HAL
open science

Impact du microbiote sur la maturation du système immunitaire de l'hôte : analyse des fortes propriétés immunostimulantes de la bactérie segmentée filamenteuse en souris gnotobiotiques

Emelyne Lécuyer

To cite this version:

Emelyne Lécuyer. Impact du microbiote sur la maturation du système immunitaire de l'hôte : analyse des fortes propriétés immunostimulantes de la bactérie segmentée filamenteuse en souris gnotobiotiques. Hépatologie et Gastroentérologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66560 . tel-00833008

HAL Id: tel-00833008

https://theses.hal.science/tel-00833008v1

Submitted on 11 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physiologie Physiopathologie

Ecole doctorale 394

Présentée par

Emelyne Lécuyer

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Impact du microbiote sur la maturation du système immunitaire de l'hôte : analyse des fortes propriétés immunostimulantes de la bactérie segmentée filamenteuse en souris gnotobiotiques

Soutenue le 14 décembre 2012

devant le jury composé de :

Mme. Nadine Cerf-Bensussan (Directrice de recherche INSERM, Paris) Directrice de thèse

Mme. Valérie Gaboriau-Routhiau (Chargée de Recherche INRA, Paris) Co-directrice de thèse

Mme. Armelle Phalipon (Chef de Laboratoire Institut Pasteur, Paris) Rapporteur

Mme. Claude-Agnès Reynaud (Directrice de recherche INSERM, Paris) Rapporteur

Mr. Hervé Blottière (Directeur de recherche INRA, Jouy-en-Josas) Examinateur

Mr. Gérard Eberl (Chef de Laboratoire Institut Pasteur, Paris) Examinateur

Mr. Julien Fellah (Professeur UPMC, Paris) Président

« Qui cherche l'infini n'a qu'à fermer les yeux. »

Milan Kundera

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directrices de thèse Nadine Cerf-Bensussan et Valérie Gaboriau-Routhiau. Nadine, je vous remercie pour votre implication dans la conduite de mon projet de thèse durant ces quatre années. Valérie, je te remercie pour ta disponibilité et ton investissement. Les difficultés rencontrées ont été nombreuses, mais vous avez toujours su réadapter scientifiquement et techniquement ce travail pour le mener au plus loin. Grâce à vous j'ai également pu bénéficier du réseau de formation Marie Curie « Cross-Talk ». Je souhaite notamment adresser mes remerciements aux organisateurs du réseau, Emmanuelle Maguin et Hervé Blottière.

Je remercie Mesdames Armelle Phalipon et Claude-Agnès Reynaud, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je souhaite également remercier Messieurs Hervé Blottière, Gérard Eberl et Julien Fellah pour leur participation en qualité d'examinateurs. Je remercie en outre Monsieur Fellah d'avoir accepté de présider le jury de thèse.

Je remercie Catherine Juste pour son aide scientifique et technique qui nous a permis d'obtenir le précieux lysat, mais aussi pour tous nos échanges depuis ces cinq dernières années. J'adresse une pensée amicale aux personnes rencontrées dans mes précédents laboratoires notamment Fabienne, Pascale, Nelly de l'INRA et plus particulièrement à Véronique, premier stage en laboratoire de recherche à Saint-Antoine qui m'a engagée dans l'aventure du doctorat.

Un grand Merci aux « co-workers » de la « microbiota-team ». Sabine, merci pour ton soutien, tes conseils. Tu m'as accompagnée tout au long de ce parcours difficile et j'ai beaucoup appris à tes côtés aussi bien sur le plan professionnel que personnel, merci pour ta générosité, ton dynamisme et ton investissement. Hélène, admirable pédiatre, aux multi-casquettes, merci pour ton enthousiasme, ta générosité, ta sérénité. Merci à toutes les deux pour m'avoir supportée à tous niveaux pendant ces années passées à travailler ensemble ! Une pensée pour Marion qui me suit et pour Delphine qui nous rejoint bientôt.

Un autre grand Merci à tous les membres de l'unité 989, encore présents ou qui sont passés par là ! Bernadette, co-équipière sportive, voisine « in-lab » et « out-lab », toujours partante et à l'écoute ! Corinne, merci pour ta spiritualité et ta générosité ! Mirette, je te remercie pour ta gentillesse à mon égard et ta bonne humeur. Céline et Elsa, vous qui êtes passées et qui repassez par-là, toujours ravies pour se revoir et partager de bons moments de convivialité. Juliette, co-équipière en management de thèse, nous avons commencé cette aventure ensemble et nous la finalisons aussi ensemble, merci pour ta bonne humeur, ton écoute et ton

soutien! Aux membres de la « thesis-ending team », Julie, Julien et Raja, vous, mes aînés, qui avez été présents à mon arrivée dans ce laboratoire, et mes coachs pour ma fin de thèse, après votre départ. Merci pour votre soutien et tous vos conseils. Je remercie tout particulièrement Julien pour son investissement et ses encouragements, ô combien précieux dans les grands moments de doute pendant la rédaction du manuscrit. A Natalia, admirable pour ta force de caractère ! A « tic et tac » ou « coca et cola », les petits du labo, petit-Nicolas et petit-Julien, merci pour votre bonne humeur, votre enthousiasme et votre gentillesse ! Bertrand et Nicolas merci à vous pour vos conseils et votre soutien. Fabienne, merci pour ton amitié.

Enfin merci à la « french-team » du Cross-Talk, Elise, Bertrand et Tomas pour les bons moments partagés à voyager au sein de ce fabuleux réseau européen d'étudiants.

De façon plus personnelle, je souhaite adresser ces quelques mots :

A mes parents, vous qui m'avez portée jusque-là et à qui je dédie ce travail… Papa, tu m'as appris à toujours vouloir aller plus haut, à prendre les étapes une à une sans prétention tout en gardant en point de mire l'étape suivante. Maman, tu m'as appris le courage et tu m'as donné la force d'entreprendre ce long parcours, seul et immense regret, que tu ne puisses pas être là.

A ma grande sœur, toi qui as toujours été curieuse de comprendre mon travail de recherche, qui es à mes côtés depuis que j'ai mis les pieds sur terre, tu as été un soutien précieux tout au long de ces années, et tu ne mesures pas à quel point. A mon petit frère qui va être fier de sa grande-sœur !

A Stéphane, merci pour ta présence et ton soutien depuis si longtemps. Merci pour ce que tu es, ce que l'on a été et ce que l'on sera.

A toute ma famille et plus particulièrement à ma tante qui me manque et à ma grand-mère, que j'adore et que j'admire.

A Christine, amie et colloque qui a partagé mon quotidien tout au long de ces trois dernières années. Merci pour ta présence, ton écoute et ton soutien. Une page importante de notre amitié s'est écrit rue François Bonvin…

A Alix, Marc, Melina, Ouafâa, Pauline et Victor, toujours présents dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles. Merci d'être toujours à mes côtés quels que soient les kilomètres terrestres ou océaniques qui nous séparent.

A Johann parce que tu es fantastique !

Chez les mammifères, le développement du système immunitaire intestinal est initié *in utero* par un programme déterminé génétiquement. Cependant, le développement complet de ce système immunitaire et sa maturation finale n'ont lieu qu'après la naissance, sous l'influence des très nombreuses bactéries qui colonisent alors l'intestin et qui composent le microbiote intestinal.

L'utilisation de modèles *in vivo* originaux de souris axéniques, sans germe, et gnotoxéniques, colonisées avec des bactéries individuelles ou des groupes de bactéries plus ou moins complexes, nous a permis d'identifier le rôle particulier de la bactérie segmentée filamenteuse (ou SFB) dans la maturation des réponses immunes intestinales adaptatives, IgA et lymphocytaires T. Sa capacité singulière à adhérer à l'épithélium des plaques de Peyer suggère un rôle important de ces formations lymphoïdes dans l'initiation des réponses immunes induites par la SFB. Nos résultats renforcent l'idée du rôle majeur des plaques de Peyer dans l'initiation des réponses IgA intestinales par le microbiote. De façon inattendue, en l'absence de ces structures, la SFB induit dans le chorion des souris, la néogenèse de structures lymphoïdes tertiaires capables d'initier des réponses IgA associées à une forte réponse IL-17 spécifique de la SFB. Ces résultats suggèrent que les puissantes propriétés immunostimulantes de la SFB sont soutenues par de multiples voies d'induction des réponses immunes qui pourraient être liées à son adhésion à la muqueuse intestinale.

Mots clés : SFB, Intestin, IgA, IL-17, Plaques de Peyer, Structures lymphoïdes, Microbiote

Abstract

In mammals, the development of the intestinal immune system is initiated before birth by a genetic programme. Notably, its full development and maturation only occur after birth on the influence of the huge number of bacteria which colonize the intestine at this period of time and compose the intestinal microbiota.

By using original *in vivo* models of germ-free mice and gnotobiotic mice colonized by individual bacteria or more complex microbiota, we have shown the central role of the segmented filamentous bacterium (SFB) in inducing the coordinated maturation of intestinal adaptive immune responses. One distinctive characteristic of SFB is a host-specific adherence to the ileal mucosa and notably to the epithelium covering the Peyer's patches. Dissecting the immunostimulatory properties of SFB, we have shown that Peyer's patches are the major initiation sites of IgA responses to the microbiota. Strikingly, SFB displayed the original feature to stimulate the formation of tertiary lymphoid tissue, which provide additional sites for initiation of IgA responses but also sustain SFB-specific IL-17 response. Altogether, these data suggest that adaptive immune responses induced by SFB depend on multiple and redundant pathways, which may account for the immunostimulatory properties of SFB.

Keywords : SFB, Intestine, IgA, IL-17, Peyer's patches, Lymphoid structures, Microbiota

INTRODUCTION 14

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 17

PARTIE I 18

LE MICROBIOTE INTESTINAL 18

A. Acquisition, diversité et stabilité du microbiote intestinal 21

1. Acquisition des communautés bactériennes intestinales 22

2. Diversité du microbiote intestinal 24

3. Facteurs influençant la composition et la stabilité du microbiote intestinal 26

a) La génétique de l'hôte 26

b) L'environnement de l'hôte 28

B. Influence du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte 32

1. Nutrition et métabolisme de l'hôte 32

2. Effet trophique et maturation de l'épithélium intestinal 34

3. Effet Barrière 35

4. Impact physiologique systémique : axe intestin-cerveau 37

C. Systèmes de communication au sein du super-organisme 38

1. Dialogue bactéries-bactéries 38

a) Transfert horizontal de gènes 39

b) Quorum sensing 40

2. Dialogue hôte-bactéries 42

a) Récepteurs et voies de signalisation impliqués 42

b) Discrimination symbiontes *versus* pathobiontes par les PRRs 44

PARTIE II 48

MICROBIOTE ET MATURATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LE COMPARTIMENT INTESTINAL 48

A. Initiation des réponses immunitaires dans le compartiment inducteur 51

1. Formation du compartiment inducteur 51

a) Structures lymphoïdes secondaires 51

b) Structures lymphoïdes tertiaires 53

2. Initiation des réponses immunitaires 57

a) Transport et présentation des antigènes bactériens 57

i- Voies d'entrée des antigènes 57

ii- Transport des antigènes dans les structures lymphoïdes 59

b) Réaction des centres germinatifs des structures lymphoïdes 59

i- Interaction des lymphocytes T activés avec les lymphocytes B naïfs 59

ii- Différenciation des lymphocytes B activés par l'antigène 60

iii- Rôle particulier des plaques de Peyer dans l'initiation des réponses IgA intestinales 64

iv- Importance de la réaction des centres germinatifs dans l'initiation des réponses IgA intestinales 65

v- Mécanismes T-dépendants versus T-indépendants 66

c) Migration vers le compartiment effecteur 70

B. Etablissement des réponses immunitaires dans le compartiment effecteur 71

1. Renforcement de la barrière épithéliale intestinale 71

a) La cellule épithéliale intestinale 71

b) Les lymphocytes intra-épithéliaux 74

2. Etablissement des réponses immunitaires dans le chorion 76

a) Réponses humorales médiées par les IgA 76

i- Principales caractéristiques 76

ii- Spécificité des réponses IgA intestinales induites par la colonisation microbienne 78

b) Réponses cellulaires à lymphocytes T $CD4^+$ 83

PARTIE III 90

LA SFB : 90

ROLE PARTICULIER DE LA BACTERIE SEGMENTEE FILAMENTEUSE DANS LA MATURATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE 90

A. Caractérisation de la SFB : de l'observation microscopique au séquençage 91

1. Une morphologie segmentée filamenteuse 91

2. Caractéristiques génétiques 93

3. Ecologie de la SFB 97

a) Distribution spatio-temporelle 97

b) Influence de facteurs exogènes sur la densité de colonisation par la SFB 97

4. Biologie prédictive de la SFB 98

a) Métabolisme 98

b) Cycle de vie 100

B. Effets immunomodulateurs de la SFB 102

1. Effet Barrière 102

2. La SFB induit une réponse intestinale inflammatoire physiologique 104

a) La SFB stimule l'établissement des réponses immunes dans l'épithélium 105

b) La SFB stimule la mise en place des réponses immunes dans le chorion 105

i) Activation des centres germinatifs 105

ii) Induction d'une réponse IgA locale et périphérique 105

iii) Stimulation d'une réponse T $CD4^+$ à large spectre 110

C. Symbionte ou pathobionte : la pathogénicité de la SFB en question 112

1. Singularité du dialogue hôte-SFB : l'adhésion à la cellule épithéliale 112

2. Instabilité du dialogue chez l'hôte immunodéficient 114

PRESENTATION DU TRAVAIL EXPERIMENTAL 117

1- Rôle majeur de la SFB dans la maturation des réponses immunes intestinales adaptatives T 119

2- Caractérisation des réponses immunes adaptatives intestinales en modèles murins gnotoxéniques: mise en évidence de différents sites d'initiation et mécanismes d'induction des réponses induites par la SFB 120

RESULTATS 122

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 123

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 127

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 140

ANNEXE 158

Figure 1 - Proportions relatives des six phyla bactériens dominants de différents sites anatomiques chez l'homme.....19

Figure 2 - Schéma d'acquisition des populations bactériennes intestinales chez l'enfant 22

Figure 3 - Composition et concentration des espèces bactériennes luminales dominantes du microbiote intestinal le long du tractus digestif.....24

Figure 4 - Facteurs influençant l'établissement et la stabilité du microbiote intestinal.....31

Figure 5 - Diversité du microbiote et résistance à l'infection orale par *Salmonella*.....36

Figure 6 - Contributions du microbiote intestinal à l'homéostasie de l'hôte.....37

Figure 7 - Principaux motifs microbiens reconnus par les PRRs chez les mammifères (TLR et NLR) et induction des voies de signalisation NFκB et MAP-kinases.....43

Figure 8 - Régulations négatives de la voie NFκB dans la cellule épithéliale intestinale impliquant le microbiote.....45

Figure 9 - Différences structurales entre les enveloppes des bactéries à coloration de Gram positif ou négatif.....45

Figure 10 - Structure anatomique de l'intestin grêle (gauche) et schéma de différenciation des cellules épithéliales intestinales (droite).....49

Figure 11 - Représentation schématique du système immunitaire intestinal.....50

Figure 12 - Interactions cellulaires et moléculaires au cours du développement des tissus lymphoïdes.....52

Figure 13 - Coupes histologiques des plaques de Peyer de souris axéniques et de souris SPF 53

Figure 14 - Différences structurales entre cryptoplaques, FLI immatures et FLI matures.....54

Figure 15 - Formation des structures lymphoïdes tertiaires en conditions inflammatoires.....56

Figure 16 - Principales voies d'entrée des antigènes luminaux.....58

Figure 17 - Voies de signalisation activées par l'interaction des lymphocytes B et T initiant la commutation de classe vers l'isotype A dans les centres germinatifs. 62

Figure 18 - Schéma de différenciation des lymphocytes B dans les centres germinatifs des structures lymphoïdes 62

Figure 19 - Représentation schématique des mécanismes T-dépendants et T-indépendants initiant les réponses IgA intestinales dans les différents compartiments Plaques de Peyer, FLI, chorion 69

Figure 20 - Structure de la couche de mucus le long de l'intestin et sécrétion des peptides antimicrobiens par les entérocytes et les cellules de Paneth 71

Figure 21 - Régulation de l'expression des peptides antimicrobiens par le microbiote 73

Figure 22 - Conditionnement des cellules immunitaires présentes dans la muqueuse intestinale par les cellules épithéliales intestinales 73

Figure 23 - Transcytose des IgA et des IgM à travers la cellule épithéliale intestinale 77

Figure 24 - Coupes histologiques du chorion intestinal de souris axénique et de souris SPF . 78

Figure 25 - Détermination de la production de SIgA spécifiques par radioimmunoassay (RIA). 80

Figure 26 - Différentes réponses IgA intestinales en fonction du type d'antigène 82

Figure 27 - Diversification des populations effectrices de lymphocytes T $CD4^+$ 83

Figure 28 - Coupes histologiques du chorion intestinal de souris axénique et de souris SPF . 84

Figure 29 - Parallélisme des lignées Th et des lignées d'ILCs 86

Figure 30 - Lithographie de J. Leidy représentant les parasites observés dans le contenu intestinal de termites 92

Figure 31 - Différents morphotypes de la SFB observés par microscopie électronique 92

Figure 32 - Arbre phylogénétique rattachant la SFB au groupe *Clostridium*. 94

Figure 33 - Image d'observation réalisée par microscopie optique de la SFB sur une biopsie iléale humaine 96

Figure 34 - Classification prédictive des séquences isolées des SFB de rongeurs dans les bases de données COG 99

Figure 35 - Cycle de vie prédictif de la SFB dans l'intestin de son hôte 101

Figure 36 - Images de microscopie électronique d'iléon de souris illustrant l'adhésion de la SFB à l'épithélium intestinal et notamment à celui des plaques de Peyer 103

Figure 37 - Mécanismes potentiels d'induction des réponses intestinales T $CD4^+$ par la SFB impliquant les CD 111

Figure 38 - Interaction entre la SFB et la cellule épithéliale intestinale de souris SPF 113

Tableau 1 - Modifications du microbiote intestinal associées à des pathologies 20

