nos observations, ces études ont rapporté une surexpression des transcrits de l'IL-22 au niveau du côlon durant cette phase (Mizoguchi, 2012). Les travaux de Pickert *et al* ont également mis en évidence l'importance de l'IL-22 dans les processus de cicatrisation et de régénération des cellules épithéliales à travers l'activation de la voie de signalisation STAT3. En effet, ces auteurs ont noté un retard de cicatrisation des lésions tissulaires au niveau des biopsies coliques de souris déficientes en IL-22 en comparaison avec les souris du type sauvage (Pickert *et al.*, 2009). Durant la colite, de nombreuses cellules expriment le récepteur de l'IL-22 telles que les lymphocytes CD4+, les cellules TH17, les cellules lymphoïdes innées et les cellules reflétant l'importance de l'IL-22 dans l'homéostasie intestinale. Dans notre étude une surexpression des transcrits du récepteur de l'IL-22, l'IL-22R a été mise en évidence niveau du côlon des souris du groupe 'DSS'. Nos résultats concordent avec les travaux de Zenewicz *et al* (Zenewicz *et al* 2008).

Par ailleurs, nos résultats ont révélé une augmentation non significative de l'expression des transcrits de l'IL-33 chez les souris du groupe 'DSS'. L'IL-33 est une cytokine qui appartient à la famille des cytokines de l'IL-1 qui regroupe: l'IL-1 α/β , et l'IL-18 (Schmitz *et al.*, 2005). Plusieurs études ont rapporté un rôle dual de l'IL-33 et de son récepteur ST2 dans la colite expérimentale. En effet, il a été démontré que l'IL-33 exacerbe d'une part, la colite aigüe induite au DSS (Sedhom *et al.*, 2013 ; Pushparaj *et al.*, 2013) et d'autre part, elle exerce un effet protecteur au cours de la phase chronique de la colite (Zhu *et al.*, 2015). En outre, durant la phase de rémission de la colite expérimentale, les travaux de Groß *et al.* ont mis en évidence le rôle protecteur de l'IL-33. De façon similaire à l'IL-22, l'IL-33 interviendrait dans le maintien de l'homéostasie intestinale en favorisant la régénération des cellules épithéliales et en induisant la production du mucus par les cellules caliciformes. De plus, il a été démontré que l'administration du DSS à des souris déficientes en IL-33 aggravait la colite et retardait les processus de résolution de la réponse inflammatoire (Groß *et al.*, 2012). Actuellement, l'IL-33 est décrite comme étant un « signal/alarme de danger » libéré par les cellules épithéliales intestinales lors des dommages tissulaires afin d'activer le système immunitaire et d'enclencher les processus de réparation tissulaire (Carrasco *et al.*, 2015).

Ainsi, il est probable qu'une production insuffisante de l'IL-22 et de l'IL-33 au niveau du côlon des souris du groupe 'DSS' aurait favorisé la détérioration de la couche protectrice de mucus d'une part, et retardé l'instauration des processus de régénération et de réparation tissulaire d'autre part.

L'effet thérapeutique des probiotiques s'est traduit par une réduction significative du score histologique chez les souris traitées par l'Ultrabiotique®. En effet, en comparaison avec les souris du groupe DSS, les souris traitées par les probiotiques (groupe 'DSS+Prb') ont montré une meilleure organisation de l'architecture tissulaire et une diminution de l'infiltrat inflammatoire au niveau du côlon. De plus, nous avons noté avec intérêt, la présence de nombreux indices indiquant la mise en place d'un processus de réparation et de régénération tissulaire. En effet, nos résultats ont mis en évidence une production importante de mucus par les cellules caliciformes chez les souris des groupes 'Prb' et 'DSS+Prb' traitées avec l'Ultrabiotique®.

Outre la production des mucines, les cellules caliciformes synthétisent le peptide en trèfle, TFF3 (trefoil factor 3) impliqué dans les processus de réparation de l'épithélium (Aamann *et al.*, 2014). Nos observations confortent nos travaux antérieurs ayant montré l'influence des probiotiques sur la production de mucus et la restauration de la fonction de barrière de l'épithélium (Toumi *et al.*, 2013). Ils concordent également avec d'autres études ayant rapporté la capacité des lactobacilles à augmenter l'expression de mucines *in vitro* par les cellules épithéliales intestinales (HT29) (Mack *et al.*, 2003).

La restauration de la fonction de barrière de l'épithélium chez les souris du groupe 'DSS+Prb' est probablement associée à la surexpression des transcrits de l'IL-22, de son récepteur IL-22R et de l'IL-33 au niveau du côlon. Nous avons également noté avec intérêt une augmentation significative de l'expression des transcrits de l'IL-22 chez les souris saines traitées par les probiotiques (Groupe 'Prb'). Par conséquent, il est probable que la capacité des probiotiques à promouvoir la réparation des dommages tissulaires et l'induction de la production du mucus passe par un mécanisme impliquant la régulation de l'expression de l'IL-22 et de l'IL-33. Ces résultats préliminaires doivent cependant être étayés, notamment en évaluant la capacité de l'Ultrabiotique® à induire la production de ces cytokines *ex vivo* dans un système de culture de cellules épithéliales intestinales ou d'explants coliques.

Signalons que l'effet de l'administration orale des probiotiques sur la modulation de la production de l'IL-22 n'a pas encore été rapporté dans la littérature. Toutefois, les études de Zenewicz *et al* ont rapporté l'importance de l'IL-22 dans la stabilité du microbiote intestinal. En effet, ces auteurs ont mis en évidence une altération du microbiote intestinal chez les souris déficientes pour le gène codant l'IL-22. Cette dysbiose est caractérisée notamment par une réduction du nombre de lactobacilles. De plus, la transmission de la flore fécale de ces souris à d'autres de type sauvage, augmente de manière notable leur susceptibilité à la colite induite au DSS (Zenewicz *et al.*, 2012). Dans ce contexte, Sugimoto *et al* ont démontré que la surexpression de l'IL-22 dans le côlon induit la production des mucines MUC1, MUC3 et MUC13 qui confèrent à l'épithélium une protection contre l'invasion bactérienne (Sugimoto *et al.*, 2008).

En outre, l'IL-22 induit une augmentation de l'expression des défensines et des peptides antimicrobiens par les entérocytes ce qui limite le risque de dissémination des antigènes luminaux (Brand *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il a été démontré récemment par Dolpady et al que les probiotiques ont la capacité d'induire l'expression de l'IL-33 dans un modèle expérimental de diabète auto-immun. Ces auteurs ont démontré que l'administration du VSL#3 modifie la composition du microbiote intestinal et engendre un environnement tolérogène caractérisé par une surexpression de l'IL-33 (Dolpady *et al.*, 2016). Ainsi, l'IL-33 favoriserait le développement des Treg FoxP3⁺ en augmentant la production du TSLP et de l'acide rétinoïque par les cellules épithéliales intestinales (Mucida *et al* 2007 ; Spadoni *et al.*, 2012 ; Lopetuso *et al.*, 2012).

À l'état physiologique et en absence d'agents pathogènes invasifs, les antigènes commensaux et certains xénobiotiques induisent une inflammation « silencieuse » nécessaire au maintien de l'homéostasie intestinale. Leur reconnaissance par le système immunitaire inné est cruciale au maintien de l'homéostasie intestinale. Celle-ci s'effectue grâce aux PRRs tels que les TLRs présents sur les cellules épithéliales intestinales (CEIs), dont les fonctions principales consistent à détecter la présence et le type d'agents microbiens, de déclencher une réponse immunitaire locale et de stimuler la réponse adaptative (Takeda et Akira, 2004). Cependant, chez les patients atteints de MICI une dérégulation dans le profil d'expression des TLRs, notamment le TLR-4, est fortement impliquée dans l'altération de la barrière épithéliale intestinale (Shen *et al.*, 2010)

Dans ce cadre, nos résultats ont montré une surexpression des transcrits du TLR-4 au niveau du côlon distal des souris du groupe 'DSS' en comparaison avec les souris du groupe 'Ctrl'. Ces résultats ont été confortés par l'analyse immuno-histochimique qui a révélé une forte immunoréactivité au TLR-4 au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse des souris ayant reçu le DSS. Une surexpression du TLR-4 à la surface de l'épithélium colique associée à une modification du microbiote intestinal en faveur des bactéries à Gram négatif (Enterobacteriaceae) a été démontrée durant la colite aigüe induite par le DSS (Heimesaat *et al.*, 2007). La reconnaissance de ces bactéries induit l'activation du facteur de transcription NF-κB et l'expression de médiateurs pro-

inflammatoires tels que les cytokines pro-inflammatoires et le NO (Caamano et Hunter, 2002). En effet, nous avons relevé la présence d'une corrélation positive dans le profil d'expression du TLR-4, du NF- κ B, et de la NOS-2 au niveau du côlon des souris du groupe 'DSS'. Leur expression était particulièrement prononcée au niveau des cellules inflammatoires infiltrant la lamina propria. Ces données viennent appuyer d'autres études qui mettent en évidence l'implication majeure de la voie de signalisation TLR-4/NF- κ B dans l'engagement des processus inflammatoires au cours de la colite (Liu *et al.*, 2010 ; Siddique et Khan, 2011). Cependant, d'autres auteurs ont rapporté que les souris déficientes en TLR4^{-/-} développaient une colite plus sévère que les souris de type sauvage suite à l'administration du DSS (Zheng *et al.*, 2009). Ainsi, il serait intéressant d'approfondir notre étude et d'explorer les autres cascades de signalisations pouvant conduire à l'activation du NF- κ B.