Tableau 2 - Techniques utilisées pour caractériser le microbiote intestinal 25

Tableau 3 - Polymorphismes génétiques de l'hôte affectant la composition du microbiote ...28

Tableau 4 - Principales caractéristiques des populations de LIE du compartiment épithélial intestinal chez la souris 75

Tableau 5 - Impact de la colonisation microbienne sur le développement structural et fonctionnel de l'immunité innée.....88

Tableau 6 - Impact de la colonisation microbienne sur le développement structural et fonctionnel de l'immunité adaptative 89

Tableau 7 - Tableau récapitulatif de l'observation par microscopie de bactéries de morphologie ressemblante à la SFB chez différents hôtes et année d'observation 93

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ABC	ATP Binding Cassette
ADNc	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
AGCC	Acide Gras à Chaîne Courte
AHL	N-Acyl Homosérine Lactone
AI	Autoinducteur
AICDA	Activation-Induced Cytidine Deaminase
AID	Cytidine Désaminase
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
ASF	Altered Schaedler Flora
ATP	Adénosine Triphosphate
ARN	Acide Ribonucléique
BAFF	B-cell Activating Factor
BCR	B-Cell Receptor
CCL	Chemokine Chemokine Ligand
CCR	Chemokine Chemokine Receptor
CD	Cellule Dendritique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSF	Competence and Sporulation Factor
CSR	Class-Switch Recombination
Cv	(souris) Conventionnelle
Cvd	(souris) Conventionnalisée
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DSS	Dextran Sodium Sulfate
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT assay
FDC	Follicular Dendritic Cell
FLI	Follicule Lymphoïde Isolé
Foxp3	Forkhead box P3
GF	Germ-Free
HEV	High Endothelial Venule
HMP	Human Microbiome Project

HSP	Heat Shock Protein
HTAP	Hypertention Artérielle et Pulmonaire
iBALT	inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN-	Interferon-
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine-
ILC	Innate Lymphoïd Cell
iNOS	inducible Nitric Oxid Synthase
iTL	(cellule) inductrice de Tissu Lymphoïde
LB	Lymphocyte B
LIE	Lymphocyte Intra-Epithélial
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MADCAM	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MetaHIT	Metagenomics of the Human Intestinal Tract
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MMP	Métalloprotéinase
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural Killer
NLR	NOD-Like Receptor
NPY	Neuropeptide Tyrosine
OCTN2	Organic Cation Transporter isotype 2
oTL	(cellule) organisatrice de Tissu Lymphoïde
OVA	Ovalbumine
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
pIg	polymeric Immunoglobulin
pIgR	polymeric Immunoglobulin Receptor
PP	Peyer's Patch
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PRR	Pattern Recognition Receptor
RA	Retinoic Acid
RAG	Recombinase-Activating Gene

REG	Regenerating islet-derived protein
RORγt	Retinoic acid-related Orphan Receptor gamma t
ROS	Reactive Oxygen Species
SAA	Serum Amyloid A
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SFB	Segmented Filamentous Bacteria
SHM	Somatic Hypermutation
SPF	Specific Pathogen Free
TACI	Transmembrane Activator and Calcium Modulator and cyclophilin Ligand (CAML) Interactor
TCR	T-Cell Receptor
T_{FH}	T Follicular Helper
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
Th	T helper
TLR	Toll-Like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon-β
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

La diversité des communautés microbiennes qui nous habitent est aussi vaste que celle qui existe sur terre. Ainsi coexistent en notre sein archées, bactéries, champignons, protozoaires, et virus. Dominantes par leur nombre, les bactéries ont été à ce jour les plus étudiées et font plus particulièrement l'objet de notre attention dans ce travail. La première partie bibliographique ne traitera que des données concernant les populations bactériennes qui colonisent l'intestin, principalement chez les mammifères.

INTRODUCTION

Les bactéries, organismes unicellulaires, sont les premiers êtres vivants apparus sur terre il y a environ 3,8 milliards d'années. Elles se sont rapidement adaptées et ont colonisé tous les environnements existants, l'eau, la terre puis les organismes vivants multicellulaires qui s'y sont développés environ 2,1 milliards d'années après.

Depuis le milieu du XIXe siècle, l'étude des interactions hôtes-microbes a permis de caractériser de nombreux pathogènes. Casimir Joseph Davaine (1812-1882) fut le premier à montrer qu'une maladie animale et humaine était causée par un microbe, en isolant l'agent responsable de l'anthrax, *Bacillus anthracis*. La microbiologie médicale est alors née, considérant principalement les microbes comme vecteurs de maladies.

L'aspect positif des interactions hôte-microbes, énoncé pour la première fois par Ilya Ilitch Metchnikoff en 1907, a fait l'objet d'une plus grande attention au cours du XXe siècle. Grâce au développement de nouvelles techniques de cultures bactériennes anaérobies puis de biologie moléculaire, l'étude du vivant intègre peu à peu celle de l'écologie microbienne des différentes populations qui habitent l'hôte. Cet hôte est alors considéré comme un « Super-organisme » à l'intérieur duquel cohabitent deux entités, eucaryote et procaryote, qui ne forment plus qu'un.

Organisées en réseaux trophiques pacifiques voire même bénéfiques pour l'hôte qui les héberge, ces populations bactériennes sont progressivement caractérisées. Associés de manière permanente, ces microbes développent avec leur hôte des interactions symbiotiques mutualistes, dont les deux partenaires bénéficient. Ces symbioses, retrouvées dans les règnes animaux et végétaux, sont le résultat d'une longue coévolution avec l'hôte.

On identifie chez l'homme de nombreux sites colonisés de façon continue par des microbes. La nature et la densité des microbes, ou symbiontes, qui peuplent chacun de ces sites sont variables, et l'on regroupe sous le terme de microbiote l'ensemble des populations qui colonisent un site. La plus dense des populations bactériennes qui nous habitent se trouve au niveau intestinal.

Mieux comprendre le dialogue qui s'établit entre l'hôte et son microbiote, soulève de nombreux enjeux en santé humaine, notamment reflétés ces vingt dernières années par les nombreuses publications associant certaines maladies à des modifications du microbiote intestinal.

Pour faire face à la puissante charge antigénique établie ou qui transite dans l'intestin, s'est développé chez l'hôte un système immunitaire particulièrement dense dans cette région. En conditions physiologiques, la maturation de ce système immunitaire, qui associe chez les mammifères une réponse innée et une réponse adaptative, est induite par la présence microbienne intestinale en période post-natale. Ce système immunitaire doit maintenir l'homéostasie de l'hôte en le protégeant de l'invasion par d'éventuels organismes pathogènes tout en tolérant les symbiontes qui l'habitent. Les mécanismes par lesquels le microbiote participe à la mise en place et au maintien de l'efficacité de cette barrière protectrice sont mal connus de même que s'il existe certaines espèces particulièrement actives dans ces processus.

Récemment, nous avons mis en évidence que la colonisation de souris axéniques, ou sans germe, par un microbiote conventionnel murin induit, dans l'intestin de ces souris, un large spectre de réponses immunes innées mais également de réponses adaptatives conduisant à une inflammation physiologique intestinale nécessaire à l'homéostasie. Bien que peu de bactéries semblent capables de reproduire une telle stimulation du système immunitaire, nous avons montré le rôle privilégié de la bactérie segmentée filamenteuse, ou SFB.

L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser plus avant les réponses intestinales adaptatives T $CD4^+$ et humorales induites par la SFB, d'établir le site d'initiation de ces réponses et les mécanismes moléculaires associés. La réalisation de ce travail repose sur l'utilisation de modèles animaux originaux, où des souris axéniques ont été monocolonisées avec la SFB.

Afin d'introduire les résultats obtenus je décrirai, sous forme d'une revue bibliographique, les grandes caractéristiques du microbiote intestinal, son impact sur la maturation du système immunitaire intestinal, et présenterai la SFB et ses fortes propriétés immunostimulantes.

Les résultats expérimentaux sont présentés sous forme de deux articles. Le premier article est publié, le second article est en cours de finalisation. Ces données sont suivies d'une discussion présentant les conclusions et perspectives de l'ensemble du travail.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I

LE MICROBIOTE INTESTINAL

Le corps humain héberge de vastes communautés microbiennes à majorité bactérienne dont la composition en grands groupes bactériens, ou phyla, varie d'un site à l'autre (Figure 1). Ces différentes populations bactériennes, ou microbiotes, dépassent très largement en nombre les cellules eucaryotes. En effet, les cellules procaryotes représentent 90% de toutes les cellules qui nous constituent. Le site le plus densément peuplé est l'intestin avec plus de 10^{14} bactéries par gramme de contenu luminal dans le côlon.

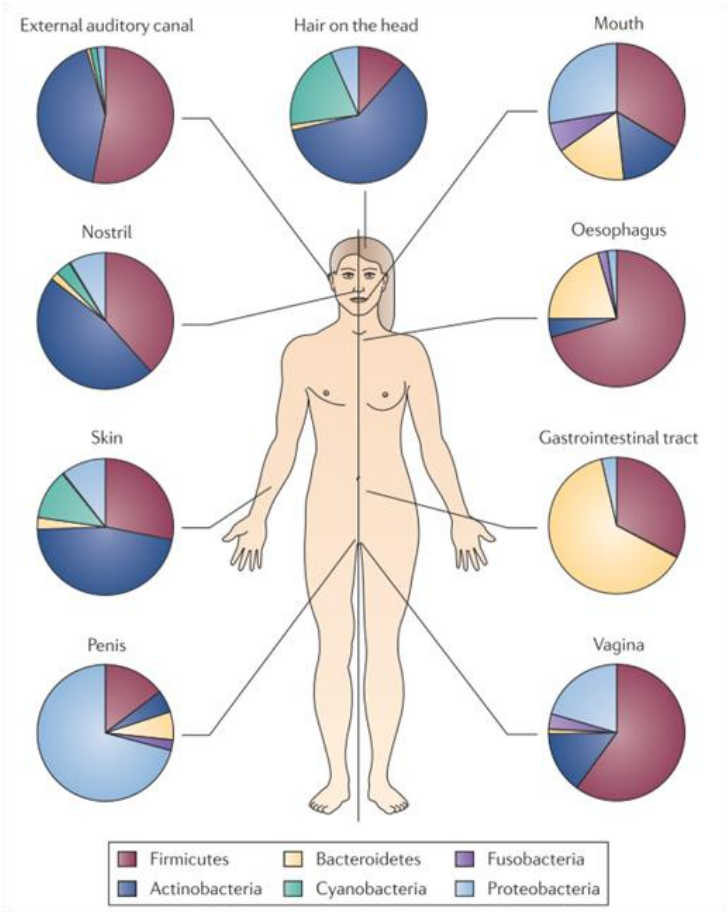


Figure 1 - Proportions relatives des six phyla bactériens dominants de différents sites anatomiques chez l'homme (Spor *et al.*, 2011)

Principale interface entre notre milieu intérieur et l'environnement, l'intestin exerce deux fonctions majeures, l'absorption et la digestion des nutriments, et le maintien d'une barrière protectrice contre le milieu extérieur. Chez les mammifères, il remplit ces deux principales activités dans un contexte particulier puisqu'il est en permanence colonisé par une communauté riche et complexe de micro-organismes, la plus dense sur terre, le microbiote intestinal.

Un nombre croissant de données montrent que, au cours de leur longue coévolution, les bactéries du microbiote intestinal et leurs hôtes ont établi des interactions mutualistes, reposant principalement sur les avantages métaboliques conférés par l'association (Tremaroli and Backhed, 2012). Néanmoins, cette masse considérable de bactéries constitue une menace potentielle pour leurs hôtes. En effet, certaines pathologies intestinales, mais aussi systémiques, ont été associées à des perturbations de la diversité du microbiote intestinal (Tableau 1).

Implicated Microbiota[a]	Changes in Microbiota Presence/Function	References[b]
Allergies		
Lactobacillus spp. ↓	early colonization with *Lactobacillus* associated w/decreased allergies	Round et al., 2011
Bifidobacterium adolescentis ↓	early colonization with more diverse microbiota might prevent allergies	Round and Mazmanian, 2009
Clostridium difficile ↓		
Helicobacter pylori ↓	*H. pylori* tolerance mediated by Tregs that suppress asthma	Arnold et al., 2011
Celiac's disease		
Bacteroides vulgatus ↑	higher diversity (Shannon-Wiener index) in Celiac's disease patients versus controls	Elinav et al., 2011
Escherichia coli ↓		
Clostridium coccoides ↓		
Gastric Cancer		
H. pylori ↑	important element in carcinogenic pathway for developing gastric adenocarcinomas	Lathrop et al., 2011
Austim		
Bacteroidetes ↑	increased bacterial diversity in feces of autistic children compared to controls	Robinson et al., 2010
Proteobacteria ↑		
Actinobacteria ↓		
Firmicutes ↓		
Obesity		
Bacteroidetes ↓	significant changes in gut microbiota are associated with increasing obesity	Ley et al., 2005; Pflughoeft and Versalovic, 2011
Lactobacillus ↑		
Firmicutes/Bacteroidetes ratio ↓		Ley et al., 2005
Methanobrevibacter smithii ↓		Turnbaugh et al., 2009b
Anorexia		
Methanobrevibacter smithii ↑	Bacteroidetes, Firmicutes, and Lactobacillus similar to lean patients, though *M. smithii* significantly increased	Armougom et al., 2009; Pflughoeft and Versalovic, 2011
IBD—Crohn's Disease		
Bacteroides ovatus ↑	less diversity in patients with Crohn's disease compared to healthy patients	Dicksved et al., 2008
Bacteroides vulgatus ↑		
Bacteroides uniformis ↓		
IBD (General)		
Bacteroidetes ↓	IBD associated with overall community dysbiosis rather than single causal bacterial species	Spor et al., 2011; Perry et al., 2006
Lachnospiraceae ↓		
Actinobacteria ↑		
Proteobacteria ↑		
Clostridium leptum ↓		
Clostridium coccoides ↓		
Faecalibacterium prasnitzii ↓		
Firmicutes/Bacteroidetes ratio ↓		
Bifidobacteria ↓		
Type 2 Diabetes		
Firmicutes ↓	shifts in gut microbiota associated with increases in plasma glucose concentrations	Brown, 2000
Clostridia ↓		
Bacteroides-Prevotella ↑ versus *Clostridia coccoides-Eubacterium rectale* ↓		
Betaproteobacteria ↑		
Bacteroidetes/Firmicutes ratio ↑		

[a]Changes relative to healthy subjects. Increase: ↑. Decrease: ↓.
[b]References are exemplary rather than exhaustive and focus on studies that compare healthy versus diseased individuals.

Tableau 1 - Modifications du microbiote intestinal associées à des pathologies (Clemente *et al.*, 2012)

Si aucun élément scientifique ne permet à ce jour de d'établir que l'altération de l'écologie microbienne, ou dysbiose, précède la mise en place de l'une de ces pathologies, il a récemment été mis en évidence dans un modèle murin, qu'en situation d'inflammation intestinale, certaines espèces bactériennes prolifèrent et participent à la progression de la pathologie inflammatoire en cancer (Arthur *et al.*, 2012). Dans d'autres cas, la restauration de l'équilibre microbien peut contribuer au retour à l'homéostasie intestinale. Des expériences de transplantation de microbiote fécal chez l'homme, dont la première a été réalisée avec succès en 1988 chez un patient souffrant d'une recto-colite hémorragique, sont actuellement menées à plus grande échelle pour traiter les colites récurrentes à *Clostridium difficile* (Bennet and Brinkman, 1989) (Grehan *et al.*, 2010). Ces données suggèrent qu'il existe une forte relation entre le microbiote et l'état physiopathologique de l'hôte.

Mieux comprendre la physiologie des interactions qui s'établissent entre les deux partenaires est un nouvel enjeu en santé humaine devenu majeur ces dernières années notamment pour les perspectives diagnostiques et thérapeutiques offertes.

Pour pouvoir influer sur les mécanismes de ce dialogue, la première étape consiste à connaître la structure, la dynamique, les fonctions et les systèmes de communication qui s'établissent au sein et avec les communautés bactériennes qui nous habitent.

A. Acquisition, diversité et stabilité du microbiote intestinal

La majorité des études de structure du microbiote intestinal humain, y compris les banques de données métagénomiques les plus récentes (MetaHIT, HMP), analysent l'ensemble des génomes du microbiote (ou métagénome) à partir d'échantillons fécaux d'adultes. Idéalement, la caractérisation des espèces microbiennes devrait inclure celles qui résident dans les différents segments de l'intestin comprenant à la fois les populations luminales et adhérentes à la muqueuse. Des études comparatives ont en outre montré qu'il existe une forte hétérogénéité entre le microbiote fécal et le microbiote colique adhérent (Zoetendal *et al.*, 2002) (Eckburg *et al.*, 2005). Cependant, la difficulté d'accès aux biopsies, notamment chez l'enfant en bonne santé, et l'altération de l'intégrité du biofilm bactérien lors du prélèvement de l'échantillon de muqueuse impliquent qu'actuellement, peu de données rendent compte des bactéries intestinales adhérentes. De même, une récente étude comparant l'impact qualitatif et quantitatif des différences de méthodologies, relatives à l'échantillonnage, aux

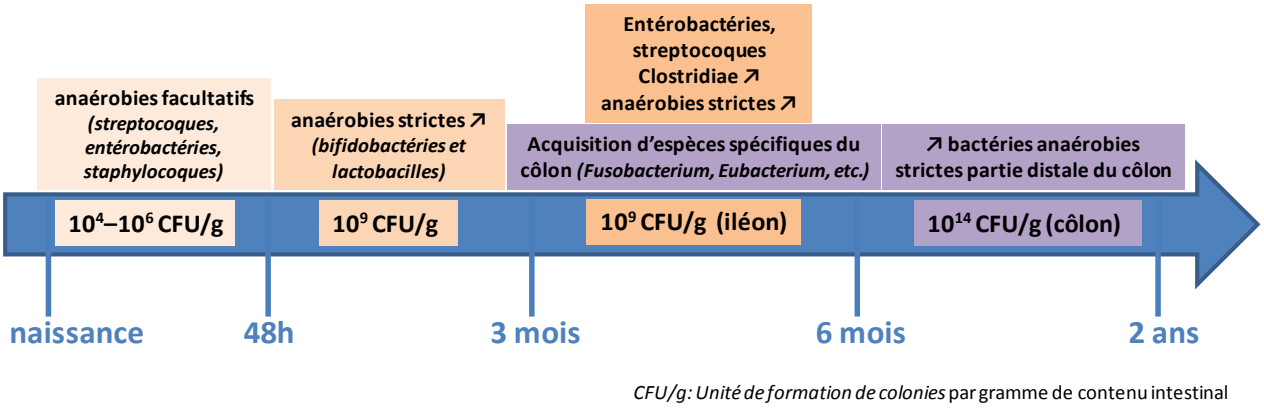
techniques d'extraction et de séquençage sur la détermination de la composition bactérienne du microbiote intestinal, souligne la nécessité d'établir un consensus dans les pratiques et les techniques utilisées (Momozawa *et al.*, 2011).