L'expression du TLR-4 est régulée positivement par les cytokines pro-inflammatoires de la voie TH1. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication de l'IFN- γ dans l'exacerbation de la réponse immunitaire à travers la régulation positive de l'expression du TLR-4 et de son corécepteur MD-2 au niveau des cellules épithéliales intestinales (Abreu *et al.*, 2002 ; Suzuki *et al.*, 2005). Nos résultats ont révélé la présence de taux plasmatiques élevés d'IFN- γ chez les souris du groupe 'DSS'. Ces taux reflètent probablement une surexpression de l'IFN- γ à l'échelle locale qui pourrait réguler positivement l'expression du TLR-4 au niveau de la muqueuse colique. Il serait toutefois, important de compléter notre étude par l'évaluation de la production de l'IFN- γ localement. En outre, nos résultats concordent avec des travaux antérieurs de notre équipe rapportant une forte production d'IFN- γ chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Rafa *et al.*, 2010) et au cours de la colite expérimentale induite par le DSS (Soufli *et al.*, 2015).

L'IFN- γ est largement incriminé dans le développement de la colite expérimentale induite par le DSS (Ito *et al.*, 2006). Ses effets délétères exercés par l'IFN- γ passent par de nombreux mécanismes tels que l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales, l'augmentation de la perméabilité intestinale, le chimiotactisme des leucocytes au niveau des lésions tissulaires et l'induction de l'expression de la NOS-2 responsable de la production accrue de NO.

Nos résultats ont montré la présence de taux élevés de NO à l'échelle systémique et locale ainsi qu'une surexpression de la NOS-2 au niveau de la muqueuse colique des souris du groupe 'DSS'. Rappelons que lorsque le NO est associé à l'apparition des lésions tissulaires au cours des MICI.

L'administration thérapeutique des probiotiques aux souris du groupe 'DSS+Prb' a induit une diminution drastique de l'expression *in situ* du TLR-4, du NF- κ B et de la NOS-2 au niveau de la muqueuse colique en comparaison avec les souris du groupe 'DSS'. Nos résultats suggèrent que l'effet anti-inflammatoire des probiotiques passe par la régulation négative de la voie de signalisation TLR-4/NF- κ B. Ces résultats corréleront avec la diminution des taux plasmatiques d'IFN- γ et de NO ainsi que de l'expression de la NOS-2 au niveau du côlon. Nos résultats concordent avec les travaux de Lee *et al.* rapportant la capacité de la bactérie commensale *Lactobacillus suntoryeus* à inhiber la production des médiateurs de l'inflammation à travers l'inhibition de la voie TLR-4/NF- κ B dans un modèle de colite expérimentale (Lee *et al.*, 2009). En outre, plusieurs études menées sur différents modèles murins de colite ont démontré la capacité des probiotiques à inhiber la production des cytokines pro-inflammatoires telle que l'IFN- γ (Lee *et al.*, 2008 ; Roselli *et al.*, 2009 ; Owaga *et al.*, 2015).

Les probiotiques peuvent réguler négativement la voie de signalisation TLR-4/NF- κ B à travers l'augmentation de l'expression de l'enzyme inhibitrice A20 au niveau des cellules épithéliales intestinales (Villena et Kitazawa, 2014). Ils peuvent également inhiber le facteur NF- κ B et exercer leurs effets anti-inflammatoires via le récepteur nucléaire PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Ce dernier atténue la sévérité de la colite en se liant avec la sous unité P65 (Rel A) du facteur NF- κ B au niveau du noyau. Le complexe formé est par la suite redirigé vers le cytoplasme (Kelly *et al.*, 2004).

Dans notre étude, outre la production élevée de l'IFN- γ chez les souris du groupe 'DSS', l'analyse par RT-PCR a révélé une surexpression hautement significative des gènes codant l'IL-6, le TGF- β et le CCR-6 en comparaison avec le groupe 'Ctrl'. Ces taux élevés expliquent la persistance de l'inflammation chez les souris du groupe 'DSS'. Nos

résultats concordent avec les travaux de Naito *et al.*, montrant une surexpression de l'ARNm de l'IL-6 au niveau du côlon au cours de la colite aigüe induite au DSS.

Ces auteurs ont également montré que la délétion du gène de l'IL-6 chez les souris s'accompagne d'une diminution de l'expression de la NOS-2 et du TNF- α ainsi que par une atténuation de la sévérité de la colite (Naito *et al.*, 2004). Notons que le rôle de l'IL-6 dans la régulation de la réponse immunitaire est dose-dépendant, variant fortement en fonction du contexte physiopathologique et de la voie de signalisation mise en jeu.

Le TGF- β est connu pour être une cytokine importante dans le processus de cicatrisation des plaies et la réparation des altérations tissulaires. Des taux élevés de TGF- β ainsi qu'une sur expression de ses transcrits ont été retrouvés au niveau de la muqueuse colique des patients atteints de MICI (Rafa, 2013). Nos résultats concordent avec les travaux de Koga *et al.* montrant la présence de taux élevés de TGF- β chez des souris ayant reçu du DSS suivie d'une semaine de rémission (Koga *et al.*, 2008).

Par ailleurs, le TGF- β et l'IL-6 orchestrent la différenciation des lymphocytes T vers un profil Treg de manière dose-dépendante. Un environnement cytokinique pro-inflammatoire riche en IL-1 β et en IL-6 favorise la polarisation des LT naïfs vers un profil TH17, d'une part et induit la conversion des cellules Treg en cellules TH17 d'autre part (Liu *et al.*, 2008 ; Samanta *et al.*, 2008). Cette plasticité cellulaire a été mise en évidence au niveau des LT exprimant à la fois les facteurs de transcription Foxp3 et ROR- γ t spécifiques aux cellules Treg et TH17 respectivement (Weaver et Hatton, 2009). Bien que l'IL-17A, l'IL-23 et l'IL-1 β n'ont pas été dosées dans notre étude, il est probable que les taux élevés de l'IL-6 et du TGF- β aient favorisé la différenciation des cellules TH17 au niveau du côlon des souris du groupe 'DSS'. Ces cellules induisent une réponse inflammatoire exacerbée et des dommages tissulaires au niveau de la muqueuse colique (Korn *et al.*, 2009). En outre, l'augmentation non significative du Foxp3, marqueur des Treg, chez les souris du groupe 'DSS' pourrait traduire l'absence d'une régulation suffisante de la réponse immunitaire durant la phase de rémission. En effet, une diminution du nombre de lymphocytes Treg a été rapportée chez les patients atteints de MICI (Maul *et al.*, 2005).

Nos résultats ont également révélé une augmentation significative des transcrits du récepteur de chimiokine CCR-6 chez les souris du groupe 'DSS'. Le rôle exact de ce récepteur dans la physiopathologie des MICI est encore mal défini. Cependant, il semble jouer un rôle important dans la migration des cellules TH17 au site de l'inflammation colique où elles amplifient la réponse immunitaire. Les travaux de Verona et al ont montré que l'administration du DSS à des souris CCR6-/- induit une colite moins sévère en comparaison avec les souris sauvage (Verona *et al.* , 2003).

Nos résultats ont montré que le traitement des souris du groupe 'DSS+Prb' par les probiotiques induit une diminution de l'expression des transcrits de l'IL-6 et du CCR-6 de manière significative au niveau de la muqueuse colique en comparaison avec les souris du groupe 'DSS'. En revanche, une faible augmentation du TGF- β a été observée. Nos résultats ont également mis en évidence une surexpression significative des transcrits du facteur de transcription FoxP3. Ces résultats sont corrélés à une amélioration de l'organisation tissulaire du côlon ainsi qu'une régression de l'expression du TLR-4, du facteur de transcription NF- κ B et de la NOS-2. De nombreuses études ont démontré que certaines souches probiotiques, notamment les bifidobactéries pouvaient moduler la fonction et la maturation des cellules dendritiques de façon à induire une réponse T régulatrice capable d'exercer des activités immunosuppressives. Ainsi, il a été démontré que certaines souches probiotiques (*L. reuteri* et *L. casei*) sont capables d'induire les cellules dendritiques tolérogènes qui favorisent l'apparition des cellules Treg (Smits *et al.*, 2005). D'autres études ont montré que l'administration du VSL#3 durant la phase de rémission améliore la sévérité de la colite chez les souris SJL/J en induisant une réponse immunorégulatrice impliquant l'augmentation des cellules Treg productrices de TGF- β et de l'IL-10 (Di Giacinto *et al.*, 2005). En outre, les études de Tanabe et al réalisées sur la souche probiotiques *B infantis* ont mis en évidence la capacité de cette bactérie à inhiber la production *in vitro* de l'IL-17A par des splénocytes et des explants coliques stimulés avec le TGF- β +IL-6 et le DSS respectivement (Tanabe *et al.*, 2008). Hart et al ont démontré que les cellules dendritiques humaines purifiées à partir du sang périphérique ou de la lamina propria, traitées avec le probiotique VSL#3 produisent des taux élevés d'IL-10 et de faibles taux d'IL-12 (Hart *et al.*, 2004). Les probiotiques peuvent également exercer un rôle anti-inflammatoire en agissant sur les cellules épithéliales intestinales. En