1. Acquisition des communautés bactériennes intestinales

La notion de stérilité de l'intestin *in utero* est principalement née du fait de l'absence de bactérie détectée dans le liquide amniotique, environnement extérieur du fœtus, en condition physiologique, par les techniques de culture bactérienne et de coloration de Gram. Depuis le développement de nouvelles méthodes de quantification bactérienne à plus forte résolution, cette notion est controversée. En effet, la détection de bactéries pionnières, premières espèces à coloniser l'intestin, dans le sang de cordon ombilical, et de bactéries lactiques, dans le méconium d'enfants sains, nés par césarienne, suggère qu'à terme, l'intestin du fœtus serait déjà colonisé, potentiellement par passage transplacentaire des bactéries intestinales maternelles (Jimenez *et al.*, 2005). Cependant, le peu d'études cliniques menées et la faible quantité de bactéries détectée, ne permettent pas de conclure quant à cette présence microbienne *in utero* et à son impact physiologique.

La naissance constitue donc un véritable point de rupture. D'un environnement stérile ou à très faible densité microbienne, le fœtus se retrouve subitement exposé à un milieu riche en microbes avec comme premier contact, les voies génitales de la mère, lorsque l'accouchement a lieu par voie basse. L'intestin du nouveau-né est alors rapidement colonisé par certaines des espèces bactériennes issues de son environnement immédiat.

La mise en place progressive de ce microbiote durant les deux premières années de vie semble suivre un schéma relativement organisé mais néanmoins spécifique, en terme d'espèces, à chaque individu (Figure 2).



CFU/g: Unité de formation de colonies par gramme de contenu intestinal

Figure 2 - Schéma d'acquisition des populations bactériennes intestinales chez l'enfant
(d'après (Langhendries, 2006))

L'établissement et la diversification du microbiote intestinal s'effectue par pallier avec une alternance de phases relativement stables des communautés microbiennes ponctuées par des changements brutaux. Les premières bactéries à s'implanter dans le tube digestif du nourrisson sont des espèces aéro-tolérantes, l'intestin étant à la naissance un milieu pourvu en oxygène. Ces bactéries pionnières anaérobies facultatives sont principalement des entérobactéries, parmi lesquelles figure *Escherichia coli*, mais aussi des streptocoques et des staphylocoques. Après quelques jours, le milieu intestinal va se réduire en oxygène et sous l'influence de l'allaitement, lactobacilles et bifidobactéries, bactéries anaérobies strictes, vont s'implanter et devenir majoritaires (Langhendries, 2006) (Palmer *et al.*, 2007) (Fallani *et al.*, 2010).

Le passage à une alimentation solide vers l'âge de six mois, représente le facteur principal de diversification du microbiote, favorisant le développement des entérobactéries, des streptocoques et des *Clostridiae*. A ce stade, des espèces spécifiques du côlon, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, s'établissent (Langhendries, 2006). Les bifidobactéries qui s'implantent dès les premiers jours qui suivent la naissance prédominent jusqu'à la fin de la première année, diminuant progressivement en nombre avec la diversification de l'alimentation (Turroni *et al.*, 2012).

Les mécanismes qui contrôlent la forte dynamique du microbiote intestinal pendant ces deux premières années de vie ne sont pas déterminés. Ils pourraient impliquer le virome de l'hôte, constitué par l'ensemble des virus qui le colonisent, et notamment des bactériophages capables d'infecter spécifiquement les bactéries (Reyes *et al.*, 2010) (Palmer *et al.*, 2007).

Vers l'âge de deux ans chez l'enfant, un équilibre des populations bactériennes intestinales est atteint, avec une biodiversité phylogénétique et fonctionnelle voisine de celle de l'adulte. Cette diversité est alors caractérisée, à l'inverse du microbiote en cours d'établissement, par une plus forte proportion d'espèces anaérobies, notamment de *Firmicutes*, et d'une plus faible proportion de bactéries anaérobies facultatives, ces dernières s'établissant en sous-dominance chez l'adulte avec *E. coli* comme espèce majoritaire.

La mise en place du microbiote intestinal semble suivre un schéma caractéristique des écosystèmes complexes se stabilisant au fur et à mesure qu'il se diversifie (McCann, 2000) (Ptacnik *et al.*, 2008).

2. Diversité du microbiote intestinal

Dix à cent fois plus nombreuses que les cellules de notre corps, les bactéries intestinales ont une masse totale de l'ordre du kilogramme (Neish, 2009). Leur densité suit un gradient oro-anal avec une richesse microbienne maximale observée dans le côlon distal (Figure 3).

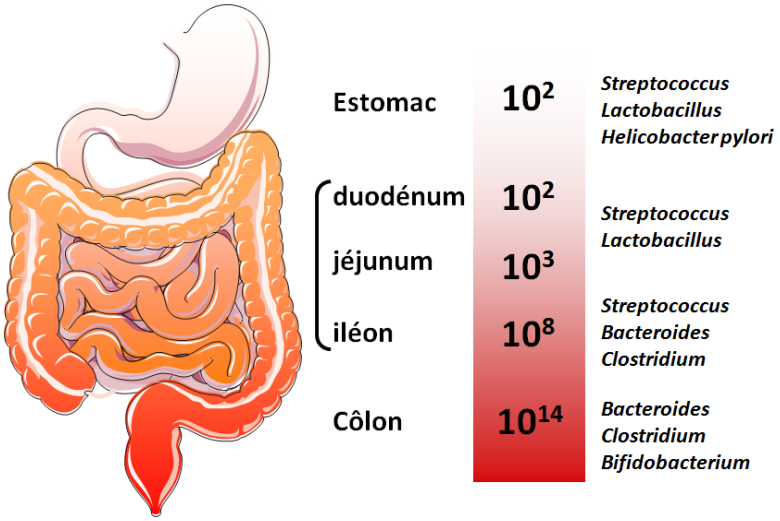


Figure 3 - Composition et concentration des espèces bactériennes luminales dominantes du microbiote intestinal le long du tractus digestif (Adapté de (Sartor, 2008))

A ce jour seulement 20 à 30% des bactéries du tractus digestif sont cultivables par les méthodes classiques de culture anaérobie et notre connaissance actuelle de la biodiversité du microbiote intestinal humain repose en grande partie sur l'évolution des techniques de biologie moléculaire réalisée depuis la fin du XXe siècle (Suau *et al.*, 1999) (Brugere *et al.*, 2009) (Fraher *et al.*, 2012). Ces techniques, basées sur la comparaison des séquences des gènes de l'ARN de la petite sous-unité du ribosome (ARNr 16S), gènes hautement conservés chez les procaryotes, permettent l'étude qualitative et/ou quantitative de la diversité bactérienne (Tableau 2).

L'analyse comparative des séquences des gènes de l'ARNr 16S issues de microbiotes humains fécaux adultes, a pu montrer que plus de 1000 espèces bactériennes, en très grande majorité anaérobies, composent cet écosystème. Les espèces bactériennes détectées ont le plus souvent une spécificité humaine et sont associées à l'environnement digestif de façon quasi exclusive, signes d'une longue adaptation avec l'hôte au cours de l'évolution (Backhed *et al.*, 2005). Certaines sont fortement représentées (>10^7 bactéries/g de contenu) et sont dites dominantes. Les populations mineures (<10^7 bactéries/g) sont dites sous-dominantes. Une partie des populations sous-dominantes du côlon, notamment issues de l'alimentation, sont en

transit et leur durée de persistance dans l'intestin peut varier d'une souche à l'autre. C'est particulièrement le cas de nombreuses souches bactériennes probiotiques qui ne s'implantent que transitoirement dans l'environnement digestif de l'hôte.

Technique	Description	Advantages	Disadvantages
Culture	Isolation of bacteria on selective media	Cheap, semi-quantitative	Labour intensive, <30% of gut microbiota have been cultured to date
qPCR	Amplification and quantification of 16S rRNA. Reaction mixture contains a compound that fluoresces when it binds to double-stranded DNA	Phylogenetic identification, quantitative, fast	PCR bias, unable to identify unknown species
DGGE/TGGE	Gel separation of 16S rRNA amplicons using denaturant/ temperature	Fast, semi-quantitative, bands can be excised for further analysis	No phylogenetic identification, PCR bias
T-RFLP	Fluorescently labelled primers are amplified and then restriction enzymes are used to digest the 16S rRNA amplicon. Digested fragments separated by gel electrophoresis	Fast, semi-quantitative, cheap	No phylogenetic identification, PCR bias, low resolution
FISH	Fluorescently labelled oligonucleotide probes hybridize complementary target 16S rRNA sequences. When hybridization occurs, fluorescence can be enumerated using flow cytometry	Phylogenetic identification, semi-quantitative, no PCR bias	Dependent on probe sequences—unable to identify unknown species
DNA microarrays	Fluorescently labelled oligonucleotide probes hybridize with complementary nucleotide sequences. Fluorescence detected with a laser	Phylogenetic identification, semi-quantitative, fast	Cross hybridization, PCR bias, species present in low levels can be difficult to detect
Cloned 16S rRNA gene sequencing	Cloning of full-length 16S rRNA amplicon, Sanger sequencing and capillary electrophoresis	Phylogenetic identification, quantitative	PCR bias, laborious, expensive, cloning bias
Direct sequencing of 16S rRNA amplicons	Massive parallel sequencing of partial 16S rRNA amplicons for example, 454 Pyrosequencing® (Roche Diagnostics GMBH Ltd, Mannheim, Germany) (amplicon immobilized on beads, amplified by emulsion PCR, addition of luciferase results in a chemoluminescent signal)	Phylogenetic identification, quantitative, fast, identification of unknown bacteria	PCR bias, expensive, laborious
Microbiome shotgun sequencing	Massive parallel sequencing of the whole genome (e.g. 454 pyrosequencing® or Illumina®, San Diego, CA, USA)	Phylogenetic identification, quantitative	Expensive, analysis of data is computationally intense

Abbreviations: DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; qPCR, quantitative PCR; TGGE, temperature gradient gel electrophoresis; T-RFLP, terminal restriction fragment length polymorphism.

Tableau 2 - Techniques utilisées pour caractériser le microbiote intestinal (Fraher *et al.*, 2012)

Cette grande diversité d'espèces a conduit un certain nombre d'auteurs à suggérer que, d'un point de vue bactériologique, chaque individu serait unique. Néanmoins, si l'on se place au niveau du genre bactérien, cette unicité disparaît. En effet, de récentes analyses métagénomiques, étudiant les profils bactériens du microbiote fécal appelés « entérotypes », révèlent la dominance parmi les 39 individus testés de l'un des genres *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus*. Les auteurs proposent alors que la majorité des humains pourrait être classée dans l'une de ces trois catégories (Arumugam *et al.*, 2011). Cette classification est en cours d'évolution, controversée par d'autres analyses de microbiotes fécaux humains qui font apparaître *Bacteroides* et *Prevotella* comme les deux entérotypes majeurs, *Ruminococcus* étant un sous-groupe associé à l'entérotype *Bacteroides* (Wu *et al.*, 2011). De même, la notion d'entérotype pour classer les individus les uns par rapport aux autres est actuellement discutée (Jeffery *et al.*, 2012). En effet, le microbiote intestinal est une

composante biologique dynamique et susceptible de changements, à la différence des groupes sanguins par exemple.

Si l'on se place à l'échelle du phylum, parmi la centaine de phyla bactériens actuellement identifiés au sein des écosystèmes terrestres, seuls six ont colonisé le tube digestif de l'homme. A cette échelle, la diversité bactérienne intestinale semble donc s'appauvrir encore avec chez l'homme comme chez la souris, *Bacteroidetes* et *Firmicutes*, représentant à eux seuls plus de 90% de la totalité du microbiote intestinal chez tous les individus. *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, et *Verrucomicrobia* représentent les 10% restants (Eckburg *et al.*, 2005).

La diversité et l'équilibre dynamique des espèces bactériennes qui s'établissent durant les deux premières années de vie, signent, comme notre génome notre individualité. La stabilité de cette diversité semble refléter l'homéostasie des rapports entre l'hôte et son microbiote intestinal (Clemente *et al.*, 2012). L'étude des altérations de cette diversité d'espèces tend à devenir une valeur prédictive du potentiel à développer certaines pathologies, voire à répondre à un traitement, récemment suggéré par la capacité de seulement certains patients obèses hyperinsulinémiques de répondre à un régime amaigrissant (Aron-Wisnewsky *et al.*, 2012). Déterminer les facteurs pouvant influencer positivement ou négativement l'établissement et le maintien de ces communautés pourrait permettre d'agir sur la bonne santé de l'hôte.

3. Facteurs influençant la composition et la stabilité du microbiote intestinal

La génétique de l'hôte et sa physiologie, mais aussi et surtout de nombreux facteurs environnementaux tels que le mode de naissance, l'hygiène et l'alimentation, ont un rôle majeur dans l'établissement et la stabilité du microbiote intestinal (Figure 4).

a) La génétique de l'hôte

L'analyse de l'impact de la génétique de l'hôte sur la mise en place des communautés bactériennes a été menée dans de nombreuses études réalisées chez des jumeaux, concluant à une plus forte proximité des profils bactériens dominants chez les jumeaux (Palmer *et al.*, 2007) (Turnbaugh *et al.*, 2008) (Reyes *et al.*, 2010) (Lepage *et al.*, 2011). Cependant, de récents travaux comparant les microbiotes fécaux de trois cohortes de jumeaux mono- et

dizygotes, incluant une centaine de familles de diverses origines géographiques, semblent remettre en cause ces conclusions. L'analyse par les nouvelles techniques de métagénomique, plus résolutives en terme de détection d'espèces sous-dominantes, indique qu'il n'existe pas plus de similarité significative entre les microbiotes fécaux provenant de jumeaux monozygotes, génétiquement plus proches, que dizygotes (Yatsunenko *et al.*, 2012).

D'autre part, des études descriptives menées chez l'homme montrent que des mutations dans des gènes de l'immunité ou du métabolisme sont associées à des modifications dans la diversité du microbiote intestinal (Tableau 3) (Spor *et al.*, 2011). Ces relations gènes-microbiote s'établissent dans un contexte particulier puisque pathologique et le lien de cause à effet entre le gène muté et les modifications des espèces bactériennes du microbiote intestinal n'est pas clairement démontré.

Enfin, il semble que la transmission verticale d'espèces, de la mère à l'enfant, observée dans les premiers stades de colonisation chez le nouveau-né, s'estompe dans les mois suivant la naissance. Le profil d'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16s chez les jeunes adolescents vivant avec leurs parents, ne s'avère pas plus proche de celui de la mère que de celui du père (Vaishampayan *et al.*, 2010) (Yatsunenko *et al.*, 2012). La cohabitation se révèle même être un facteur plus déterminant que la génétique et l'appartenance à la même famille, suggérant, en conditions physiologiques, un fort impact de l'environnement et des habitudes de vie sur la composition du microbiote.

Gene	Role of encoded protein	Disease*	Sampling site	Impact on the microbiota
MEFV‡	Proposed to help control inflammation by interacting with the cytoskeleton in certain white blood cells[56]	Familial Mediterranean fever	Faeces[55]	A study of mutations in *MEFV* revealed that distinct grouping of microbiomes is dependent on the allele carrier status of the host, and that patients with familial Mediterranean fever have a lower microbial richness[55]
APOA1	The main protein component of plasma high-density lipoprotein (HDL), which promotes cholesterol efflux from the liver for excretion; cholesterol is a component of bile acids, which restrict bacterial growth in the small intestine and, in turn, are processed by bacterial enzymatic activity into secondary bile acids that are re-absorbed[82]	Polymorphisms in the human *APOA1* gene have been associated with the risk of obesity and cardiovascular disease[98], and with hyperlipidaemia[99]	Faeces[35]	DGGE analysis indicates that the microbiota of APOAI-deficient mice has a different community structure from that of wild-type mice[35]
MYD88	An important signalling molecule that acts as one of the nodes in the information-gathering system of the innate immune system involved in sensing bacterial products; information from sensors of microbial products (for example, TLRs) is routed through MYD88 in inflammation response pathways[100]	Loss of MYD88 compromises the innate immune response to pathogens[100]	Caecum[22]	Analysis of the microbiota using clone libraries showed that three bacterial families (Lactobacillaceae, Rikenellaceae and Porphyromonadaceae) differ in abundance between MYD88-deficient mice and their wild-type counterparts[22]
			Caecum[19]	Clone libraries were used to compare the microbiota of wild-type and MYD88-deficient mice, and this analysis found no UniFrac-based clustering by genotype; furthermore, MYD88 is not required for a caecal bloom of the family Erysipelotrichaceae when mice are fed a high-fat diet[19]
RELMB	A cytokine that is expressed in the gastrointestinal tract and has been implicated in innate immunity[111,112]; it has also been shown to regulate the expression of REGIIIγ, an antimicrobial peptide[113]; RELMβ-deficient mice remain relatively lean when fed freely on a high-fat diet that renders wild-type mice obese[114]	Unknown	Faeces[114]	The *Relmb*$^{-/-}$ genotype modestly but significantly affected the abundance of 15 lineages from the Bacteroidetes, one from the Proteobacteria and 15 from the Firmicutes, compared with their abundances in wild-type mice; much of the difference between the two genotypes was due to changes in the abundances of rare lineages[114]
IgA locus	An antibody that has an important role in mucosal immunity	Humans lacking IgA have a higher incidence of inflammatory bowel diseases[115]	Small intestine[116]	Mice deficient in IgA harbour an increased abundance of SFB[116]; mice that are unable to export IgA shed more *S.* Typhimurium when infected than wild-type mice[117]
			Faeces[118]	Weight loss has been associated with a decrease in the proportion of IgA-coated bacteria in humans[118]

Tableau 3 - Polymorphismes génétiques de l'hôte affectant la composition du microbiote (Spor *et al.*, 2011)

b) L'environnement de l'hôte

Les premiers contacts de l'enfant avec son environnement extérieur à la naissance semblent influencer la nature des bactéries capables de rapidement coloniser le tractus digestif.