effet, Zhang et al ont montré que les bactéries *L. reuteri* et *L. rhamnosus* GG inhibent la production d'IL-8 par les cellules Caco-2 stimulées avec le TNF- α (Zhang *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les effets anti-inflammatoires des bactéries probiotiques semblent être spécifiques à la souche utilisée. En effet, les travaux de Hart et al ont permis d'observer une différence dans les fonctions immuno-modulatrices des lactobacilles et des bifidobactéries (Hart *et al.*, 2004). Cette différence d'action entre les différentes bactéries lactiques est attribuée à des variations dans la composition de la paroi cellulaire de ces bactéries ainsi qu'à la nature des récepteurs (TLR et NOD) avec lesquels elles interagissent (Zeuthen *et al.*, 2008). De ce fait, il serait intéressant de réaliser une étude comparative entre les effets des différentes bactéries composant l'Ultrabiotique®, administrées de manière individuelle.

Les effets anti-inflammatoires des probiotiques peuvent être également médiés par l'ADN bactérien. Celui-ci peut interagir avec le système immunitaire de l'hôte via le récepteur TLR-9. Il a été démontré que les séquences d'ADN contenant des motifs CpG non méthylés des bactéries interagissent avec le TLR-9 au niveau des cellules dendritiques et atténuent la sévérité de la colite induite par le DSS (Rachmilewitz *et al.*, 2004). En outre, les capacités anti-inflammatoires des probiotiques seraient également médiées par la composition de leur paroi. En effet, Matsumoto et al ont démontré que le complexe polysaccharide-peptidoglycane de *Lactobacillus casei* inhibe la production de l'IL-6 par les PBMCs de patients atteints de rectocolite hémorragique stimulées préalablement par le LPS (Matsumoto *et al.*, 2005).

Outre la modulation du système immunitaire, les effets bénéfiques des probiotiques peuvent s'exercer à différents niveaux. Il est probable que l'administration de l'Ultrabiotique® aux souris du groupe 'DSS+Prb' ait maintenu l'équilibre du microbiote intestinal en empêchant l'installation d'une flore colitogène. En effet, les probiotiques peuvent entrer en compétition avec les agents pathogènes pour les nutriments et les sites de fixation présents à la surface de l'épithélium. De plus, il a été démontré que les bifidobactéries et les lactobacilles sont capables de produire des molécules antimicrobiennes ou d'induire la production de β -défensines par les cellules de Paneth. (Figure 41) (O'Toole et Cooney., 2008).

Il serait important de poursuivre notre étude et de confirmer les effets thérapeutiques et anti-inflammatoires de l'Ultrabiotique® dans un modèle de colite chronique induite par le DSS. En effet, ce modèle serait plus représentatif de la pathologie humaine, il est caractérisé par une inflammation chronique médiée principalement par les lymphocytes T

Partie 2 : Etude de l'effet immunomodulateur des probiotiques sur la production du monoxyde d'azote chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Cette partie de notre étude a été réalisée sur des patients atteints de la maladie de Crohn (MC) ou de la rectocolite hémorragique (RCH). Tous les patients recrutés au cours de notre étude qu'ils soient en phase active ou quiescente étaient sous traitement. Le choix des patients ne s'est pas fait de façon arbitraire mais selon la disponibilité des échantillons sanguins. Pour les différents tests réalisés, le classement des patients en fonction de la phase de la maladie ou du type de traitement administré n'a pas montré de différence significative dans la production du NO. Nous nous sommes donc limités à catégoriser les patients uniquement en fonction de la pathologie MC ou RCH.

Nos résultats ont montré la présence de taux élevés de NO chez les patients atteints de MICI en comparaison avec les sujets sains. Ces taux sont significativement plus élevés chez les patients atteints de la MC que chez les patients atteints de la RCH. En accord avec les travaux antérieurs menés par notre équipe ainsi que par d'autres équipes, nos résultats confirment l'implication de cette biomolécule dans les mécanismes physiopathologiques des MICI. Ces études ont rapporté la présence de teneurs élevées de NO durant la phase active de la maladie, faisant de lui un facteur étiologique important impliqué dans l'évolution et la chronicité des MICI (Kimura *et al.*, 1997; Rafa *et al.*, 2010). Par ailleurs, plusieurs manifestations observées au cours des MICI telles que l'augmentation de la perméabilité intestinale et vasculaire ainsi que la vasodilatation de la muqueuse sont liées aux effets directs ou indirects du NO.

Au niveau des plasma des patients atteints de MICI, nous avons également procédé au dosage de l'IL-22 par la technique ELISA. Nos résultats ont mis en évidence la présence de taux plasmatiques élevés de l'IL-22 chez les patients atteints de MICI. Ces taux restent toutefois plus élevés dans la MC que dans la RCH. Selon Wolk et al l'IL-22 joue un rôle régulateur important dans la MC en raison de sa capacité à limiter la réponse inflammatoire systémique. En effet, ces auteurs ont démontré que l'IL-22 induit la production des protéines de liaison au LPS (LBP) par les hépatocytes. Ces protéines sont des PRR solubles présents dans le plasma de manière constitutive. Leur rôle consiste à détecter les motifs bactériens tels que le LPS et les présenter aux cellules immunocompétentes (Wolk *et al.*, 2007). Cependant, le rôle protecteur et anti-inflammatoire de l'IL-22 dépend probablement du contexte inflammatoire, de la durée et la quantité de l'IL-22 produite et le tissu impliqué. Il serait donc important de compléter notre étude à travers l'évaluation du taux de production locale de l'IL-22 chez les deux catégories de patients en phase active et de rémission.

Dans le but d'explorer davantage le rôle des probiotiques dans la modulation de la réponse immunitaire, nous avons étudié les effets de leur surnageants de culture sur la production du NO par les PBMCs de patients atteints de MICI. En effet, bien que certains effets des probiotiques nécessitent un contact direct entre les bactéries et les cellules épithéliales, de nombreuses études ont rapporté la capacité des probiotiques à sécréter des métabolites actifs, anti-inflammatoires et cyto-protecteurs. Le surnageant de culture constitue le milieu de culture dans lequel les micro-organismes probiotiques ont été cultivés puis éliminés par filtration. Ainsi, il est dépourvu de tout micro-organisme et ne présente aucun risque d'infection. Son utilisation a été proposée afin de palier au risque associé à l'ingestion de grandes charges bactériennes.

Dans notre étude, nous avons traité les PBMCs de patients atteints de MICI avec différentes dilutions (1/2, 1/8, 1/32) du surnageant de culture de *Saccharomyces boulardii* (sSb) et d'un cocktail de lactobacilles et de bifidobactéries (sPro) contenus respectivement dans l'Ultralevure® et l'Ultrabiotique®. Nos résultats ont montré une diminution des taux de nitrites au niveau des PBMCs des deux catégories de patients suggérant un rôle anti-inflammatoire des métabolites sécrétés par les probiotiques.

Les données de la littérature dans leur ensemble suggèrent un effet anti-inflammatoire de *Saccharomyces boulardii* et de ses métabolites. Cet effet est médié par l'inhibition de l'activation du facteur de transcription NF- κ B, et de la voie de signalisation des MAPK ainsi que par l'inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8, le TNF- α , l'IL-1 β , l'IFN- γ (Thomas et Baumgart, 2012). Dans un modèle expérimentale d'atteinte gastrique, le surnageant de culture de *S. boulardii* a également induit l'inhibition de l'activité de la NOS-2 (Girard *et al.*, 2005).

Concernant l'effet anti-inflammatoire potentiel du surnageant de culture des bactéries constituant l'Ultrabiotique®, nous suggérons qu'il serait probablement médié par le butyrate, un acide gras à chaînes courtes généré après fermentation de l'inuline, un fructo-oligosaccharides présent dans le milieu de culture de ces bactéries. En effet, de nombreuses études ont démontré que le butyrate est capable d'inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires à travers l'inhibition de l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- α (Segain *et al.*, 2000). Par ailleurs, les travaux de Sokol *et al.* ont montré que le surnageant de culture de *Faecalibacterium prausnitzii*, riche en butyrate exerce de nombreuses propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et au cours de la colite expérimentale induite par le TNBS (Sokol *et al.*, 2008). Par ailleurs selon les travaux de Petrof *et al.*, les effets anti-inflammatoires des métabolites produits par les probiotiques tel que *Lactobacillus plantarum* sont dues à leur capacité à bloquer l'activation du facteur NF- κ B à travers l'inhibition du protéasome (Petrof *et al.*, 2004). Enfin, dans une étude réalisée sur la souche *Lactobacillus acidophilus*, il a été démontré que celle-ci sécrète une protéine extracellulaire nommée SlpA capable de diminuer la réponse pro-inflammatoire à travers l'induction de la production de l'IL-10 par les cellules dendritiques (Konstantinov *et al.*, 2008).

Il apparaît toutefois nécessaire d'augmenter la taille de notre échantillonnage et de recruter des patients naïfs de tout traitement afin de mieux caractériser l'effet des surnageants de culture des probiotiques chez les différentes catégories de patients (en phase active et de rémission). De plus, il serait important d'identifier et de caractériser les fractions moléculaires bioactives responsables de la modulation de la production du NO.

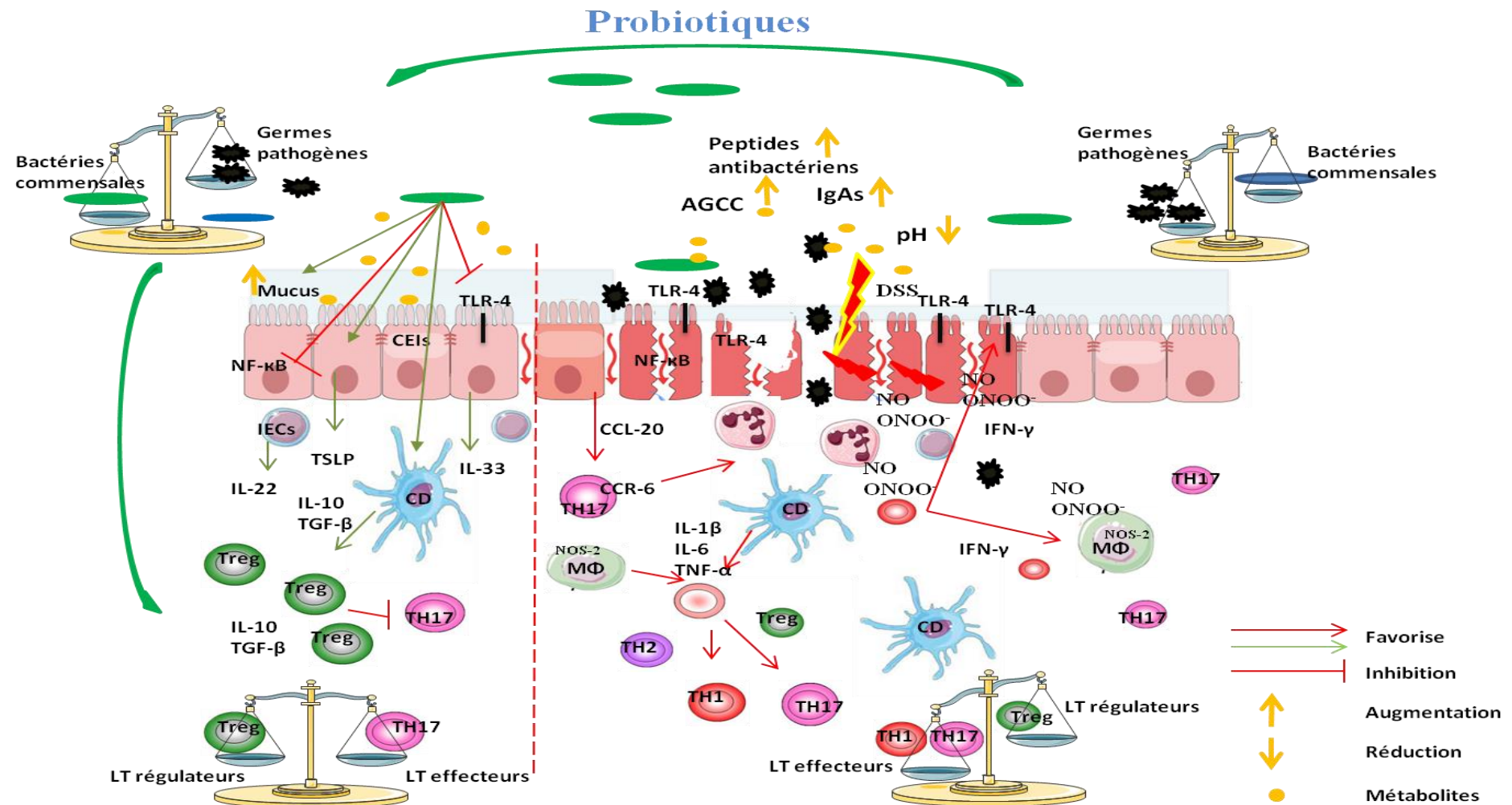


Figure 41 : Schéma récapitulatif, proposé pour illustrer le rôle immuno-modulateur des probiotiques au cours de la colite expérimentale. DSS: Dextran Sulfate Sodium; DC: cellule dendritique tolérigène; MΦ : macrophage ; AGCC : Acides gras à chaînes courtes ; NO: monoxyde d'azote, NOS-2: nitric oxide Synthase-2; TLR: toll like receptor.

Conclusion

Conclusion :

Ce travail de thèse avait pour objectif principal l'élucidation des mécanismes d'action des probiotiques au cours des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin mettant ainsi en exergue le rôle du microbiote intestinal. L'utilisation d'un modèle de colite aigue incluant une phase de rémission nous a permis d'élargir le spectre des potentialités thérapeutiques de l'Ultrabiotique®, un probiotique composé de lactobacilles et de bifidobactéries. Nos résultats montrent clairement les effets des bactéries probiotiques dans l'induction et l'accélération de la phase de rémission.

Outre le maintien de l'équilibre du microbiote intestinal, les probiotiques ont la particularité de moduler la réponse immunitaire pro-inflammatoire vers un profil anti-inflammatoire et immuno-régulateur. Notre étude a permis de situer les différents niveaux d'action des probiotiques dans la régulation de la réponse inflammatoire. Il apparait clairement que les probiotiques modulent négativement l'expression du TLR-4 et l'activation de la voie de signalisation NF- κ B. Par ailleurs, notre étude renforce nos résultats antérieurs, et met en évidence la capacité des probiotiques à réguler négativement la production locale et systémique du NO ainsi que de l'IFN- γ , inducteur majeur de la NOS-2.

Les propriétés immunorégulatrices des probiotiques se sont traduites par la diminution de l'expression colique de l'IL-6 et du CCR-6 et une augmentation de l'expression du TGF- β et du facteur de transcription FoxP3, marqueur de la population Treg.

Il apparait à travers notre étude, le rôle clé des probiotiques dans le maintien de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. Nous avons dans cet optique, mis en évidence leur capacité à stimuler la sécrétion du mucus et à induire l'expression colique de l'IL-22/IL-22R et de l'IL-33.

Par ailleurs, à travers l'étude des effets des métabolites solubles générés par les probiotiques, nous avons mis en évidence le rôle immunomodulateur des surnageants de culture des probiotiques sur la production du NO *ex vivo* chez des patients atteints de MICI.

Au regard global de notre étude, il en ressort que l'utilisation des probiotiques ou de leurs métabolites comme stratégie thérapeutique alternative ou complémentaire au traitement conventionnel, ouvre des perspectives prometteuses dans la régulation des processus inflammatoires et la dysbiose associés aux Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin.

Références bibliographiques

A

Aamann L, Vestergaard EM, & Grønbaek H. (2014). Trefoil factors in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*; **20**(12): 3223–3230.

Abdelouhab K, Rafa H, Toumi R, Bouaziz S, Medjeber O, Touil-Boukoffa C(2011). Mucosal intestinal alteration in experimental colitis correlates with nitric oxide production by peritoneal macrophages: Effect of probiotics and prebiotics. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*; **34**:590-597.

Abraham C et **Medzhitov**, R. (2011) Interactions Between the Host Innate Immune System and Microbes in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*; **140**:1729-1737.

Abreu M, Arnold E T, Thomas L S, Gonsky R, Zhou Y, Hu B and Ardit M. TLR4 and MD-2 (2002). Expression Is Regulated by Immune-mediated Signals in Human Intestinal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem*; **277**:20431-20437.

Abreu M. (2010) Toll like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol*; **10**:131–144.

Actis GC. (2016). The Changing Face of Inflammatory Bowel Disease: Etiology, Physiopathology, Epidemiology. *Ann Colorectal Res*; In Press(In Press): e32942.

Alex, Zachos N C, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X (2009). Distinct Cytokine Patterns

Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-Induced Colitis. *Philip Inflamm Bowel Dis*; **15**(3): 341–352.

Appleman HD. (2008) What Are the Critical Histologic Features in the Diagnosis of Ulcerative Colitis? *Inflamm Bowel Dis*; **14**: 164-165.

Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, ParksWC, Selsted ME, Ouellette AJ. (2000) secretion of microbicidal α defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*; **1**:113-118.

Azizpour K, Bahrambeygi S, Mahmoodpour S . (2009) History and Basic of Probiotics. *Research Journal of Biological Sciences*; **4**: 409-426

B

Bantel H, Berg C, Vieth M, Stolte M, Kruis W, Schulze-Osthoff K. (2000) Mesalazine Inhibits Activation of Transcription Factor NF-kB in Inflamed Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol*; **95**:3452-3457.