Des travaux comparant les selles d'enfants dans les premiers jours de vie montrent que celles d'enfants nés par césarienne contiennent moins de bifidobactéries que celles d'enfants nés par voie basse (Huurre *et al.*, 2008) (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). La naissance par voie basse semble favoriser la colonisation par les espèces identifiées dans la muqueuse vaginale de la mère (*Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia*) alors que l'accouchement par césarienne favorise plutôt une colonisation précoce par les bactéries présentes sur la peau maternelle (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*) (Reid *et al.*, 2011). Des études

épidémiologiques suggèrent que des perturbations dans la mise en place du microbiote intestinal et notamment l'influence du mode de naissance, affectent la santé de l'hôte à plus long terme. L'incidence de l'asthme et des rhinites allergiques est particulièrement plus élevée chez les enfants nés par césarienne (Renz-Polster *et al.*, 2005) (Pistiner *et al.*, 2008). Certaines espèces bactériennes, comme les bifidobactéries prépondérantes chez l'enfant avant sevrage, sont associées à la bonne santé du futur adulte (Bezirtzoglou and Stavropoulou, 2011). Cependant, ces études restent des corrélations d'observation et aucune démonstration de l'action des bifidobactéries, notamment des souches testées comme probiotiques, sur la prévention de ce type de pathologie n'a été publiée à ce jour.

Un autre facteur pouvant perturber l'établissement du microbiote intestinal aux temps précoces est l'hygiène. La théorie "hygiéniste" qui s'est développée dans les années 1990, suggère qu'une faible exposition à des agents infectieux durant l'enfance favoriserait l'émergence des maladies atopiques par défaut de mise en place des mécanismes de régulation du système immunitaire (Strachan, 1989). Une nouvelle hypothèse revisitant cette théorie suggère que l'évolution des modes de vie, notamment l'antibiothérapie et la chloration de l'eau potable, aurait occasionné la perte, au sein de notre microbiote intestinal, d'espèces possédant certaines propriétés immunostimulantes mais dépourvues de caractère invasif chez l'hôte immunocompétent, les « pathobiontes ». Ces bactéries pourraient plus particulièrement influencer la maturation physiologique du système immunitaire (Blaser and Falkow, 2009) (Hunter, 2012). Ces théories hygiénistes sont notamment soutenues par l'observation d'une augmentation de l'incidence des maladies allergiques et auto-immunes concomitante avec celle des niveaux d'hygiène. Des études épidémiologiques associent en outre l'antibiothérapie durant l'enfance avec le développement de telles pathologies (Foliaki *et al.*, 2009). L'analyse de l'impact d'un traitement antibiotique couramment prescrit chez l'adulte notamment en cas d'infections urinaires, la ciprofloxacine, décrit comme étant à faible impact sur les bactéries du compartiment intestinal, a fait l'objet d'une étude récente. Les profils du microbiote fécal de trois individus avant, pendant et après un traitement de cinq jours à la ciprofloxacine, montrent l'altération qualitative et quantitative d'un tiers des espèces bactériennes chez les trois sujets, les espèces affectées par le traitement variant d'un individu à l'autre. D'autre part, les auteurs observent la forte capacité de résilience du microbiote intestinal, dont la composition semble se rétablir quatre semaines après la fin du traitement. Néanmoins, après six mois de suivi, certaines espèces restent indétectables (Dethlefsen *et al.*, 2008). Les différents mécanismes qui permettent le retour à l'équilibre

microbien après de telles altérations ne sont pas encore bien établis et la question de l'impact de traitements itératifs est plus préoccupante (Reid *et al.*, 2011). En effet, certaines diarrhées chez l'adulte sont causées par les traitements antibiotiques répétés et dans 25% des cas, les patients développent une infection récurrente à *Clostridium difficile* (Britton and Young, 2012). La question de la capacité de résilience du microbiote du jeune enfant, alors encore en cours d'établissement, n'est à l'heure actuelle pas résolue.

Un dernier facteur environnemental qui semble particulièrement influencer l'établissement et la stabilité des espèces bactériennes est l'alimentation. L'étude INFABIO menée en Europe, analysant les échantillons fécaux de 606 nourrissons âgés de six semaines, observe que les profils bactériens dominants diffèrent entre les nouveau-nés sous allaitement maternel, présentant plus de bifidobactéries, de ceux nourris par formulation lactée infantile. Chez ces derniers, *Bacteroides*, lactobacilles et certains membres du groupe *Clostridium coccoides* sont détectés en plus grand nombre (Fallani *et al.*, 2010). Il apparaît également que la diversification de l'alimentation du nourrisson vers l'âge de six mois s'accompagne d'une augmentation marquée de la diversité des espèces bactériennes intestinales (Langhendries, 2006) (Palmer *et al.*, 2007) (Koenig *et al.*, 2012).

Chez l'adulte, l'entérotype, genre bactérien dominant du microbiote fécal, semble être associé au régime alimentaire suivi à long terme. Bien qu'un changement de régime alimentaire à court terme influence dès les premières vingt quatre heures certains taxons bactériens, l'entérotype de l'individu n'est pas modifié. Ainsi, un régime riche en graisses et protéines d'origine animale favoriserait plus particulièrement l'entérotype *Bacteroides* tandis qu'un régime riche en carbohydrates et fibres végétales favoriserait l'entérotype *Prevotella*, genre émergent dans l'étude du microbiote d'enfants burkinabès (Wu *et al.*, 2011) (Yatsunenko *et al.*, 2012) (De Filippo *et al.*, 2010).

De façon remarquable, l'influence du type de régime alimentaire sur la diversité des espèces bactériennes qui s'établissent dans l'intestin a par ailleurs été analysée chez soixante espèces de mammifères dont l'homme, et il apparaît que cette diversité s'accroît allant de plus faible chez les espèces carnivores à la plus élevée chez les espèces herbivores, les espèces omnivores étant alors intermédiaires (Ley *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que, en conditions physiologiques, la mise en place et la stabilité du microbiote intestinal dépendent de l'interaction entre la génétique de l'hôte et les facteurs environnementaux. La part respective de ces différents éléments est difficile à établir d'autant que la mise au point de nouvelles techniques plus résolutives en termes de détection d'espèces bactériennes sous-dominantes et leur utilisation à grande échelle, semblent moduler certains des résultats initiaux. Il est également possible que ces facteurs interviennent différemment en fonction du type de bactérie considérée et de sa position au sein du réseau trophique. On peut par exemple penser qu'une espèce adhérente à la muqueuse, donc en contact direct avec l'hôte, sera plus sensible aux facteurs physiologiques qu'une espèce luminale.

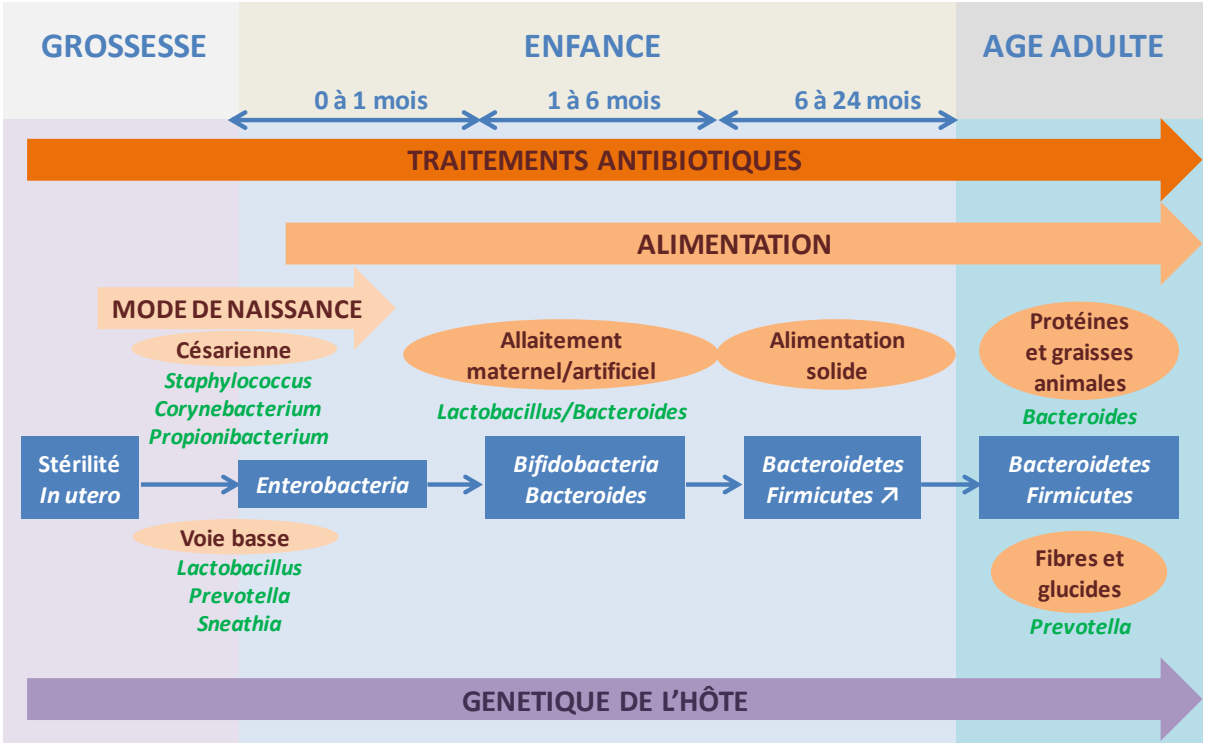


Figure 4 - Facteurs influençant l'établissement et la stabilité du microbiote intestinal

L'importance des facteurs environnementaux sur l'établissement et le maintien du microbiote intestinal ouvre en revanche de nouvelles perspectives thérapeutiques car, si l'on ne peut agir sur la génétique de l'hôte pour moduler sa physiologie, on peut imaginer pouvoir agir sur la composition de son microbiote. L'étape préalable consiste alors à mieux comprendre les interactions hôte/bactéries en identifiant plus particulièrement les fonctions physiologiques de l'hôte influencées par le microbiote intestinal.

Le développement de modèles animaux sans germe, ou axéniques, dans les années 1930, a permis d'entreprendre l'identification de ces fonctions (Pollard, 1964). L'axénie, élevage en environnement stérile, et la gnotoxénie, élevage en environnement microbien contrôlé, sont deux outils majeurs pour l'étude des mécanismes par lesquels les bactéries agissent sur la physiologie de l'hôte. De façon intéressante, l'introduction chez l'animal axénique d'une espèce bactérienne ou d'un groupe de bactéries, permet de déterminer le rôle particulier de certaines espèces bactériennes.

B. Influence du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte

Le potentiel fonctionnel du microbiote intestinal est énorme puisque le microbiome constitué par l'ensemble des génomes du microbiote intestinal, contient vraisemblablement 150 fois plus de gènes que le génome humain (Qin *et al.*, 2010). Les conséquences physiologiques de la colonisation microbienne sont nombreuses et l'animal axénique apparaît physiologiquement immature. Un fait remarquable est la redondance des grandes fonctions métaboliques, trophiques et protectrices du microbiote intestinal, retrouvées chez tous les individus et ce, malgré la présence de nombreuses espèces bactériennes sujet-spécifiques. Ceci laisse penser qu'il existe sur le plan fonctionnel une interchangeabilité entre espèces bactériennes (Turnbaugh and Gordon, 2009). Par ailleurs, il semble que le processus de maturation physiologique de l'hôte opéré par la colonisation microbienne soit conservé dans l'évolution des vertébrés, la souris et le poisson zèbre partageant un profil commun d'expression des gènes en réponse à la colonisation par leur microbiote respectif (Rawls *et al.*, 2004).

1. Nutrition et métabolisme de l'hôte

L'impact du microbiote sur le métabolisme de l'hôte est majeur. Ainsi, les besoins énergétiques des animaux axéniques sont 20 à 30% supérieurs à ceux de leurs homologues conventionnels, colonisés naturellement à la naissance (Backhed *et al.*, 2004).

Une fonction métabolique importante du microbiote intestinal est l'hydrolyse et la fermentation des polysaccharides non digérés par les enzymes de l'hôte qui arrivent dans le côlon. Les acides gras à chaîne courte (AGCC), *n*-butyrate, propionate et acétate, principaux produits terminaux de cette digestion avec l'ATP et l'hydrogène, sont absorbés à 95% environ par l'épithélium intestinal. Il a été montré que l'acétate contribue à la fourniture

d'énergie au tissu musculaire et sert de substrat à la synthèse du cholestérol. Le propionate est quant à lui essentiellement utilisé par le foie pour la néoglucogenèse, la lipogenèse ou la synthèse protéique. Enfin, le butyrate est directement utilisé par l'épithélium colique qui tire 60 à 70% de son énergie des produits de la fermentation bactérienne (Bernalier-Donadille, 2010). Au final, la fermentation colique des glucides fournit entre 3 et 11% des besoins énergétiques d'entretien d'un Occidental consommant un régime pauvre en résidus végétaux non digestibles (Coles *et al.*, 2010).

La régulation de la balance énergétique de l'hôte par le microbiote ne se limite pas à son action sur les apports énergétiques. En effet, le microbiote est également capable de réguler le stockage et l'oxydation des acides gras par la régulation de la lipoprotéine lipase (Backhed *et al.*, 2004) (Turnbaugh *et al.*, 2006).

D'autre part, le microbiote permet l'hydrolyse et la putréfaction des substrats protidiques (5-20 g/jour). Néanmoins, cette dégradation est mineure en termes d'apport énergétique pour l'hôte et bénéficie principalement à l'écosystème bactérien (Bernalier-Donadille, 2010). Le microbiote peut aussi oxyder, réduire et hydroxyler des acides gras à longueur de chaîne variable (5-8 g/jour), contribuant notamment à l'absorption des acides gras essentiels (Eyssen and Parmentier, 1974) (Chin *et al.*, 1994). Il métabolise les stérols neutres (cholestérol et phytostérols) et acides (acides biliaires) favorisant ainsi leur élimination de l'organisme (Bernalier-Donadille, 2010).
Enfin, le microbiote colique participe à la synthèse de certaines vitamines (K, B8 et B12), et à la bioconversion de micronutriments ou de composés endogènes aboutissant selon les cas à leur activation ou inactivation, à l'absorption du calcium, du magnésium et du fer.

Ces puissantes capacités métaboliques du microbiote sont en faveur de l'idée que l'apport des symbiontes dans la fonction de digestion, favorisant la récupération d'énergie, aurait majoritairement contribué à sélectionner les espèces pour leur implantation dans le tube digestif de l'hôte au cours de l'évolution.

Ce lien entre la structure du microbiote et l'apport à la fonction digestive/nutritive de l'hôte, est renforcé par de récentes recherches. En effet, il semble que les capacités métaboliques du microbiote évoluent en fonction des besoins nutritionnels de l'hôte et diffèrent notamment entre enfant et adulte. La richesse en glycanes du lait maternel est corrélée à l'activité glycoside hydrolase du microbiote, alors nécessaire à la dégradation de ces sucres complexes, et est détectée uniquement chez l'enfant. La disponibilité en nutriments essentiels semble

également favoriser certaines fonctionnalités microbiennes. Le microbiote fécal des enfants Malaisiens et Amérindiens présente une activité de biosynthèse de la vitamine B2 (riboflavine) et une activité uréase plus importante que celui des enfants Nord-Américains en relation avec le plus faible apport en protéines animales dans ces populations (Yatsunenko *et al.*, 2012). De façon remarquable, une étude récente du suivi de l'établissement du microbiote chez un nouveau-né détecte la présence fonctionnelle d'hydrolyse des fibres alimentaires dans le microbiote fécal de l'enfant avant l'introduction d'aliment contenant des fibres (Koenig *et al.*, 2012). Cette étude nécessite néanmoins d'être confirmée sur une plus grande cohorte d'enfants.

2. Effet trophique et maturation de l'épithélium intestinal

Une deuxième fonction majeure du microbiote intestinal est son effet trophique sur l'épithélium intestinal. La muqueuse colique des rongeurs axéniques est hypoplasique, les cryptes sont atrophiées avec un nombre de cellules par crypte diminué d'environ 20%, et les villosités intestinales de l'intestin grêle sont plus grandes. Le renouvellement cellulaire est ralenti et la différenciation cellulaire est incomplète (Falk *et al.*, 1998) (Alam *et al.*, 1994). La perfusion intestinale en AGCC et plus particulièrement en butyrate, stimule la prolifération cellulaire des cryptes coliques chez les animaux axéniques, suggérant un rôle particulier de ce produit issu de la fermentation bactérienne dans le renouvellement de l'épithélium colique.

L'effet trophique du microbiote se répercute sur tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal. Le nombre et la fonction des cellules entéro-endocrines sont également modulés par la colonisation microbienne (Uribe *et al.*, 1994). Les souris axéniques présentent un transit intestinal ralenti, avec une motilité réduite par défaut d'activité du système neuromusculaire entérique. Le microbiote intestinal semble agir sur les cellules entéro-endocrines sécrétrices du neuropeptide tyrosine (NPY), seule hormone dont la concentration sanguine est diminuée après colonisation de rats axéniques par mise en contact avec des rats conventionnels (Husebye *et al.*, 2001).