Barrett JC et **Cardon** LR (2006) Evaluating coverage of genome wide association studies. *Nat. Genet* ; **38** (6) :659e662.

Baumann H et **Gauldie** J.(1994). The acute phase response. *Immunol Today*; **15**: 74-80.

Baumgart DC, **Sandborn** WJ. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*; **369**: 1641-57.

Beck DE (2003). Handbook of colorectal surgery second edition. *Informa Health Care*: 544.

Becker C, Neurath MF, et Wirtz S. (2015) The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR Journal* ;**56**(2) : 192–204

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **87**:1620-1624.

Begue B, Wajant H, Bambou JC, Dubuquoy L, Siegmund D, et al. (2006). Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. *Gastroenterology*; **130**: 1962-1974.

Belenky SN, Robbins RA, Rubinstein I. (1993). Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis in vitro. *J Leukoc Biol*; **53**:498-503.

Belguendouz H, Messaouden D, Hartani D, Chachoua L, Ahmedi ML, Lahmar-Belguendouz K, Lahlou-Boukoffa OS & Touil-Boukoffa C. (2008). Effet de la corticothérapie sur la production des interleukines 8, 12 et du monoxyde d'azote au cours des uvéites Behçet et idiopathique. *JFO*; **31**(4): 387-395.

Benight NM, Stoll B, Marini JC, Burrin DG. (2012) Preventative oral methylthioadenosine is anti-inflammatory and reduces DSS-induced colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; **303**: G71-G82

Bevins C L., et Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*; **9**:356-368.

Bibiloni R, et al (2005). VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*; **100**(7):1539-46.

Bilsborough J, George TC, Norment A, Viney JL (2003). Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology*; **108**:481–492.

Bodera P et **Chcialowski** A. (2009) Immunomodulatory Effect of Probiotic Bacteria. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*; **3**: 58-64.

Borody TJ, Paramsothy S, Agrawal G (2013). Fecal microbiota transplantation: indications, methods, evidence, and future directions. *Current gastroenterology reports*; **15**: 337.

Boukercha A, Mesbah-Amroun H, Bouzidi A, Saoula H, Nakkemouche M, Roy M, Hugot J-P et Chafia Touil-Boukoffa (2015). NOD2/CARD15 gene mutations in North Algerian patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*; **21**(25): 7786–7794.

Boukercha A. (2015). Contribution des polymorphismes des gènes de cytokines, du gène NOD2 et du gène PTPN22 dans la susceptibilité et la sévérité au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans la population algérienne. (thèse de doctorat).

Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Marquardt A, Jagla W, Popp A, et al. (2006). IL 22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*; **290**:G827–G838.

Brown EM, Sadarangani M, Finlay B B. (2013) The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology*; **14**: 660–667.

C

Caamaño J et**Hunter** CA. (2002) NF- κ B Family of Transcription Factors: Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions. *Clin. Microbiol. Rev.*; **15**; 3 414-429.

Calop J, Limat S, Fernandez C. (2008). Pharmacie clinique et thérapeutique. Ed.3, Elsevier Masson: 248-68.

Camelo A, Barlow JL, Drynan LF, Neill DR, Ballantyne SJ, Wong SH, Pannell R, Gao W, Wrigley K, Sprengle J, McKenzie ANJ. (2012) Blocking IL-25 signalling protects against gut inflammation in a type-2 model of colitis by suppressing nuocyte and NKT derived IL-13. *J Gastroenterol* ;**47**:1198–1211.

Cario E. (2012). Commensal-innate immune miscommunication in IBD pathogenesis. *Digestive Diseases* ;**30**:334–340.

Carrasco T G, Morales R A, Pérez F, Terraza C, Yáñez L, Campos M, Pino-Lagos K. (2015). Alarmin immunologists: iL-33 as a putative target for modulating T cell-dependent responses. *Front. Immunol* ; 6:232.

Carulli AJ, Samuelson LC, Schnell S. (2014) Unraveling intestinal stem cell behavior with models of crypt dynamics. *Integr. Biol*; **6**:243.

Cerf-Bensussan N et**Gaboriau-Routhiau** V. (2010) The immune system

and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology*; **10** : 735-744.

Chassaing B, Aitken J D, Malleshappa M, Vijay-Kumar M (2014). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol* ;**104**: Unit–15.25.

Chow J et**Mazmanian**SK. (2009). Getting the Bugs out of the Immune System: Do Bacterial Microbiota “Fix” Intestinal T Cell Responses? *Cell Host & Microbe*; **5** :12.

Christ AD et**Blumberg** RS. (1997). The intestinal epithelial cell: Immunological aspects. *Springer Semin. Immunopathol*; **18**:449-461.

Clancy, R (2003). Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol.Med.Microbiol*; **38**:9-12.

Cong Y, Brandwein S, McCabe R, Lazenby A, Birkenmeier E, Sundberg J et Elson C. (1998). CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: Increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *Journal of Experimental Medicine*; **187**: 855-864.

Coombes JL; Siddiqui KR; Arancibia-Car. camo CV, Hall J; Sun CM; Belkaid Y, Powrie FA. (2007). functionally specialised population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T-cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent manner. *J. Exp. Med*; **204**:1757–1764.

Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med* ;**16**:90-97.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Laboratory investigation; *a journal of technical methods and pathology*; **69(2)**:238-249.

Cosnes J et al., (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*; **140(6)**: 1785-1794.

Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer G D. (1932). Regional Ileitis Pathologic And Clinical Entity. *JAMA*; **99**:1323-1329.

D

Dalal SR et Chang EB.(2014). The microbial basis of inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest*; **124**:4190-4196.

Daliri E B-M, Byong H L (2015). New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness* ; **4**:56–65.

Danese S, Sans M, Fiocchi C. (2004) Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Reviews*; **3**:394.

De Lange K M et Barrett JC. (2015). Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *Journal of Autoimmunity*; **64** :91e100.

Desreumaux P, Bourreille A, Colombel JF. (2003). Physiopathologie des MICI : “qu’en est-il des tests diagnostiques et prédictifs non invasifs ? *Gastroenterol Clin Biol*; **27**:1S81-1S86.

Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M (2005). Probiotics ameliorate recurrent Th -1 mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF- β - bearing regulatory cells. *J Immunol*; **174**:3237-46.

Dieleman LA. et al. (1994) Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*; **107**: 1643-1652.

Dolpady CS, Di Pietro C, Cosorich I, Ferrarese R, Saita D, Clementi M, Canducci F, Falcone M (2016) Oral Probiotic VSL#3 Prevents Autoimmune Diabetes by Modulating Microbiota and Promoting Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Enriched Tolerogenic Intestinal Environment. *Journal of Diabetes Research*; **12**.

Dou W, Zhang J, Sun A, Zhang, E, Ding L, Mukherjee S, Wei X, Chou G, Wang Z-T, Mani S (2013) Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *Br J Nutr*. August; **110(4)**: 599–608.

Duerr RH. et al .(2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*; **314**:1461-3.

E

Eckburg PB , Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, and Relman D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*; **308**:1635.

Ek WE, D’Amato M, Halfvarson J (2014) The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*; **27(4)**: 294–303.

Evans, B. (2000) Inflammatory bowel disease. *Gastrointestinal disorders*; **11**: 163-178.

F

Farahat K, Sobhani I, Bonnaud G, Vallot T, Vissuzaine C, Mignon M. (1999). Rectocolite ulcéro-hémorragique : épidémiologie, diagnostic, histoire naturelle et stratégie thérapeutique. *Encycl Med Chir, Gastro-entérologie*; 24.

Fava F et Danese, S. (2011) Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J Gastroenterol*; **17**: 557.

Flores A I, Gómez-Gómez G J, Masedo-González Á, Martínez-Montiel M P (2015). Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: A promising therapeutic strategy? *World J Stem Cells*; **7(2)**: 343-351.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (**FAO/WHO**). (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*; **104**:13780-13785.

Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, et Tlaskalova-Hogenova H. (2008). Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Patients With Inflammatory Bowel Diseases: Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients With Ulcerative Colitis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; **56(3)**:267-274.

Fuller R (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.

Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT (2005). Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut*; **54**: 242-9.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. (1996) Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* ; **157**:1261-1270

Fuss IJ, Strober w (2008). The role of IL-13 and NKT cells in experimental and human ulcerative colitis. *Mucosal immunology*; **1**: S31-S33.

G

Gaboriau-Routhiau, V. et al. (2009) The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*; **31**:677-689.

Geboes K. (2003). Histopathology of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *IBD4E*; **18** :255-276.

Gerbe F, Legraverend C, Jay P (2012) The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci*; **69**:2907-2917.

Giahi L, Aumüller, Elmadfa I, Haslberger AG (2012). Regulation of TLR4, p38 MAPkinase, IκB and miRNAs by inactivated strains of lactobacilli in human dendritic cells. *Benef Microbes* ; **3(2)**:91-8.

Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE.(2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*; **312**(5778):1355-9.

Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M.(2000). Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*; **119**(2):305-9.