Enfin, le réseau sanguin qui irrigue la muqueuse intestinale des animaux axéniques est moins dense et son développement est induit lors de l'établissement des bactéries dans l'intestin. Les mécanismes mis en jeu semblent impliquer pour partie les cellules de Paneth, cellules épithéliales intestinales spécialisées dans la synthèse des peptides antimicrobiens, elle-même sous contrôle des bactéries intestinales (Stappenbeck *et al.*, 2002) (Ayabe *et al.*, 2000). Une

étude récente a mis en évidence le rôle plus particulier du microbiote dans la glycosylation et l'expression à la surface des cellules épithéliales intestinales d'un facteur tissulaire requis pour l'angiogénèse chez la souris, identifiant une partie du mécanisme moléculaire par lequel le microbiote contribue à ce processus (Reinhardt *et al.*, 2012).

Le microbiote intestinal participe à d'autres processus de glycosylation de lipides et de protéines situés à la surface de l'épithélium intestinal qui vont former une couche protectrice caractéristique de la muqueuse intestinale mature, le glycocalyx (Moran *et al.*, 2011). La fucosylation des glycanes de surface des cellules épithéliales est notamment induite par le microbiote au moment du sevrage (Bry *et al*., 1996). Certaines espèces utilisatrices de fucose semblent plus particulièrement actives dans cette maturation. Les modifications de surface de l'épithélium intestinal, initiées en période post-natale par le microbiote, pourraient participer à l'établissement de bactéries, notamment dans le côlon, contribuer à la stabilisation du microbiote en constituant des points d'ancrage potentiel pour les adhésines bactériennes et participer à l'effet barrière du microbiote en occupant ces sites d'ancrages bactériens (Meng *et al*., 2007).

3. Effet Barrière

La troisième fonction essentielle du microbiote intestinal est protectrice. En effet, les bactéries symbiotiques confèrent une résistance face à l'implantation de bactéries pathogènes dans l'intestin. Alfred Nissle évoque pour la première fois en 1916 ses expériences de co-cultures de différentes souches d'*E. coli* isolées de fèces en présence d'une souche bactérienne pathogène et détermine l'effet antagoniste de certaines *E. coli* sur la croissance du pathogène étudié *in vitro*. Cet effet barrière du microbiote est confirmé *in vivo* pour la première fois en 1955, par l'observation d'une plus forte sensibilité à l'infection par *Vibrio cholerae* de cochons d'Inde pré-traités par la Streptomycine, ceux non-traités étant préservés de l'infection (Freter, 1955). Différentes études sont venues compléter ces travaux dans divers modèles animaux infectés par d'autres pathogènes comme *Salmonella*. Ces recherches font notamment apparaître que certaines espèces symbiotiques semblent plus particulièrement requises dans cet effet barrière (Figure 5). Cependant les mécanismes par lesquels les bactéries du microbiote exercent cet effet protecteur sont encore discutés (Stecher and Hardt, 2011).

Trois principaux mécanismes semblent impliquer le microbiote intestinal dans cette résistance de l'hôte à la colonisation par des bactéries pathogènes.

De par sa diversité et sa stabilité, le microbiote est un redoutable compétiteur en terme d'occupation de niche, bloquant alors l'accès des pathogènes aux sites d'ancrage et aux nutriments.

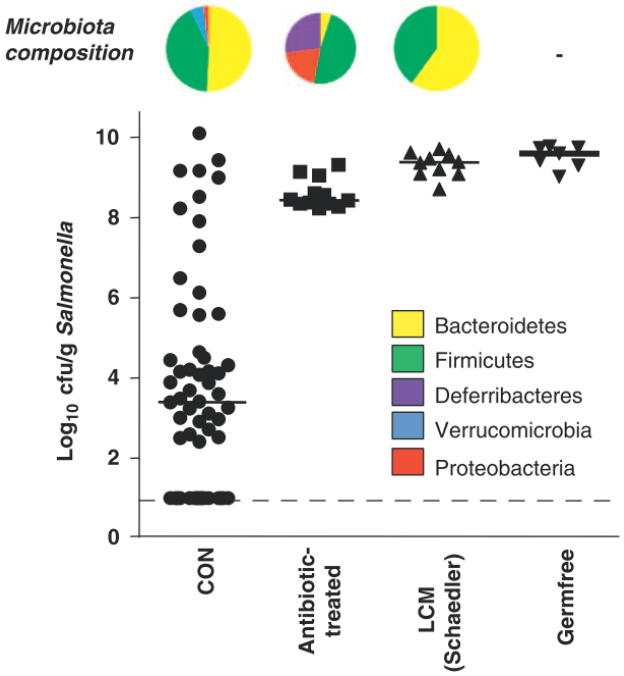


Figure 5 - Diversité du microbiote et résistance à l'infection orale par *Salmonella.*
Souris conventionnelles (CON), gnotoxéniques (LCM), axéniques ou conventionnelles pré-traitées par la streptomycine. (Stecher and Hardt, 2011)

Outre ces phénomènes de compétition, la plupart des symbiontes sont capables de produire des bactériocines, molécules chimiques bactériostatiques ou bactéricides permettant de réguler les populations de l'écosystème et qui se révèlent également délétères pour les bactéries pathogènes (Gallo and Hooper, 2012).

L'effet bactéricide de ces peptides sur des pathogènes est démontré *in vitro* et *ex vivo* mais semble plus controversé *in vivo* et la majeure partie des souches testées sont des probiotiques n'appartenant pas au microbiote résidant (de Sablet *et al.*, 2009) (Dobson *et al.*, 2012). Néanmoins, ces bactériocines constituent de nouvelles molécules d'intérêt pour le développement d'antibiotiques (Sit and Vederas, 2008).

Le dernier mécanisme mis en jeu dans cet effet barrière est la capacité du microbiote à stimuler le système immunitaire inné et adaptatif de l'hôte. Le second chapitre de cette introduction bibliographique présentera plus particulièrement le rôle du microbiote dans la maturation et la régulation à plus long terme des réponses immunes intestinales.

4. Impact physiologique systémique : axe intestin-cerveau

L'homéostasie intestinale implique des interactions étroites entre l'hôte et son microbiote. Bien que ce dialogue soit concentré au niveau de l'intestin, le rôle physiologique des symbiontes ne se limite pas au compartiment intestinal mais s'intègre plus globalement à l'ensemble de l'organisme (Figure 6).

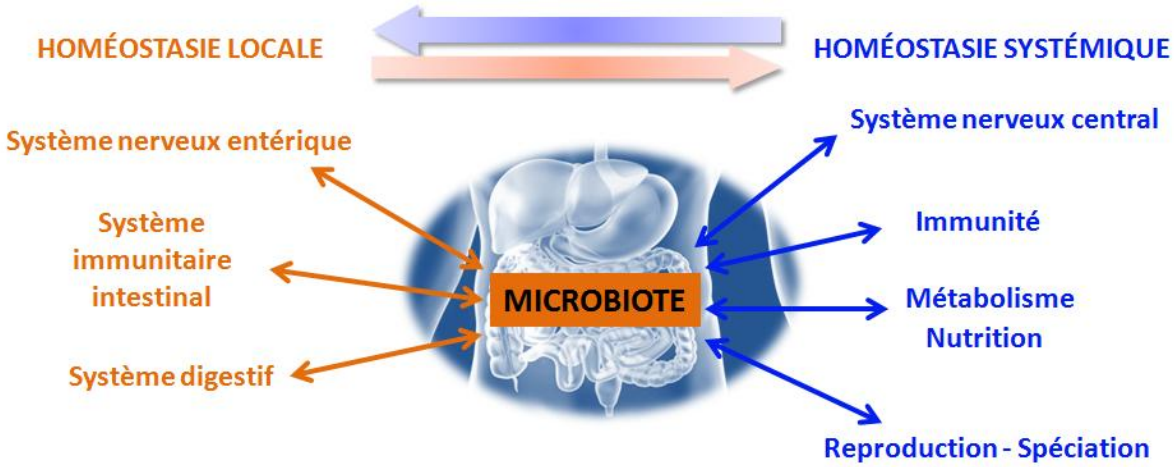


Figure 6 - Contributions du microbiote intestinal à l'homéostasie de l'hôte

(N.B.: l'impact du microbiote sur les fonctions de reproduction et de spéciation mentionné sur ce schéma est étudié chez les arthropodes)

Les répercussions physiologiques systémiques de cette colonisation bactérienne font notamment l'objet de récentes études sur l'axe intestin-cerveau. Parmi ces recherches, certaines tentent d'expliquer la réaction particulière au stress observée chez les souris axéniques. En effet, celles-ci présentent en situation de stress une activité motrice plus élevée et un comportement moins anxieux comparés à des animaux colonisés avec un microbiote exempt de bactéries pathogènes (SPF). L'expression de deux protéines impliquées dans la synaptogénèse au niveau du striatum, zone de contrôle du mouvement volontaire, est réduite chez les souris axéniques suggérant un défaut de maturation des synapses dans cette zone cérébrale (Heijtz *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été suggéré un lien entre le microbiote intestinal, son action sur le métabolisme du tryptophane, acide aminé précurseur pour la synthèse de la sérotonine et de la mélatonine, et les comportements dépressifs (O'Connor *et al.*, 2009a; O'Connor *et al.*, 2009b) (Grenham *et al.*, 2011). L'étude de l'impact du microbiote intestinal sur le développement du système nerveux central est un domaine de recherche émergent qui pourrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques du syndrome de l'intestin irritable dont l'étiologie demeure incomplètement déterminée (Ghoshal *et al.*, 2012).

En conditions physiologiques, de nombreuses fonctions nécessaires au maintien de l'homéostasie de l'hôte, aussi bien au niveau intestinal que systémique, sont influencées par le microbiote et en font un acteur clé de sa physiologie. L'étude des interrelations entre ces différentes fonctions et l'activité des bactéries symbiotiques sont des domaines nouvellement explorés qui illustrent la complexité des mécanismes physiologiques influencés par ce dialogue eucaryote-procaryote comme récemment étudié à l'interface immunité-métabolisme de l'hôte (Shulzhenko *et al.*, 2011) (Upadhyay *et al.*, 2012).

Les échanges qui s'établissent au sein de l'écosystème bactérien et entre l'hôte et son microbiote mettent en jeu différents mécanismes cellulaires et moléculaires. Le système immunitaire de l'hôte joue un rôle central dans ces dialogues intra- et inter-espèces. Il est en effet capable de décrypter et de réguler certains des échanges bactériens, et dans le même temps il participe directement au dialogue avec les bactéries.

C. Systèmes de communication au sein du super-organisme

Autrefois considérées comme des organismes unicellulaires indépendants et peu coopératifs, les bactéries ont progressivement dévoilé leur forte capacité d'interaction et une nouvelle conception de leur organisation en société bactérienne a vu le jour, notamment au sein de l'écosystème complexe que représente le microbiote du tube digestif. Par sa densité et les diverses fonctions qu'il exerce, le microbiote intestinal peut être considéré comme un véritable organe. Cet organe n'est pas irrigué par un réseau vasculaire ou lymphatique mais développe d'autres systèmes de connexion, internes et externes, assurant son développement et sa stabilité au sein de l'hôte.

1. Dialogue bactéries-bactéries

Les bactéries qui s'établissent dans l'intestin ne sont pas isolées les unes des autres mais organisées en réseau trophique, véritable organe bactérien, au sein duquel elles établissent différents systèmes de communication. Ce dialogue permet de coordonner l'activité du réseau trophique bactérien, de faciliter son adaptabilité face à des changements brutaux dans l'environnement digestif, et d'assurer ainsi sa pérennité. Les bactéries ont ainsi développé une pléthore de moyens au travers desquels elles sont capables d'échanger de l'information génétique, notamment par le système de transfert horizontal de gène, mais également de réguler l'expression de leur gène par le « quorum sensing ».

a) Transfert horizontal de gènes

De façon schématique, la reproduction bactérienne s'opère par division de la bactérie « mère » en deux bactéries « filles » génétiquement identiques entre elles et à la bactérie qui leur a donné naissance. Ce mode de reproduction asexuée ne permet pas l'évolution rapide du matériel génétique pourtant nécessaire à la forte adaptabilité des bactéries à leur environnement et à leur pouvoir à coloniser de nouvelles niches. Les bactéries ont alors mis en place d'autres systèmes leur permettant d'acquérir du matériel génétique par transfert horizontal d'ADN entre bactéries. Les études menées *in vitro* dans des bactéries modèles comme *Escherichia coli* ont permis de caractériser les mécanismes de ce transfert ; cette bactérie dite « compétente » est couramment utilisée comme outil vecteur pour l'insertion de constructions de gènes en culture cellulaire. Néanmoins, l'importance et la régulation *in vivo* de ces transferts de matériel génétique au sein des sociétés bactériennes restent obscures.

L'étude de l'évolution des génomes bactériens par transfert horizontal de matériel génétique au sein de communautés complexes s'est développée ces dernières années grâce à l'essor des nouvelles techniques de séquençage à haut débit. Le microbiote intestinal humain représente l'écosystème bactérien terrestre le plus dense identifié à ce jour, et la plasticité de son métagénome, ensemble des génomes des bactéries intestinales résidentes, serait majoritairement attribuée au transfert horizontal de gène par conjugaison (Stecher *et al.*, 2011) (Treangen and Rocha, 2011). Cet échange est réalisé par transfert de plasmides, élément d'ADN mobile et circulaire, d'une bactérie compétente vers une bactérie receveuse, médié par la formation d'une jonction cellulaire entre les deux bactéries (Thomas and Nielsen, 2005).

Une illustration récente de ces mécanismes de transfert de gènes entre bactéries au sein du microbiote intestinal est la détection d'enzymes caractéristiques de bactéries marines au sein des populations bactériennes intestinales dans la population japonaise. Porphyranases et agarases, enzymes présentent chez *Zobellia galactanivorans*, un *Bacteroidetes* marin dont le substrat privilégié est l'algue rouge *Porphyra*, sont fréquemment identifiées dans le microbiote fécal des japonais, et ne sont pas détectées dans les bases de données métagénomiques issues des microbiotes fécaux de populations Nord-Américaines. Les gènes de ces deux enzymes ont été plus précisément identifiés chez un symbionte humain, *Bacteroides Plebeius*, qui aurait acquis les deux enzymes par transfert horizontal de gène de la bactérie marine, initialement présente sur les algues rouges, ou nori, couramment

consommées crues au Japon sous forme de sushi, à la bactérie intestinale humaine (Hehemann *et al.*, 2010).

Les facteurs environnementaux qui favorisent le transfert de gène entre bactéries dans les communautés microbiennes sont particulièrement recherchés car de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques sont ainsi transférés d'une bactérie à l'autre. L'inflammation intestinale serait un facteur capable de favoriser le transfert horizontal de gène d'une bactérie pathogène, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, vers une bactérie symbiotique *Escherichia coli*, toutes deux appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Le développement de ces bactéries anaérobies facultatives lors de l'inflammation intestinale permettrait d'augmenter leur rencontre favorisant ainsi les échanges de matériel génétique entre ces bactéries par conjugaison (Stecher *et al.*, 2011). L'importance de ces transferts de gène et de leur régulation sur l'écologie microbienne intestinale commencent tout juste à être appréhendées par la communauté scientifique et il semblerait même que ces transferts horizontaux puissent exister entre les cellules eucaryotes de l'hôte et les cellules procaryotes bactériennes (Patrick *et al.*, 2011).

Ces échanges sont cependant limités par le simple fait qu'ils nécessitent une certaine proximité entre la cellule bactérienne compétente et la cellule receveuse. Un système de communication s'affranchissant de contact bactérien, qui sera par la suite appelé « quorum sensing », coordonne le comportement des bactéries au sein de la communauté bactérienne, par régulation de l'expression de leurs gènes *via* la sécrétion de métabolites secondaires autoproduits (Fuqua *et al.*, 1994). Cette découverte est à l'origine de la conception multicellulaire de l'organisation bactérienne et de leurs nécessaires interactions.

b) Quorum sensing

Alexander Tomasz en 1965 et John Hastings en 1970 identifient pour la première fois un système de communication entre bactéries qui, par le biais d'un facteur sécrété par les bactéries elles-mêmes, permet de coordonner leur activité (Tomasz, 1965) (Nealson *et al.*, 1970). Considéré à l'époque comme un phénomène isolé, restreint à un faible nombre de bactéries, ce mécanisme est aujourd'hui reconnu comme étant un processus régulateur majeur largement répandu au sein des sociétés bactériennes.

Ainsi, par la sécrétion d'un vaste panel de métabolites secondaires de nature peptidique ou lipidique, les bactéries communiquent et coordonnent l'expression de gènes intra- et inter-

espèces. Parmi les signaux chimiques les plus étudiés figurent des oligopeptides, des N-acyl homosérine lactones (AHL) et différents systèmes d'autoinducteur (AI) (Keller and Surette, 2006). Ces métabolites de faible poids moléculaire non essentiels à la croissance et à la survie de la bactérie productrice prise de manière isolée, sont en revanche nécessaires lorsque celle-ci est considérée dans un écosystème plus complexe. En phase de croissance bactérienne, ces médiateurs moléculaires sécrétés dans le milieu extérieur par les bactéries vont atteindre un niveau de concentration élevé, seuil à partir duquel ces métabolites sont alors capables soit de diffuser passivement à travers la paroi bactérienne vers le cytoplasme bactérien, soit de se lier à un récepteur présent à la surface de la bactérie. Une fois le cytoplasme bactérien atteint, ces métabolites interagissent avec un régulateur transcriptionnel qui va alors induire l'expression spécifique d'un groupe de gènes.

L'expression de nombreux gènes bactériens est régulée par la production de ces métabolites, elle-même sous le contrôle interne d'enzymes bactériennes. Des gènes impliqués dans la croissance bactérienne, dans la motilité bactérienne, dans le métabolisme de la bactérie, y compris certains gènes de virulence, sont régulés au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par ce système de communication intercellulaire bactérien (Bassler and Losick, 2006).

Certains récepteurs procaryotiques qui perçoivent ces métabolites microbiens et qui activent la cascade de régulation d'expression des différents gènes cibles sont en outre capables de percevoir des signaux produits par l'hôte comme l'adrénaline, produite au niveau du système nerveux central, ou la noradrénaline, produite par les neurones adrénergiques du système nerveux entérique (Hughes and Sperandio, 2008).