Giorgetti GM, Brandimarte G, Fabiocchi F, Ricci S, Flamini P, Sandri G, Cristina MT, Elisei W, Penna A et al. (2015). Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *Journal of Immunology Research*: 7 .

Girard P, Pansart Y et Gillardin J-M. (2005). Inducible nitric oxide synthase involvement in the mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhoea in rats. *Nitric Oxide*; **13**(3):163-9.

Gkouskou KK, Deligianni C, Tsatsanis C, and Eliopoulos A G. (2014) The gut microbiota in mouse models of inflammatory bowel disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* ; **4** : 1-6.

Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, et al. (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin 10 receptor. *N Engl J Med*; **361**: 2033-2045.

Goldberg R, Prescott N, Lord GM, MacDonald TT , Powell N. (2015) The unusual suspects—innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD.

Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology; **12**:271–283.

Goulet, O. (2009). La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *Journal de pédiatrie et de puériculture*; **22** : 102.

Grabsch HI (2013). Alimentary system. In Underwood's Pathology: A Clinical Approach S.S. Cross, ed.pp. 731.

Groschwitz KR et **Hogan** SP.(2009). Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*; **124**(1): 3–22.

Gross F, van der Meulen J, Snel J, van der Meer R, Kleerebezem M, et al (2008) Mannose-specific interaction of *Lactobacillus plantarum* with porcine jejunal epithelium. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*; **54**, 215–223.

Groß P, Doser K, Falk W, Obermeier F, Hofmann C. (2012) “IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases*; **18**:1900-1909.

Guarner F. (2006) Enteric Flora in Health and Disease. *Digestion*; **73** : 5.

Guenane H. Hartani, D., Chachoua, L., Lahlou Boukoffa, O.S., Mazari, F et Touil-Boukoffa, C. (2006). Production of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in Beçet's uveitis and idiopathic uveitis, *J Fr Ophtalmol*. **29**(2): 146-52.

Guindi M, **Riddell** RH (2004). Indeterminate colitis. *J Clin Pathol*; **57**:1233-1244.

Guslandi M, Mezzi G, Soghi M, Testoni P A. (2005) *Saccharomyces boulardii* in Maintenance Treatment of Crohn's Disease. *Digestive Diseases and Sciences*; **45**:1462-1464.

H

Hakansson A, Tormo-Badia N, Baridi A, Xu J, Molin G, Hagslatt M-L, Karlsson C, Jeppsson B, Cilio C M, Ahrne S. (2015) Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice. *Clin Exp Med* ;15:107–120.

Hammada T, Lemdaoui M C, Boutra F, Zoughailech D, Asselah H. (2011). Aspects épidémiologiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans une population algérienne. *Journal Africain d'Hepato-Gastroenterologi* ;5(4) :293–302.

Hampe J, et al. (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*;39:207-11.

Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. (2000) The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*;12(3):267-73.

Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J et Foey AD. (2013) Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. *Nutrients*;5: 1869-1912.

Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri, M, et al. (2004) Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*; 53: 1602-9.

Hedin C, Whelan K and Lindsay JO. (2007). Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials .

Proceedings of the Nutrition Society;66:307–315.

Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, et al (2007) Shift Towards Pro-inflammatory Intestinal Bacteria Aggravates Acute Murine Colitis via Toll-like Receptors 2 and 4. *PLoS ONE* ;2(7): e662.

Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke JD (2008) Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol*;1:S58-61.

Heller F. et al., (2002). Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* ;17(5) :629–638.

Hendrickson BA, Gokhale BR, Cho JH. (2002). Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology Reviews*; 15: 79-94.

Heyman M et **Ménard** S. (2002) Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*; 59 :001-15.

Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cézard J P. (2003) Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* ;362: 2012–15.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*; 411: 599–603.

Hurst AF. (1931) A Paper on ULCERATIV COLITIS. *British medical journal*; 3668:693-4.

Ignarro L J. (2000). Nitric oxide: biology and pathobiology. *Academic Press*: 1003p.

I

Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Kita M, Ueda Y, Iwakura Y, Kataoka K, Okanoue T, Mazda O (2006). Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, **146**: 330–338.

J

Jacquot S. (1998). Sous-populations lymphocytaires T immunorégulatrices et pathogénie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Hépatogastro*; **6**: 451-7.

Jeon SG; Kayama H; Ueda Y; Takahashi T; Asahara T, Tsuji H; Tsuji NM; et al. (2012) Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10 producing Tr1 cells in the colon. *PLoS One*; **8**: e1002714.

Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA et al. (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* ; **491**: 119–124.

Jung C, Hugot, JP., Barreau F. (2010) Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International Journal of Inflammation*; **12**.

K

Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, Forsythe P. (2009) *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med* ; **179**(3): 186-93.

Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. (2010). Genes and Environment: How Will Our Concepts on the Pathophysiology of IBD Develop in the Future? *Dig Dis*; **28**: 395-405.

Kaser A, Ludwiczek O, Holzmann S, Moschen AR, Weiss G, Enrich B, Graziadei I, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ, Mürzl E, Grasl E, Jasarevic Z, Romani N, Offner FA, Tilg H. (2004). Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol*; **24**(1): 74-85.

Katakura k, Lee J, Rachmilewitz D, Li G, Eckman L, Raz E. (2005). Toll-like receptor9- induced type I IFN- α protects mice from experimental colitis. *The Journal of Clinical Investigation*; **115**: 695-702.

Kawai T et **Akira** S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*; **11**(5): 373-84.

Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG P, Pettersson S, Conway S. (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nature Immunology*; **5**: 104-112.

Kiesler P, Fuss IJ. Et Strober W, (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*; **1**(2): 154–170.

Kirsner JB, et **Elchlepp** J. (1957). The production of an experimental ulcerative

colitis in rabbits. *Transactions of the Association of American Physicians*; **70**: 102–119.

Koch TR. (2003). Colonic diseases. Humana Press: 553p.

Koga H, Yang H, Adler J, Zimmermann EM, Teitelbaum D H. (2008) Transanal Delivery of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Prevents Colonic Fibrosis in a Mouse Colitis Model: Development of a unique mode of treatment. *Surgery*; **144**(2): 259–268.

Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DAF, Westwick J (1998). Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T-lymphocyte derived cytokines. *Gut*; **43**:56-63.

Konstantinov, S R, Smidt H, de Vos WM, Bruijns S C, et al. (2008) S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **105** :19474–19479.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*; **27**:485-517.

Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, Kamm M A, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulz J. (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*; **53**:1617-1623.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*; **75**: 263-274.

Kulkarni AB, Karlsson S. (1993). Transforming growth factor-beta 1

knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol*; **143**:3–9.

Kumar KG, Dhamotharan R, Kulkarni N, Honnagowda S, Murugesan S. (2011). Embelin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *International Immunopharmacology*; **11**: 724-73.

Kwon H K, Leea CG, Soa JS, Chaea CS, Hwanga JS, Sahooa A, Namb JH, Rhee JH, Hwangc KC, Ima SH. (2010) Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **107**(5):2159-64.

L

Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. (2012). Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection microbiology*; **2**: 136.

Lakatos PL. (2006) Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down? *World J Gastroenterol*; **12**(38): 6102-6108.

Lamoril J, Deybach JC, Bouzegarène P. (2007). Genetic aspects of Crohn's disease: a review. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* ; **22** :137-150.

Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J, Targan SR. (2002) Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology*; **123**: 689-699.

Larsson J M. et al (2011). Altered O glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflamm. Bowel Dis*; **(17)**: 2299–30.

Le Barz M, Anhê FF, Varin T V, Desjardins Y, Levy E, Roy D, Urdaci MC, Marette A. (2015) Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J*; **39**:291-303.

Lee HS, Han S-Y, Bae EA, Huh CS, Ahn YT, Lee JH, Kim DH (2008). Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int. Immunopharmacol* ;**8**:574–580.

Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocaru G, Shenouda S, et al. (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol*; **8**: 1327–1336.

Lee JH, Lee B, Lee HS, et al (2009). *Lactobacillus* *suntoryensis* inhibits pro inflammatory cytokine expression and TLR4 linked NF-kappaB activation in experimental colitis. *Int J Colorectal Dis*; **24**:231–237.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. (2011) New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* ; **60**:1739-1753.

Lemann M et Allez M. (2004). Maladie de crohn et rectocolite hémorragique. *La revue du praticien* ;**54** :2161.

Li L-J, Gong C, Zhao M-H, Feng B-S (2014) Role of interleukin-22 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*; **20(48)**: 18177–18188.

Liu L, Li YH, Niu YB, et al (2010). An apple oligogalactan prevents against inflammation and carcinogenesis by targeting LPS/TLR4/NF-κB pathway in a mouse model of colitis-associated colon cancer. *Carcinogenesis*; **31**:1822–1832.

Liu Y, et al. (2008) A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol*; **9**:632– 640.

Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Pizarro TT (2012) “Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis and Tissue Repair*; **5**:8.

Lowenstein JC, Alley EW, Raval P, Snowmunt AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. (1998). Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **90**: 9730-9734.