A l'inverse, des métabolites bactériens issus du quorum sensing semblent également être activeurs de voies de signalisation dans les cellules épithéliales intestinales. Dans des modèles d'étude *in vitro* et *ex vivo*, le pentapeptide « competence and sporulation factor » (CSF) produit par *Bacillus subtilis*, une bactérie symbiotique qui s'établit en dominance dans l'intestin, peut être transporté dans la cellule épithéliale intestinale de l'hôte par liaison au transporteur apical « organic cation transporter isotype 2 » (OCTN2) et activer la voie de signalisation « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) p38 et la protéine kinase Akt, impliqués dans la survie cellulaire, ainsi que l'expression des protéines de choc thermique (heat shock protein, HSP), au rôle cytoprotecteur (Fujiya *et al.*, 2007).

Les systèmes de communication qui s'établissent au sein des sociétés bactériennes, présentés de façon non exhaustive ici, sont nombreux. L'échange de matériel génétique entre bactéries et l'autorégulation de l'expression de leurs gènes permettent l'adaptation rapide et constante des bactéries à l'environnement digestif de l'hôte. Ce dialogue interne garantit l'homéostasie de l'organe bactérien en régulant et coordonnant l'activité des bactéries au sein du réseau trophique et il contribue également à la protection de la niche intestinale contre l'invasion par des bactéries pathogènes (de Sablet *et al.*, 2009).

La capacité de l'hôte à percevoir certains signaux de ce dialogue et à participer ainsi à la régulation du réseau trophique bactérien est renforcée par l'existence de récepteurs de l'immunité innée spécialisés dans la détection d'éléments microbiens en surface ou à l'intérieur de la cellule eucaryote.

2. Dialogue hôte-bactéries

Le concept d'une détection des microbes par des récepteurs du système immunitaire inné de l'hôte est né en 1989 avec Charles Janeway (Janeway, 1989). Les premiers récepteurs ont par la suite été identifiés, tout d'abord chez la drosophile, puis chez l'homme (Lemaitre *et al.*, 1996) (Medzhitov *et al.*, 1997).

a) Récepteurs et voies de signalisation impliqués

La complexité des mécanismes qui régulent les interactions entre le microbiote et l'hôte est due à la nécessité de tolérer cette puissante charge bactérienne tout en maintenant une forte réactivité contre d'éventuelles bactéries pathogènes. Or les éléments/motifs microbiens reconnus par l'hôte sont des motifs structuraux partagés par les procaryotes qu'ils soient symbiotiques ou pathogéniques, les Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns (PAMPs/MAMPs). Ces structures sont reconnues par différents types de récepteurs, les Pattern Recognition Receptors (PRRs), transmembranaires ou intra-cytoplasmiques des cellules eucaryotes, les plus étudiés étant les Toll-like receptors (ou TLRs) et les NOD-like receptors (ou NLRs), respectivement (Figure 7) (Sartor, 2008) (Abreu, 2010). Dans l'intestin, de nombreuses cellules expriment ces récepteurs de l'immunité innée, notamment les cellules épithéliales, les cellules myéloïdes et les lymphocytes.

Schématiquement, l'activation des TLRs/NLRs conduit au recrutement d'un adaptateur cytoplasmique, myeloid differentiation primary response gene (MyD) (88) et/ou TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β (TRIF). MyD88 et TRIF vont alors assurer la transduction du signal et activer les voies de signalisation dépendantes de nuclear factor-kappa B (NFκB) et MAPK. Ces voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de l'expression de nombreux gènes de la réponse immunitaire de l'hôte comme la synthèse de cytokines, chimiokines et de molécules antimicrobiennes *etc*. (Figure 7).

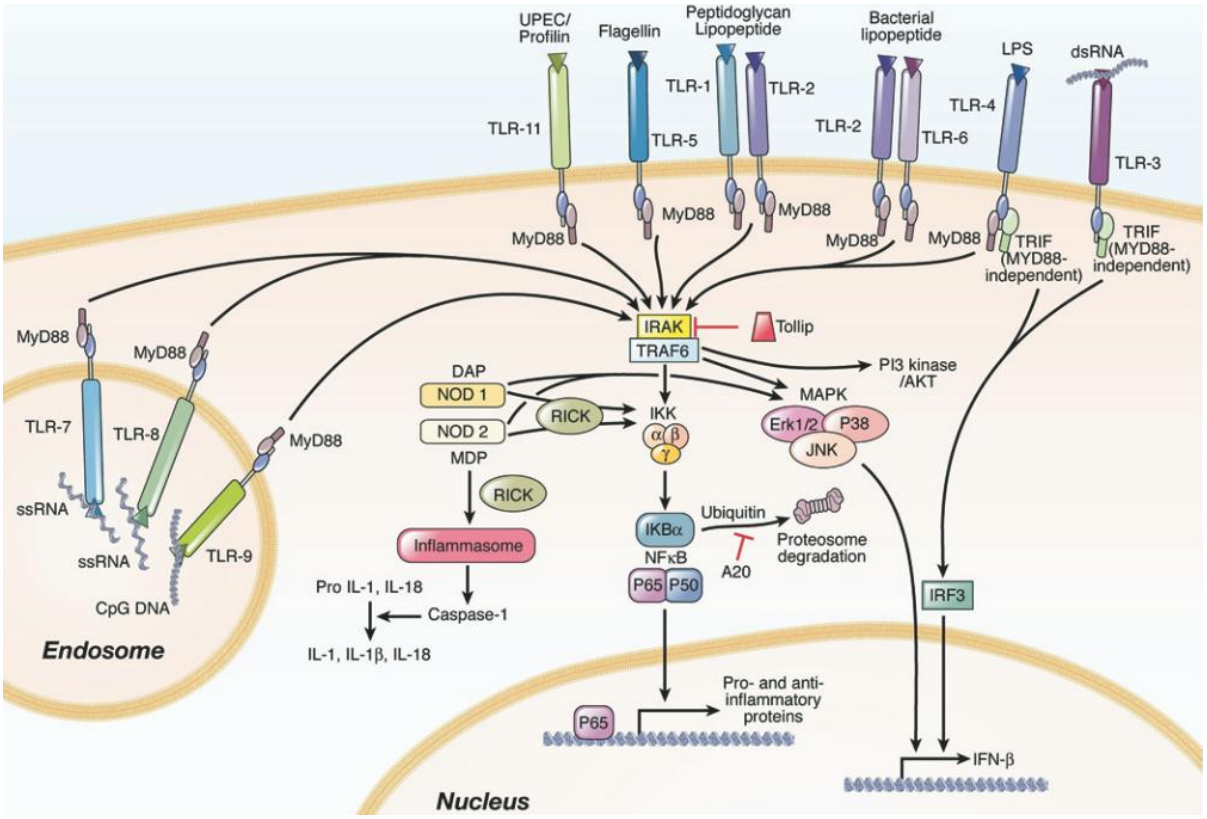


Figure 7 - Principaux motifs microbiens reconnus par les PRRs chez les mammifères (TLR et NLR) et induction des voies de signalisation NFκB et MAP-kinases (Sartor, 2008)

L'étude des modèles animaux déficients pour l'une ou les deux molécules adaptatrices, MyD88/TRIF, a permis d'illustrer l'importance de ces voies de signalisation dans le maintien du rôle de barrière de l'épithélium intestinal contre les pathogènes et les symbiontes. Les souris déficientes pour la molécule adaptatrice MyD88 sont plus sensibles à la colite induite par le dextran sodium sulfate (DSS) (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). L'inactivation de MyD88 restreinte aux cellules épithéliales intestinales, conduit à l'augmentation de la translocation bactérienne détectée dans les ganglions mésentériques, associée à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de l'immunité innée et adaptative dans

les cellules épithéliales isolées du côlon, notamment ceux favorisant l'exclusion immune des symbiontes et leur maintien dans la lumière intestinale (Frantz *et al.*, 2012).

Enfin, chez l'homme, de nombreux polymorphismes dans les gènes des PRRs sont associés à une susceptibilité à développer une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) (Hugot *et al.*, 2001) (Ogura *et al.*, 2001) (Michelsen and Arditi, 2007).

Les mécanismes par lesquels ces PRRs discriminent les bactéries symbiotiques des bactéries pathogènes ne sont pas complètement établis. Différentes hypothèses d'ignorance ou de tolérance des symbiontes qui peuplent l'intestin par les récepteurs de l'immunité innée, ont été proposées dans la littérature.

b) Discrimination symbiontes *versus* pathobiontes par les PRRs

Un mécanisme d'ignorance des symbiontes par les récepteurs de l'immunité innée de l'hôte est suggéré par diverses stratégies d'adaptation des bactéries symbiotiques dans l'environnement digestif. Un processus majeur est le rétrocontrôle négatif exercé par les bactéries elles-mêmes sur l'expression des récepteurs et/ou des molécules impliquées dans leur voie de signalisation dans les cellules épithéliales intestinales (Figure 8).

Ainsi, il a été montré que le LPS, composant de la paroi des bactéries Gram négatif, inhibe l'expression de interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), conduisant à l'inactivation de la voie impliquant la signalisation par NFκB. Ce processus est particulièrement observé dans les temps précoces de colonisation ce qui pourrait faciliter la mise en place du microbiote chez le nouveau-né (Lotz *et al.*, 2006) (Lotz *et al.*, 2007) (Clemente *et al.*, 2012). Le microbiote est également capable de bloquer l'export nucléaire de NFκB, soit par l'induction du facteur de transcription peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ, soit par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Kelly *et al.*, 2004) (Kumar *et al.*, 2007).

Un autre mécanisme d'évasion des bactéries intestinales pourrait provenir d'une différence dans l'affinité des PAMPs, pathogéniques, et des MAMPs, symbiotiques, pour les PRRs de l'hôte. Le lipide A du lipopolysaccharide (LPS) issu de la paroi des bactéries à Gram négatif (Figure 9) est pentacylé chez les *Bacteroidetes* ce qui diminue son affinité vis-à-vis du TLR4 (Sansonetti and Medzhitov, 2009).

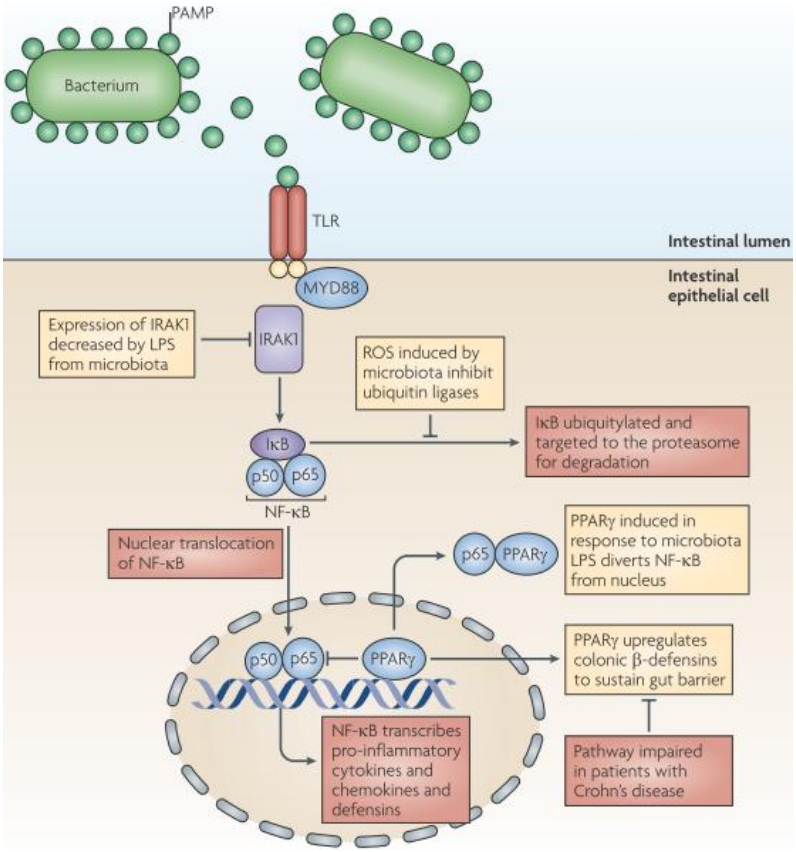


Figure 8 - Régulations négatives de la voie NFκB dans la cellule épithéliale intestinale impliquant le microbiote
(Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010)

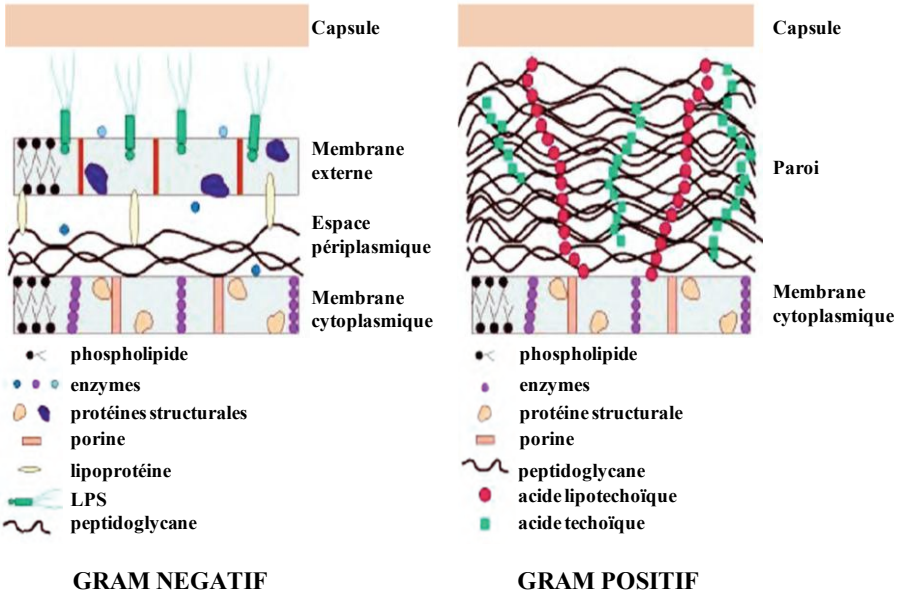


Figure 9 - Différences structurales entre les enveloppes des bactéries à coloration de Gram positif ou négatif
(adapté de : (Sansonetti, 2009))

Le rôle antagoniste de LPS à lipide A faiblement acylé a été étudié *in vitro* sur l'activation du TLR-4 humain en présence de LPS à lipide A hexacylé d'*Escherichia coli*. Ces MAMPs à la conformation bloquante sont capables d'inhiber l'activation du TLR-4 humain transfecté dans des cellules HEK293. Ces molécules antagonistes sont une des voies thérapeutiques actuellement envisagée dans le traitement des sepsis impliquant la voie de signalisation *via* le TLR-4 (Coats *et al.*, 2007). Une étude plus approfondie de la diversité des PAMPs serait nécessaire pour étayer cette hypothèse d'ignorance ou de furtivité d'interaction entre symbiontes et récepteur de l'immunité de l'hôte.

D'autres travaux sont en faveur de l'induction de mécanismes régulateurs plutôt qu'une ignorance du système immunitaire inné vis-à-vis du microbiote intestinal.

Les modèles de souris chimères reconstituées par des cellules de moelle osseuse provenant soit de souris de phénotype sauvage, soit de souris MyD88-déficientes suggèrent que l'activation des PRRs des cellules non hématopoïétiques induit des mécanismes de tolérance immune et des voies de signalisation impliquées dans la survie et la réparation cellulaire, alors que l'activation de ces PRRs sur les cellules hématopoïétiques activent des mécanismes inflammatoires (Asquith *et al.*, 2010) (Frantz *et al.*, 2012). Ainsi, en conditions physiologiques, les symbiontes détectés par les PRRs des cellules épithéliales intestinales sont capables d'induire une réponse immune régulatrice qui contribue à leur maintien dans la lumière intestinale et qui participe à la protection et au renouvellement des cellules épithéliales intestinales ; les bactéries pathogènes plus invasives qui pénètrent la barrière épithéliale intestinale seraient elles détectées par les PRRs des cellules lymphoïdes présentes dans le chorion sous-jacent induisant alors une réponse immunitaire inflammatoire.

Cette compartimentation cellulaire de la réponse immune induite lors de l'activation des récepteurs de l'immunité innée par les bactéries intestinales semble garantir à la fois une tolérance vis-à-vis des bactéries présentes dans la lumière et le cas échéant, si la bactérie est intrusive, une réponse protectrice inflammatoire.

Une autre possibilité permettant de discriminer les symbiontes des bactéries pathogènes impliquant également la reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée serait l'intégration par ces récepteurs d'une notion de danger associée à la virulence de la bactérie considérée. Ainsi, l'intégration des différents signaux bactériens, PAMPs/MAMPs, avec des signaux de dommages cellulaires, les DAMPs Damage-associated molecular pattern,

permettrait de moduler la réponse et de l'adapter en fonction de la bactérie et de sa virulence. (Matzinger, 2002).

Le dialogue bidirectionnel qui s'établit entre l'hôte et son microbiote est complexe et implique comme troisième partenaire le système immunitaire de l'hôte qui, *via* les récepteurs de l'immunité innée, détecte les signaux bactériens et évalue leur capacité invasive.
La compartimentation des échanges restreinte au niveau des cellules épithéliales intestinales en condition physiologique entre l'hôte et son microbiote semble garantir la nature homéostatique de ces interactions tripartites.

PARTIE II

MICROBIOTE ET MATURATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LE COMPARTIMENT INTESTINAL

L'épithélium intestinal représente une surface de plus de 300 m^2 de contact direct avec l'extérieur. L'intestin grêle est notamment constitué de nombreux replis, les valvules conniventes, au sein desquels se forment des villosités associées à des cryptes dont l'entité cellulaire principale, l'entérocyte, possède à son pôle apical des microvillosités. Dans le côlon, seules les structures en cryptes sont présentes. La monocouche cellulaire qui constitue l'épithélium intestinal est supportée par un chorion ou *lamina propria* (Figure 10). Cette structure particulière favorise le contact entre le milieu extérieur et le milieu intérieur et est nécessaire à la fonction d'absorption des nutriments et des électrolytes de l'intestin.

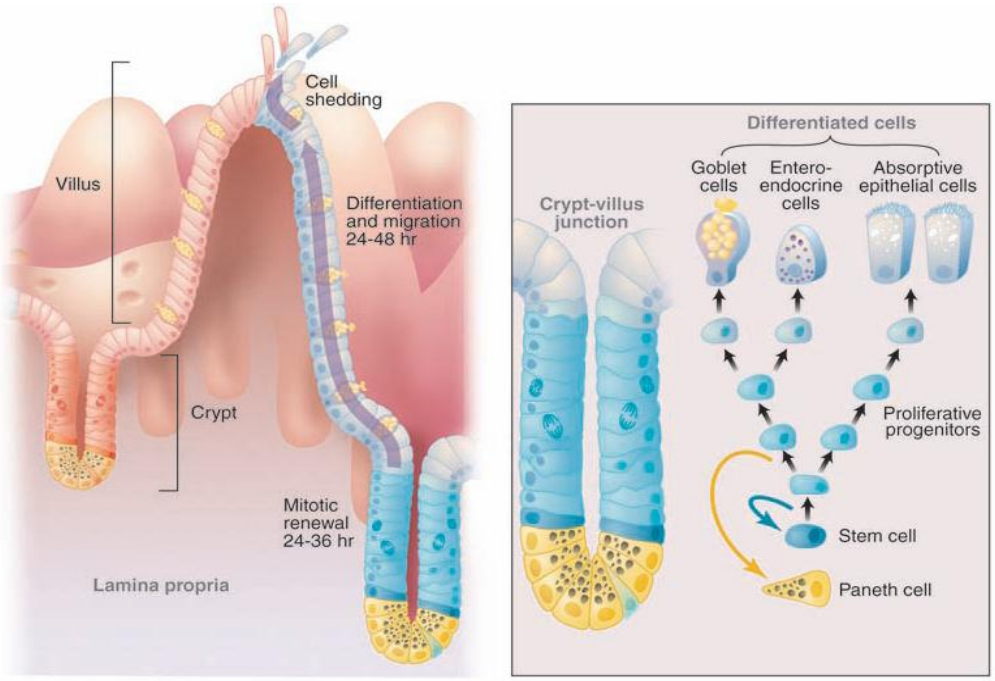


Figure 10 - Structure anatomique de l'intestin grêle (gauche) et schéma de différenciation des cellules épithéliales intestinales (droite) (Radtke and Clevers, 2005)

Face à la masse d'antigènes d'origine alimentaire ou microbienne qui transitent dans la lumière intestinale, cet épithélium doit assurer un rôle de barrière. Chez les mammifères, un système immunitaire complexe vient soutenir cette première ligne de défense physique. Ce système immunitaire intestinal associe des réponses immunitaires innées, rapidement mobilisables, et des réponses immunitaires adaptatives, plus longues à s'établir et dont la particularité est la constitution d'une mémoire immunitaire. L'immunité innée implique des récepteurs peu spécifiques, les PRRs (Pathogen Recognition Receptors), exprimés sur les différents types cellulaires présents dans la muqueuse (entérocytes, polynucléaires, mastocytes, macrophages et cellules dendritiques (CD)). L'immunité adaptative mobilise

quant à elle des récepteurs spécifiques exprimés par les lymphocytes B, (BCR) et les lymphocytes T, (TCR).

La formation du système immunitaire intestinal est initiée *in utero*, sous le contrôle du programme génétique de l'hôte. La maturation de ce système immunitaire intestinal intervient en période postnatale sous l'influence de la colonisation bactérienne. La majorité des preuves expérimentales proviennent d'études menées sur rongeurs axéniques (Tableaux 5 et 6 - *cf fin de Partie II*).

Le système immunitaire intestinal peut être schématiquement divisé en deux compartiments. Un premier compartiment dit inducteur, où les réponses immunes intestinales sont initiées après stimulation antigénique, et un second compartiment effecteur, où les cellules activées par l'antigène s'établissent après recirculation *via* le cycle hémolymphatique (Figure 11). Les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés (FLI) et les ganglions mésentériques sont les principaux sites inducteurs ; l'épithélium intestinal et le chorion sous-jacent représentent les sites effecteurs (Brandtzaeg *et al.*, 2008).

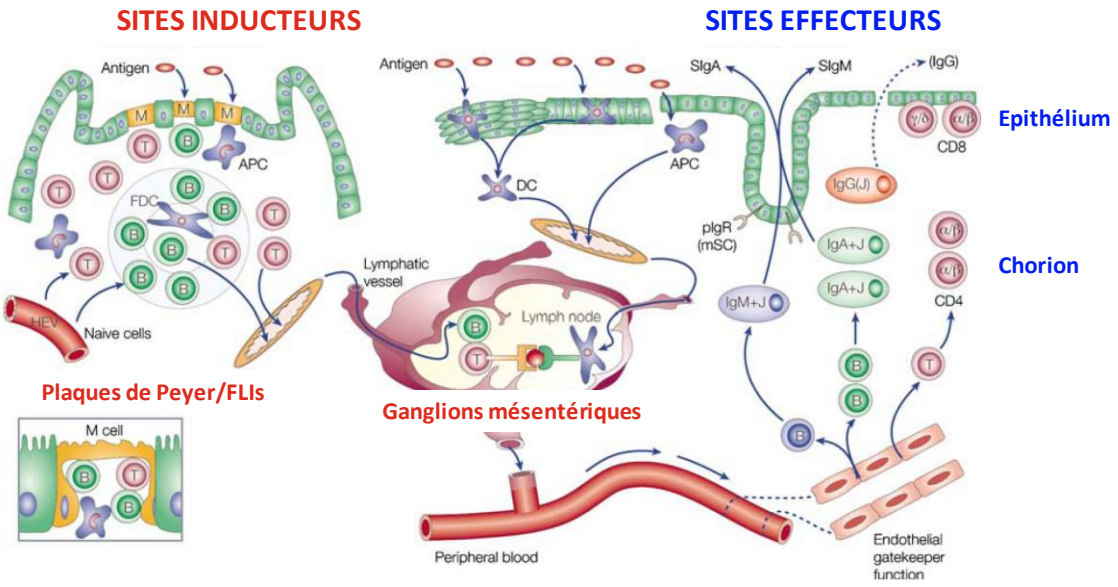


Figure 11 - Représentation schématique du système immunitaire intestinal
(adapté de (Brandtzaeg *et al.*, 2008))

Dans un contexte où l'incidence et la prévalence des maladies inflammatoires chroniques, allergiques et auto-immunes ne cessent de s'accroître, de nombreuses recherches tentent de comprendre plus précisément la nature des interactions homéostatiques qui s'établissent entre le microbiote et le système immunitaire intestinal, notamment les mécanismes cellulaires et

moléculaires qui participent conjointement à la structuration des deux entités pendant cette période néonatale. La mise en place de mécanismes limitant l'activation du système immunitaire lors de l'arrivée massive des espèces bactériennes colonisatrices dans le tube digestif. Ces mécanismes de tolérance immune vis-à-vis des symbiontes qui s'établissent s'exercent d'une part, *via* les régulations négatives de l'expression des PRRs et de la voie NFκB associée, par les espèces bactériennes-elles-mêmes (Lotz *et al.*, 2006). D'autre part, des mécanismes d'exclusion immune, permettant de maintenir les bactéries dans la lumière intestinale à distance de la muqueuse, sont exercés par les IgA sécrétées par la mère et transférées passivement dans l'intestin du nouveau-né par le lait maternel (Harris *et al.*, 2006).

Bien que les distinctions structurales et fonctionnelles entre les compartiments inducteurs et effecteurs du système immunitaire intestinal ne soient pas absolues, les signaux qui conduisent à l'extravasation, la migration, et l'accumulation des lymphocytes B et T naïfs *versus* effecteurs ou mémoires, au sein des ces compartiments respectifs, sont néanmoins différents (Brandtzaeg *et al.*, 2008). C'est pourquoi j'ai choisi cette approche, quelque peu schématique, pour présenter le rôle du microbiote dans la maturation du système immunitaire intestinal.

A. Initiation des réponses immunitaires dans le compartiment inducteur

1. Formation du compartiment inducteur

a) Structures lymphoïdes secondaires

Les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques sont des structures lymphoïdes organisées dites secondaires, dont le développement est initié *in utero via* le recrutement de cellules inductrices de tissu lymphoïde (iTLs). Ces cellules d'origine hématopoïétique appartiennent à une lignée de cellules lymphoïdes innées (ILCs) et sont caractérisées par l'expression à leur surface du récepteur à l'interleukine 7 (IL-7R), de la lymphotoxine-$\alpha_1\beta_2$ ($LT\alpha_1\beta_2$) et du facteur de transcription Retinoic acid-related Orphan Receptor (ROR)γt. Les cellules iTLs activent localement les cellules stromales organisatrices de tissu lymphoïde (oTL) qui expriment le récepteur à la lymphotoxine (LTβR). L'interaction $LT\alpha_1\beta_2$-LTβR active la voie NFκB dans les cellules oTLs induisant la sécrétion de nombreuses chimiokines

et molécules d'adhésion (Vascular Cell Adhesion Molecule 1(VCAM1), Intercellular Adhesion Molecule (ICAM1), Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1 (MAdCAM1)). Ces cellules participent alors à la formation de veinules post-capillaires à endothélium cubique (HEV) qui assureront le passage de lymphocytes B et T naïfs et d'autres cellules iTLs du sang vers le tissu lymphoïde en formation. Les lymphocytes B vont se grouper en follicules autour desquels les lymphocytes T s'établissent en « zone T ». Certaines cellules oTLs sont capables de se différencier en CD alors que d'autres acquièrent un phénotype fibroblastique assurant la structure réticulée du tissu lymphoïde. Les CD situées dans les zones T, par la sécrétion de Chemokine Chemokine Ligand 19/21 (CCL19/21) participent au recrutement et au maintien des lymphocytes T qui expriment Chemokine Chemokine Receptor 7 (CCR7). D'autres CD dites folliculaires (FDC) sont spécialisées dans le recrutement et le maintien au sein des follicules des lymphocytes B exprimant le récepteur CXCR5, *via* la sécrétion respective des chimiokines CXCL13 et B-cell Activating Factor (BAFF). (Aloisi and Pujol-Borrell, 2006; Mebius, 2003) (McDonald *et al*., 2010) (Figure 12).

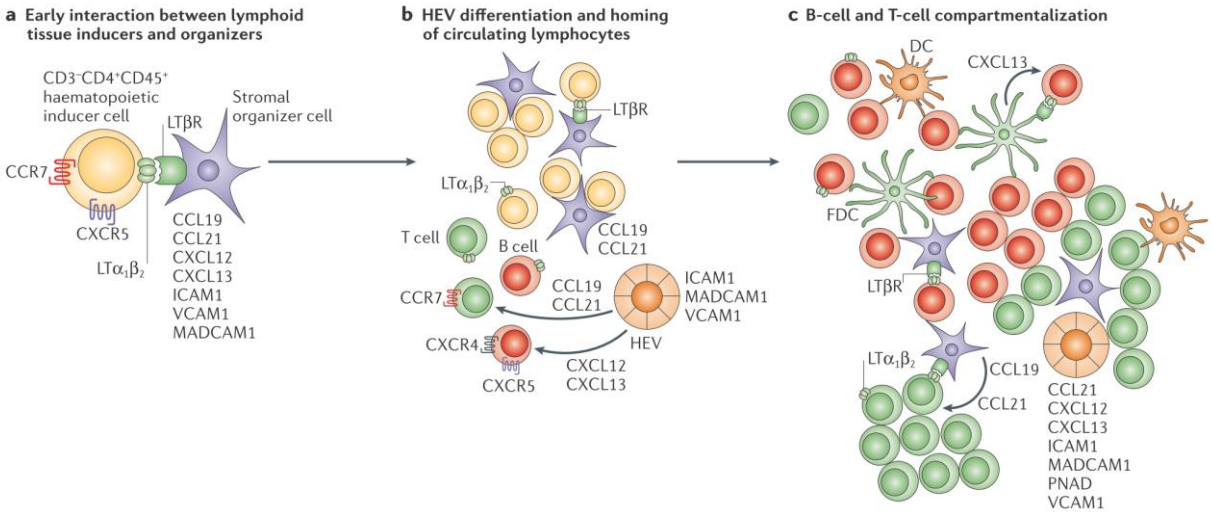


Figure 12 - Interactions cellulaires et moléculaires au cours du développement des tissus lymphoïdes
(Aloisi and Pujol-Borrell, 2006)

Les structures lymphoïdes secondaires regroupent un nombre variable de follicules agrégés. Si leur formation est indépendante des signaux microbiens, leur maturation structurale et fonctionnelle assurant à la fois la capture des antigènes et le recrutement des cellules immunocompétentes ne s'achève qu'après la colonisation microbienne en période post-natale.

En effet, l'histologie des plaques de Peyer de souris axéniques montre une hypoplasie associée à une réduction du nombre et de la taille des centres germinatifs, structures où les lymphocytes B activés par l'antigène prolifèrent et réalisent leur recombinaison de classe isotypique et leur maturation d'affinité. Les souris axéniques présentent alors une faible quantité de lymphocytes B pré-effecteurs, les plasmablastes B220^{-} IgA^{+} au sein de ces structures (Macpherson and Harris, 2004; Macpherson *et al*., 2001) (Figure 13).

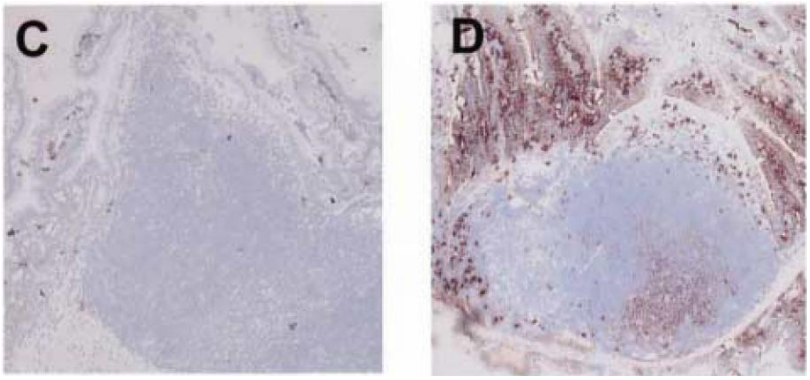


Figure 13 - Coupes histologiques des plaques de Peyer de souris axéniques et de souris SPF

C : souris axéniques, D : souris SPF - Les IgA-SC sont colorées en marron (Macpherson *et al*., 2001)

D'autres formations lymphoïdes dites tertiaires, se développent après la naissance et sont observées de manière diffuse, isolées les unes des autres, au sein du chorion.

b) Structures lymphoïdes tertiaires

Les follicules lymphoïdes isolés (FLI) sont constitués d'un seul follicule B et sont plus particulièrement retrouvés dans l'iléon et le côlon, où la présence bactérienne est la plus importante. Ils appartiennent aux formations lymphoïdes tertiaires qui sont plus dynamiques que les formations lymphoïdes secondaires (plaques de Peyer et ganglions mésentériques) notamment de par leur développement induit en période post-natale.

Chez la souris, en conditions physiologiques, des amas cellulaires situés à la base des cryptes intestinales, appelés cryptoplaques, sont détectées entre le 7e et le 25e jour après la naissance. Ces formations regroupent des cellules de phénotype proche de celui des iTLs embryonnaires (c-Kit^{+}, IL7R^{+}, Thy1^{+}) exprimant notamment le facteur de transcription nucléaire RORγt, des CD et des cellules stromales (Hamada *et al.*, 2002). Les cryptoplaques, non encore clairement identifiées chez l'homme, seraient à l'origine de la formation des FLIs (Lugering *et al.*, 2010) (Pearson *et al.*, 2012). De façon intéressante les cellules de type iTLs sont détectées à l'âge

adulte chez la souris et chez l'homme, suggérant un développement possible des FLI ou d'autres structures lymphoïdes tertiaires dépendant de ces cellules à l'âge adulte (Kim *et al.*, 2009).

Comme pour les structures lymphoïdes organisées, la formation des cryptoplaques et des FLI requiert l'interaction de la $LT\alpha_1\beta_2$ avec son récepteur LTβR (Hamada *et al.*, 2002) (Taylor *et al.*, 2004). Des études basées sur l'utilisation de chimères hématopoïétiques ont démontré que les cellules progénitrices des cryptoplaques et des FLI (productrices de la $LT\alpha_1\beta_2$) sont d'origine hématopoïétiques, alors que les cellules exprimant LTβR sont d'origine stromale (Taylor *et al.*, 2004). Le blocage de l'interaction $LT\alpha_1\beta_2$-LTβR par injection de la protéine de fusion LTβR-Ig pendant les deux premières semaines de vie chez la souris, bloque le développement des cryptoplaques mais également des FLI, renforçant l'idée qu'il existe un lien développemental entre ces deux structures (Lorenz *et al.*, 2003) (Bouskra *et al.*, 2008). Les cryptoplaques sont observées chez les souris présentant un déficit immunitaire combiné sévère (SCID) et chez les souris déficientes pour RAG-2 suggérant que leur développement est indépendant des lymphocytes B et T (Kanamori *et al.*, 1996).

Par ailleurs, elles sont présentes chez les souris axéniques, suggérant un développement indépendant de la colonisation microbienne (Kanamori *et al.*, 1996). En revanche, ces animaux axéniques ne présentent pas ou peu de FLI, et ceux détectés ont une structure immature avec une faible quantité de lymphocytes B $B220^+$ (Figure 14) (Lorenz *et al.*, 2003) (Pabst *et al.*, 2006).