Lucke K, Miehle S, Jacobs E. Schuppler M. (2006). Prevalence of *Bacteroides* and *Prevotella* spp. in ulcerative colitis. *J Med Microbiol* ;**55**: 617–624.

M

Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth M A. (2003) Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*; **52(6)**: 827–833.

Macpherson AJ, Harri NL. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*; **4**: 478-485.

- Mar J S, A N** Nagalingam, Song Y, Onizawa M, Woo Lee J, Lynch S V. (2014) Amelioration of DSS-induced murine colitis by VSL#3 supplementation is primarily associated with changes in ileal microbiota composition. *Gut Microbes*; **(5)**:Iss. 4.
- Marteau P.** (2006). Probiotics, prebiotics, synbiotics: ecological treatment for inflammatory bowel disease? *Gut*; **55**:1692-1693.
- Matricon J**, Barnich N, Ardid D. (2010). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self/Nonself*; 299-309.
- Matsumoto S**, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M (2005). Probiotic *Lactobacillus* induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*; **140**:417–26.
- Maul J**, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, et al. (2005) Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25^{high} T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* ;**128**:1868–1878.
- Mazmanian SK**, Round JL, Kasper DL (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*; **453**:620–625.
- McGovern D**, Powrie F. (2007) The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut*; **56**:1333–1336.
- Meddour Y**, Chaib S, Bousseloub A, Kaddache N, Kecili L, Gamar L, Nakkemouche M, Djidjik R, Abbadi MC, Charron D, Boucekkine TE, Tamouza R. (2014). NOD2/CARD15 and IL23R genetic variability in 204 Algerian Crohn's disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*; **38(4)**:499-504.
- Melmed GY**, Targan SR (2010). Future biologic targets for IBD: potentials and pitfalls *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*; **7**:110-117.
- Metchnikoff E.** (1907) Lactic acid inhibiting intestinal putrefaction. The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London: 161.
- Metchnikoff E.** (1908) Etudes sur la flore intestinale. *Ann. Inst. Pasteur Paris* ;**22**:929-55.
- Midvedt T.** (2012). The gut: a triggering place for autism possibilities and challenges. *Microb Ecol Health Dis*; **23**.
Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot I C, Nicholls R J, Gionchetti P, Campieri M, Kamm M A. (2004) Once daily high dose probiotic therapy [VSL#3] for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut*; **53**:108-14.
- Mizoguchi A** (2012). Healing of intestinal inflammation by IL -22. *Inflamm Bowel Dis*; **18**: 1777-1784.
- Moller FT**, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. (2015) Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977–2011. *The American Journal of Gastroenterology* ;**110**: 564-571.
- Molodecky NA** et Kaplan GG. (2010). Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology & Hepatology*; **6**: 339-346.
- Molodecky NA**, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel

diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*; **142**:46–54.

Monteleone G, Caruso R, & Pallone, F. (2012). Role of Smad7 in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*: *WJG*; **18(40)**:5664–5668.

Mowat C, Cole A, Windsor AL, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R et al. (2011) Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*; **60**:571-607.

Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*; **317**:256–260.

Mudter J, **Neurath** M F (2007). Apoptosis of t cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut*; **56**:293–303.

Mudter J, **Neurath** MF. (2007) IL-6 Signaling in Inflammatory Bowel Disease: Pathophysiological Role and Clinical Relevance. *Inflamm Bowel Dis*; **13**:1016 -1023.

Mukherjee P K, Sendid B, Hoarau G, Colombel J-F, Poulain D, Ghannoum MA. (2015) Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*; **12**:77-87.

Murthy SNS, Cooper HS, Shim H, et al (1993). Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci*; **38**:1722–34.

N

Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Kuroda M, Kokura S, Ichikawa H, Yanagisawa R, Inoue K, Takano H, Satoh M, Yoshida N, Okanoue T and Yoshikawa T. (2004) Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. *Int J Mol Med*; **14**:191–196.

Neurath M F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*; **14(5)**: 329–342.

Ni J, Chen SF, Hollander D. (1996) Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* ;**39(2)**: 234–241.

Nieuwenhuijs VB, Verheem A, van Duijvenbode Beumer H, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG, Akkermans LM. (1998). The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg*; **228(2)**:188-193.

O

O'Toole PW et **Cooney** JC. (2008) Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*; 9p.

Ogura Y, Bonen D K , Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr R H, Achkar J-P, Brant S, Bayless TM, Kirschner I BS, Hanauer S. B, Nunez G, Cho JH. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*; **411**: 603-606.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. (1990) A novel method in the induction of

reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterol*; **98**: 694-702.

Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. (2002) Dysplasia and carcinoma development in experimental colitis. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulphate sodium-induced colitis model. *J Gastroenterol Hepatol*; **17**: 1078-1083.

Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn W J.(2012). Ulcerative colitis. *Lancet*; **380**: 1606–19.

Owaga E, Hsieh R-H, Mugendi B, Masuku S, Shih C-K, Chang J-S (2015). Th17 Cells as Potential Probiotic Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*; **16(9)**: 20841–20858.

P

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*; **150(3)**:823-32.

Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Tao Y, de Simone C, Chang EB. (2004) Probiotics inhibit nuclear factor kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology*; **127**:1474–1487.

Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr H-A, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, Ouyang W, Neurath MF, Becker C

(2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med*; **206(7)** :1465-1472.

Podolsky DK (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*; **347**:417–429.

Ponder A. (2013). A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease: 237–247.

Potten C S. (1998) Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B*; **353**: 821.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL (1994) Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*; **1**: 553-62.

Powrie F. (2012). Gut reactions: immune pathways in the intestine in health and disease. *EMBO Mol Med* ;**4**: 71.

Pushparaj PN, Li D, KomaiKoma M, Guabiraba R, Alexander J, McSharry C, et al.(2013) Interleukin33 exacerbates acute colitis via interleukin-4 in mice. *Immunology*; **140** :70–77.

Q

R

Rachmilewitz D, Katakura k, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira R, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. (2004)Toll-Like Receptor 9 Signaling Mediates the Anti-inflammatory Effects

of Probiotics in Murine Experimental Colitis. *Gastroenterology*; **126**:520-52.

Rafa H, Amri M, Saoula H, Belkhelfa M, Medjeber O, Boutaleb A, Aftis S, Nakmouche M, Touil-Boukoffa C. (2010) Involvement of IFN- γ in Bowel disease Pathogenesis by Nitric Oxide Pathway: Study in Algerian Patients. *Journal of interferon and cytokine research*; **30**: 691-7.

Rafa H, Saoula H, Belkhelfa M, Medjeber O, Soufli I, Toumi R, & al. (2013). IL-23/IL-17A axis correlates with the nitric oxide pathway in inflammatory bowel disease: immunomodulatory effect of retinoic acid. *Journal of Interferon & Cytokine Research*; **33**(7): 355-368.

Rafa H. (2013). Etude du rôle des cytokines et du NO dans les mécanismes immuno-inflammatoires mis en jeu dans le contrôle, la genèse et la progression des IBD (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin) : Impact sur les biothérapies (Thèse de doctorat).

Rambaud J C, Bouhnik Y, Marteau P, Pochart P. (1993) Manipulation of the human gut microflora. *Proc Nutr Soc*; **52**:357-66.

Rautava S; Arvilommi H; Isolaur E. (2006) Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatr. Res*; **60**: 221–224.

Re F et Strominger JL. (2004) IL-10 released by concomitant TLR-2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR-4 or TLR-3 in human dendritic cells. *J. Immunol*; **173**, 7548–7555.

Read S, Malmstrom V, Powrie F (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated

antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* ; **192** : 295-302.

Reenaers C, Louis E, Belaiche J. (2009) Thérapies biologiques et maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Rev Med Liège*; **64**: 301-304.

Reimund JM , Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. (1996). Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol*; **16**(3):144-50.

Renes IB, Boshuizen JA, Van Nispen DJPM, Bulsing NP, Büller HA, et al. (2002) Alterations in Muc2 biosynthesis and secretion during dextran sulfate sodium induced colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*; **282**: G382–389.

Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. (2009) Principles and clinical implications of the brain gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; **6**(5): p. 306-14.

Rhee SH; Im E; Riegler M; Kokkotou E; O'Brien M; Pothoulakis C. (2005) Pathophysiological role of Toll like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci*; **102**: 13610–13615.

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet*; **39** (5): 596e604.

Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson GR. (1998) The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr*; **128**:11-9.

Rodrigues AC; Cara DC; Fretez SH; Cunha FQ; Vieira EC; Nicoli JR; Vieira L.Q (2000). *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol*; **89**:404–414.

Roediger WE, Moore J, Babidge W. (1997) Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*; **42**:1571.

Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordinon C, Narula S, Levings MK. (2001) “Type 1 regulatory cells”. *Immunol. Rev*; **182**: 68-79.

Roselli M, Finamore A, Nuccitelli S, Carnevali P, Brigidi P, Vitali B, Nobili F, Rami R, Garaguso I, Mengheri E. (2009) Prevention of TNBS induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of $\gamma\delta$ T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflamm. Bowel Dis* ;**15**:1526–1536.

Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. (2009) Differential regulation of Interleukin 17 and Interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut*; **58**:1629-1636.

S

Sabat R, Witte E, Witte K, Wolk K IL-22 and IL-17: An Overview. *Progress in Inflammation Research*: 11-35.

Salminen S, Bouley C, Boutron Ruault M.-C, Cummings JH, Franck A, Gibson G R., Isolauri E, Moreau M.-C , Roberfroid M, Rowland I. (1998).

Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*; **80**: S147-S17.

Sanders, ME. (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev*; **61**: 91-99.

Sarra M, Pallone F, MacDonald T T, Monteleone G. (2010). IL23/IL17 Axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis*; **16**:1808-1813.

Sartor RB.(2007) Mucosal immunology and mechanisms of gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; **292**:G315-22.

Schmitz J, et al. (2005) IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* ;**23**:479–490.

Sedhom MAK, Pichery M, Murdoch JR, Foligné B, Ortega N, Normand S, et al (2013) Neutralisation of the interleukin33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut*; **62**:1714–1723.

Segain J-P, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leraya V, Gervois N, Rosales C, Ferriera L, Bonnet C, M Blottièrea H, Galmichea J-P. (2000) Butyrate inhibits inflammatory responses through NF κ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*; **47**:397-403.

Sekirov I., Russell SL., Antunes CM., Finlay BB. (2010) Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev*; **90**: 859-904.

Shen X, Shi R, Zhang H, Li K, Zhao Y, Zhang R. (2010) The Toll-like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and

ulcerative colitis: a meta-analysis. *Digestion*; **81**: 69–77.

Siddique I et Khan I (2011). Mechanism of regulation of Na-H exchanger in inflammatory bowel disease: role of TLR-4 signaling mechanism. *Dig Dis Sci*; **56**:1656–1662.

Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Hartmann G, et al. (2001). Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN- γ and TNF- α production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; **281**:1264–73.

Silverberg M S, Cho J H, Rioux JD et al (2009). Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat. Genet*; **41**: 216.

Smits HH; Engering A, van der Kleij D; de Jong EC; Schipper K; van et al. (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T-cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immunol*; **115**:1260–1267.

Sokol H et Beaugerie L. (2009) Inflammatory bowel disease and lymphoproliferative disorders: the dust is starting to settle. *Gut*; **58(10)**:1427-

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*; **105**: 16731–6.

Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. (2009). Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*; **15**: 1183–9.

Sonnenberg G F.(2014) Regulation of intestinal health and disease by innate lymphoid cells *International Immunology*; **26**: 501–507.

Soufli I, Toumi R, Rafa H, Amri M, Labsi M, Khelifi L, Nicoletti F, Touil-Boukoffa C. (2015) Crude extract of hydatid laminated layer from Echinococcus granulosus cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice. *Journal of Inflammation*; **12**:19.

Spadoni I, Iliev ID, Rossi G, Rescigno M (2012) Dendritic cells produce TSLP that limits the differentiation of Th17 cells, fosters Treg development, and protects against colitis. *Mucosal Immunology*; **5**.

Stallmach A, Hagel S, Bruns T. Adverse effects of biologics used for treating IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; **24(2)**:167-82.

Stevens A et Lowe, J. (1997) Histologie humaine. *De Boeck Supérieur* : 416 p.

Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*; **20**:495–549.

Sudo N; Chida Y; Aiba Y; Sonoda J; Oyama N; Yu X. -N; Kubo C; Koga Y. (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol*; **558**: 263–275.

Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A. (2008). IL 22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest*; **118** :534–544.

Suzuki M, Hisamatsu T, and D. K. Podolsky (2003). Interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect. Immun*; **71**: 3503–3511.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S et al. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; **122**: 44–54.

Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP. & Lochs, H. (2005). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* ;**43** : 3380– 3389.

T

Takeda K et Akira S (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*; **16** ; 3–9.

Tanabe S, Kinuta Y, and Saito Y (2008). Bifidobacterium infantis suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. *International journal of molecular medicine*; **22**: 181-185.

Tardieu D, Jaeg JP, Cadet J, Embvani e, Corpet DE, Petit C. (1998) Dextran sulfate enhances the level of an oxidative DNA damage biomarker, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in rat colonie mucosa. *Cancer Lett*; **134**: 1-5.

Thomas, S et Baumgart, DC. (2012). Targeting leukocyte migration and

adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology*; **20**:1-18.

Taylor KM et rving PM. (2011) Optimization of conventional therapy in patients with IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*; **8** :646-656.

Touil-Boukoffa C, Bauvois B, Sanceau J, Hamrioui B, Weitzerbin J. (1998). Production of nitric oxide (NO) in human hydatidose : Relationship between nitrite production and interferon- γ levels. *Biochimie*; **80**: 739-744.

Toumi R, Abdelouhab K, Rafa H, Soufli I, Raissi-Kerboua D, Djeraba Z, et al. et al. (2013) Beneficial role of the probiotic mixture Ultrabiotique on maintaining the integrity of intestinal mucosal barrier in DSS-induced experimental colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; **35**: 403-9.

Toumi R, Soufli I, Rafa H, belkhef M, Biad A, Touil-Boukoffa C. (2014). Probiotic bacteria Lactobacillus and Bifidobacterium Attenuate Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Experimental colitis in mice. *International journal of immunopathology and pharmacology*; **27**: 523-525.

U

Uchida K , Koike Y, Hashimoto K, Saigusa S, Inoue M, Otake K, Tanaka K, Matsushita et al (2015) The Increased Expression of CCL20 and CCR6 in Rectal Mucosa Correlated to Severe Inflammation in Pediatric Ulcerative Colitis. *Gastroenterology Research and Practice*: 6 pages.

V

Valatas V, Bamias G. & Kolios, G. (2015). Experimental colitis models: Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease and translational issues. *European Journal of Pharmacology* ;1–12.

Vamadevan AS, Fukata M, Arnold ET, Thomas LS, Hsu D, Abreu MT. (2010). Regulation of Tolllike receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun*;16: 93–103.

Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, et al. (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* ;131: 117–129.

Van Deventer SJ.(1997). Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut*; 40:443-448.

Van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. (2010) Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: Diagnostic meta-analysis. *BMJ*;341:c3369.

Vandenbroucke K , de Haard H , Beirnaert E , Dreier T 4, Lauwereys M , Huyck L 1, Van Huysse J , Demette r P, Steidler L, Remaut E, Cuvelier C et Rottiers P. (2010). Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunology* ; 3: 49–56.

Varona R, Cadenas V, Flores J, Martinez-A C et al (2003) CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Immunol*; 33: 2937–2946.

Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. (1999) Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*;13(8):1103-8.

Villena J et Kitazawa H. (2014) Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Front. Immunol*; 4:512.

W

Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. (2004). NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* ;5:800–808.

Weaver CT, **Hatton RD**. (2009). Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co)evolutionary perspective. *Immunology*;9: 883.

Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. (2005)Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci*;102: 18129-18134.

Weil B et **Batteux F**.(2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. *De boeck Université* :312p.

Weinstock J V. et Elliott DE. (2009). Helminths and the IBD hygiene

hypothesis. *Inflammatory Bowel Diseases*; **15**(1):128–133.

Wells JM., Rossia O., Meijerinka M b, van Baarlana P. (2011) Epithelial crosstalk at the microbiota–mucosal interface. *PNAS*; **108** : 4607-4614.

Wilks S. (1859). The morbid appearance of the intestine of Miss Banks. *Medical Times and Gazette*; **2**:264-9.

Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, et al. (2009). Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*; **15**:653-660.

Wirtz S et **Neurath** MF. (2007) Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*; **59**: 1073-1083.

Wisnewsky JA, Doré J, Clement K (2012). The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*; **9**:590-598.

Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R (2007) IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* ; **178**:5973–5981.

X

Xavier X, J et **Podolsky** DK. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*; **448**: 427-434.

Xie J, Itzkowitz SH. (2008). Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*; **14**: 378-3897.

Yamamoto M, Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Ito, H. (2000) IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol*; **164**(9):4878-82.

Y

Yang L et **Seki** E (2012) Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Front. Physio*. **3**:138.

Yu S et **Gao** N (2015). Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll-like receptors for immune surveillance. *Cell. Mol. Life Sci*; **72**(17):3343-53.

Z

Zenewicz L A, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S Flavell R A. (2008). Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* ; **29**:947.

Zeuthen H L, Fink N, Lisbeth , Frokiaer H. (2007) Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor- β . *Ltd, Immunology*; **123**:197-20.

Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, et al. (1999) Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- κ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells

and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*; **274**: 7611–14. 48.

Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. (2005). Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *The Journal of nutrition*; **135**:1752-1756.

Zheng L, Riehl TE, Stenson WF. (2009) Regulation of colonic epithelial repair in

mice by Toll-like receptors and hyaluronic acid. *Gastroenterology*; **137**:2041–2051.

Zhu J, Wang Y, Yang F, Sang L, Zhai J, Li S, Li Y, Wang D, Lu C, Sun X (2015). IL 33 alleviates DSS induced chronic colitis in C57BL/6 mice colon lamina propria by suppressing Th17 cell response as well as Th1 cell response. *International Immunopharmacology* ;**29** : 846–853