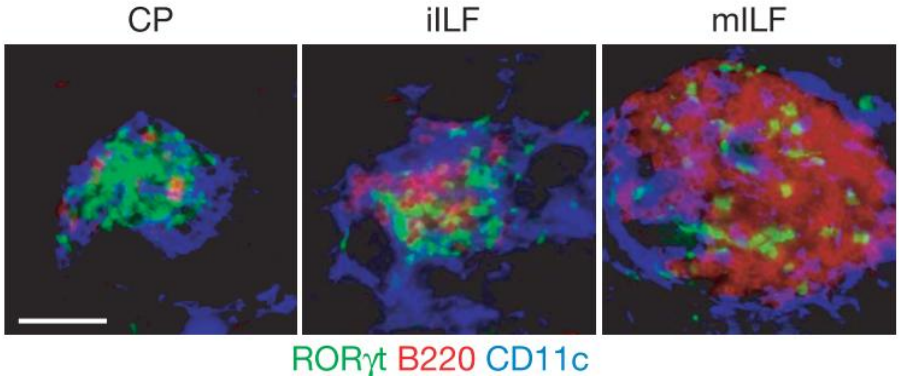


Figure 14 - Différences structurales entre cryptoplaques, FLI immatures et FLI matures

Images d'immunohistochimie de coupes d'iléon de souris transgéniques Rorc(γt)-GfpTG montrant les différences structurales entre cryptoplaques (CP) FLI immatures (iILF) et matures (mILF) (Bouskra *et al.*, 2008)

L'impact de la colonisation microbienne sur la conversion des cryptoplaques en FLI est observé dès la troisième semaine de vie des souriceaux et également lors de colonisation plus tardive à 6 semaines de vie (Pabst *et al.*, 2006), (Lorenz *et al.*, 2003). Par ailleurs, une hyperplasie et une hypertrophie des FLI sont observées dans des modèles de souris présentant une pullulation microbienne luminale, et le traitement de ces souris par des antibiotiques prévient ces anomalies (Fagarasan *et al.*, 2002) (Suzuki *et al.*, 2004).

L'étude récente de l'impact du microbiote dans la conversion des cryptoplaques en FLIs et dans leur maturation a permis d'identifier le rôle particulier du peptidoglycane, élément de la paroi des bactéries Gram négatif. La voie de signalisation implique le récepteur intracytoplasmique NOD1 dans des cellules d'origine non hématopoïétique. L'activation de la voie de signalisation de NOD1 dans ces cellules induit la transcription de CCL20 et conduit au recrutement au sein des cryptoplaques en formation de cellules de type iTLs et de lymphocytes B, exprimant tous deux CCR6 (Bouskra *et al.*, 2008). La maturation des FLI semble impliquer les voies de signalisation associées aux autres récepteurs de l'immunité innée, TLRs et NOD2 ainsi que le récepteur TNFR de type I qui participent au recrutement des lymphocytes B B220$^+$ exprimant la lymphotoxine (Bouskra *et al.*, 2008) (Lorenz *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2005)

En situation d'inflammation chronique, la néogenèse de tissu lymphoïde tertiaire peut être induite et impliquerait, comme pour les structures secondaires, l'interaction entre la LT$\alpha_1\beta_2$ et son récepteur LTβR. Par contre, l'origine des cellules inductrices de ce tissu, de type iTL, est encore discutée. Des souris déficientes pour l'un des deux facteurs de transcription Id2 ou RORγt, tous deux nécessaires à la différenciation des cellules lymphoïdes progénitrices en cellules iTLs, développent après infection par le virus influenza un tissu lymphoïde ectopique associé aux bronches (iBALT), suggérant une néogenèse de tissu lymphoïde indépendante des iTLs (Rangel-Moreno *et al.*, 2011). Un rôle substitutif des CD, des lymphocytes B et/ou T activés, exprimant à leur surface la LT$\alpha_1\beta_2$ ainsi que l'implication de l'IL-17 ont été suggérés (Figure 15). Des lymphocytes T CD4$^+$ exprimant RORγt et producteurs d'IL-17 (Th17) ont été détectés dans les iBALT de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) idiopathique. Le rôle de l'IL-17 dans la néogenèse de structures lymphoïdes tertiaires a été mis en évidence chez la souris dans un modèle d'induction d'iBALT par inhalation de LPS et dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune

expérimentale (EAE). Néanmoins, leur implication est controversée dans des modèles d'induction d'iBALT par infections virales (Neyt *et al.*, 2012).

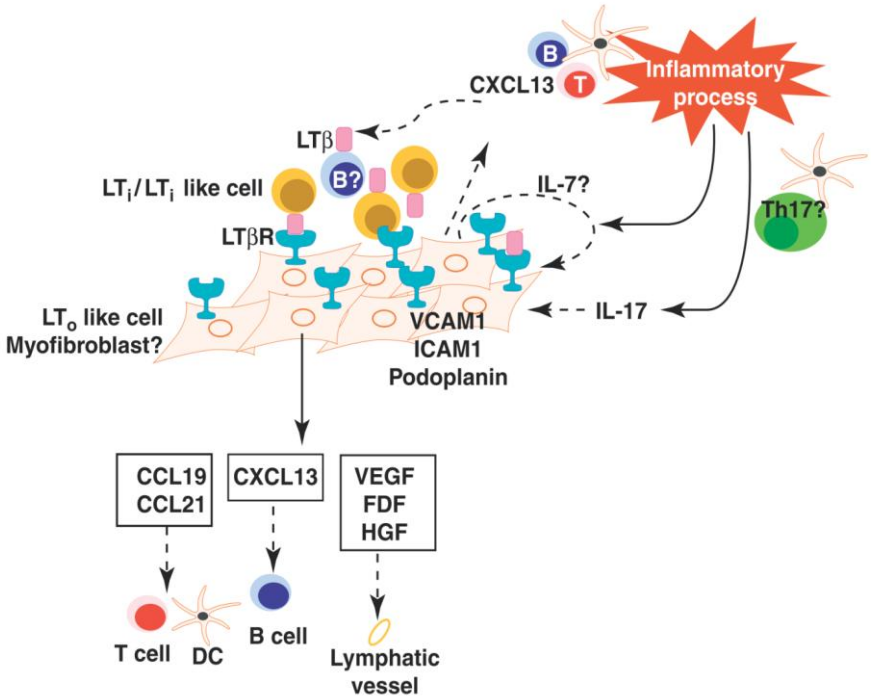


Figure 15 - Formation des structures lymphoïdes tertiaires en conditions inflammatoires

(Neyt *et al.*, 2012)

Bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la néogenèse des structures lymphoïdes tertiaires ne soient pas encore totalement établis, il semble que ces formations, en situation physiologique ou physiopathologique, répondent à la nécessité d'adapter localement la réponse immunitaire. Physiologiquement leur nombre serait programmé et dépendant des cellules de type des iTLs embryonnaires, tandis qu'en situation pathologique leur développement pourrait être infini, impliquant d'autres cellules à identifier.

La maturation structurale des formations lymphoïdes organisées et diffuses qui s'opère en période post-natale dépend en grande partie de stimuli provenant des bactéries symbiotiques. La faible activation des centres germinatifs des formations lymphoïdes dans le chorion des animaux axéniques, élevés sans germe, associée à la réduction du nombre de lymphocytes B et T effecteurs, suggèrent également un rôle du microbiote intestinal dans l'initiation des réponses immunes dans ces compartiments (Macpherson *et al.*, 2001) (Macpherson *et al.*, 2002).

La part respective des formations lymphoïdes secondaires *versus* tertiaires dans l'initiation des réponses immunes intestinales induites par la colonisation microbienne est discutée dans

la littérature et il est par ailleurs suggéré que cette initiation pourrait avoir lieu directement dans le chorion.

2. Initiation des réponses immunitaires

a) Transport et présentation des antigènes bactériens

La première étape dans l'initiation de la réponse immune intestinale est le transport des antigènes de la lumière intestinale vers les structures lymphoïdes présentes dans le chorion (Figure 16).

i- Voies d'entrée des antigènes

A la différence des ganglions mésentériques, les plaques de Peyer et les FLI ne présentent pas de vaisseaux lymphatiques afférents mais possèdent un système d'internalisation particulier des grosses molécules *via* les cellules M (M pour *microfolds*). Ces cellules qui caractérisent l'épithélium qui recouvre les structures lymphoïdes, sont dépourvues de microvillosités et présentent un glycocalyx réduit. Les antigènes de la lumière intestinale peuvent donc plus facilement s'y fixer et transloquer par transcytose. Par ailleurs, le rétrotransport des complexes immuns formés dans la lumière intestinale entre un antigène et une IgA sécrétée (SIgA) peut s'effectuer *via* les cellules M par un récepteur qui serait particulier de ces complexes mais non encore identifié (Mantis *et al.*, 2002). Les propriétés de l'épithélium associé aux plaques de Peyer ont largement contribué au fait que ces structures soient considérées comme le site majeur d'entrée des antigènes luminaux.

Cependant, une autre voie d'entrée des antigènes de la lumière intestinale, indépendante des cellules M, a plus récemment été décrite. Cette voie implique une sous population de CD présents dans le chorion, exprimant le récepteur CX3CR1. Ces CD sont capables de capter les antigènes directement dans la lumière intestinale par l'extension de dendrites au travers de la monocouche épithéliale. Ce mécanisme nécessite l'interaction de CX3CR1 avec son ligand CX3CL1/fractalkine, situé sur les cellules épithéliales. Ces CD forment des jonctions serrées avec les entérocytes adjacents ce qui permet de conserver l'intégrité de l'épithélium intestinal (Niess *et al.*, 2005) (Rescigno *et al.*, 2001).

La mise en place de cette voie d'entrée des antigènes à distance des structures lymphoïdes semble dépendre de la colonisation intestinale bactérienne. En effet, d'une part, l'expression de CX3CL1 par les cellules épithéliales intestinales est régulée par les voies de signalisation

des TLRs MyD88-dépendantes. D'autre part, une étude récente en modèle murin montre que le recrutement dans l'épithélium intestinal des CDs CX3CR1^{+} est induit lors de la colonisation (Chieppa *et al.*, 2006) (Niess and Adler, 2010). Néanmoins, la fonction de ces cellules du chorion spécialisées dans l'échantillonnage des antigènes de la lumière reste discutée notamment car celles-ci ne possèdent pas la capacité de migrer, caractéristique des CD conventionnelles intestinales CD103^{+} (Schulz *et al.*, 2009) (Rescigno, 2011). Par ailleurs, leur potentiel à transmettre le signal antigénique à d'autres cellules adjacentes susceptibles de rejoindre les zones interfolliculaires des structures lymphoïdes n'a pas été démontré. De façon intéressante, une autre sous population de CD, présentant la même capacité de capture d'antigène par émission de dendrites dans la lumière intestinale, a récemment été identifiée dans le dôme des plaques de Peyer (Lelouard *et al.*, 2012). Ces données suggèrent, qu'il existe de nombreuses voies d'entrée des antigènes y compris au sein des structures lymphoïdes qui pourraient dépendre de l'antigène considéré et conduire à l'activation de différentes réponses immunes.

Enfin, la cellule épithéliale intestinale constitue également une autre voie d'entrée des antigènes luminaux puisqu'elle possède la capacité d'internaliser des macromolécules par des mécanismes d'endocytose (Snoeck *et al.*, 2005)

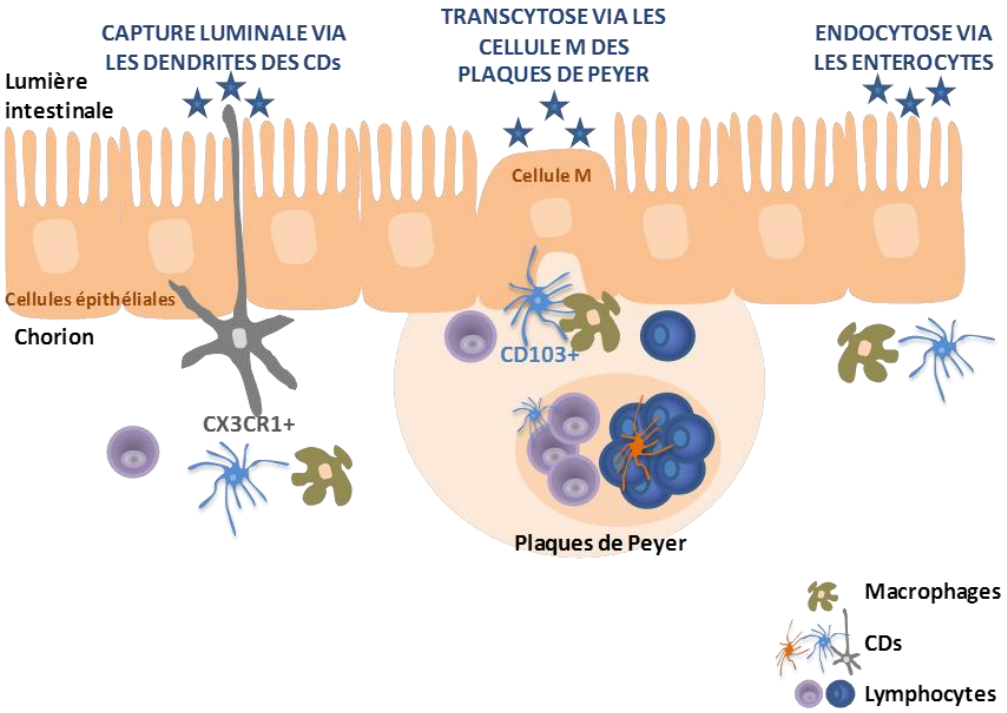


Figure 16 - Principales voies d'entrée des antigènes luminaux

L'importance de la voie d'entrée par laquelle les bactéries interagissent avec le système immunitaire de l'hôte a été étudiée dans un modèle de souris infectées par *Salmonella typhimurium*. L'utilisation de deux souches capables ou non d'envahir les cellules M, a montré qu'en fonction de la voie d'entrée, cellules M et capture par les dendrites des CD CX3CR1$^+$ (Niess *et al*., 2005) *versus* capture seule, la réponse immunitaire induite diffère. Seule la souche capable d'envahir les cellules M est détectée en quantité importante dans les plaques de Peyer et conduit à une réponse IgA fécale spécifique. En revanche, le transport vers les ganglions mésentériques et la rate, et l'induction d'une réponse IgG sérique, est indépendant du caractère invasif de *S. typhimurium* et donc de leur passage à travers les cellules M des plaques de Peyer (Martinoli *et al.*, 2007). Bien que ces résultats concernent une bactérie pathogène, ils illustrent l'importance de la voie d'entrée et du site d'initiation dans la mise en place des réponses immunes intestinales et systémiques, renforçant plus particulièrement la notion du rôle central des plaques de Peyer dans l'initiation des réponses IgA intestinales.

ii- Transport des antigènes dans les structures lymphoïdes

Les antigènes luminaux endocytés par les cellules M sont rapidement pris en charge par les CDs CD103$^+$ présentes dans la zone subépithéliale du dôme des plaques de Peyer. Ainsi activées, ces cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui expriment à leur surface le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 ainsi que la molécule d'adressage CCR7, vont migrer vers la zone T interfolliculaire des structures lymphoïdes. Il a été suggéré que les antigènes captés hors des structures lymphoïdes par les CD CX3CR1$^+$ seraient « transférés » aux CPA professionnelles CD103$^+$ présentes dans le chorion qui pourraient alors migrer directement vers les zones T des ganglions mésentériques (Schulz *et al*., 2009).

b) Réaction des centres germinatifs des structures lymphoïdes

i- Interaction des lymphocytes T activés avec les lymphocytes B naïfs

Une fois dans la zone interfolliculaire des structures lymphoïdes, les CDs chargées en antigène vont activer les lymphocytes T naïfs *via* l'interaction du complexe CMH II/peptide antigénique avec le TCR des cellules T et celle des molécules de co-stimulation CD80/86 avec la molécule CD28 présente sur les cellules T.

Certains lymphocytes T activés vont alors exprimer de façon transitoire CD40 ligand (CD40L ou CD154) à leur surface et interagir avec le récepteur CD40, exprimé de façon constitutive par les lymphocytes B. Cette interaction initie la réaction des centres germinatifs dans les structures lymphoïdes au cours de laquelle les lymphocytes B procèdent à leur différenciation en cellules effectrices et/ou mémoires.

Le rôle particulier de lymphocytes effecteur T $CD4^+$, ou T helper (Th), appelés lymphocytes T Follicular Helper (T_{FH}), dans cette interaction a été suggéré. Les lymphocytes T_{FH} se distinguent des autres populations effectrices de lymphocytes T $CD4^+$ par l'expression à leur surface du récepteur à la chimiokine CXCR5 qui contribue à leur localisation spécifique au sein des follicules B des centres germinatifs, et par leur capacité à interagir avec les lymphocytes B et à les activer, notamment *via* l'expression du CD40L et la sécrétion de l'IL-21 (King *et al.*, 2008). L'origine des populations T_{FH} est discutée, certains auteurs suggérant qu'il s'agit d'une lignée de lymphocytes Th à part entière, distincte des lignées déjà caractérisées Th1, Th2 ou Th17 (Nurieva *et al.*, 2008). Néanmoins, de récentes études ont montré le rôle particulier des lymphocytes T régulateurs (Treg) $CD25^+$ exprimant le facteur de transcription forkhead box P3 ($CD25^+$ $Foxp3^+$), fortement productrices de TGF-β1 nécessaire à l'initiation des réponses IgA intestinales. Ces cellules se différencieraient en T_{FH}, notamment dans les plaques de Peyer (Cong *et al.*, 2009) (Tsuji *et al.*, 2009).

ii- Différenciation des lymphocytes B activés par l'antigène

Au cours de la réaction des centres germinatifs, les lymphocytes B activés subissent des modifications dans les séquences d'ADN des chaînes des Ig sous l'action d'une enzyme, la cytidine désaminase (AID). L'expression d'AID dans les lymphocytes B est induite suite à l'interaction CD40L-CD40 et à l'activation de la voie NFκB dans ces cellules (Muramatsu *et al.*, 2000) (Cerutti, 2008) (Figure 17).

Cette enzyme est nécessaire à la commutation de classe isotypique qui induit le changement de classe des IgM ou IgD pour les classes A, E ou G. Ce changement d'isotype modifie la fonction effectrice des Ig produites sans altérer la spécificité pour l'antigène, acquise antérieurement dans la moelle osseuse. L'enzyme AID est impliquée dans un second processus de différenciation des lymphocytes B activés qui génère des hypermutations somatiques. Ce mécanisme conduit à leur maturation d'affinité, modifiant la spécificité de l'Ig en augmentant son affinité pour l'antigène. Ces deux processus de différenciation, conduisent à la sélection et l'expansion au sein des centres germinatifs de lymphocytes B

produisant des IgA, IgG, ou IgE de haute affinité pour l'antigène (Figure 18) (Xu *et al.*, 2007) (Klein and Dalla-Favera, 2008) (Gatto and Brink, 2010) (Brandtzaeg, 2010).

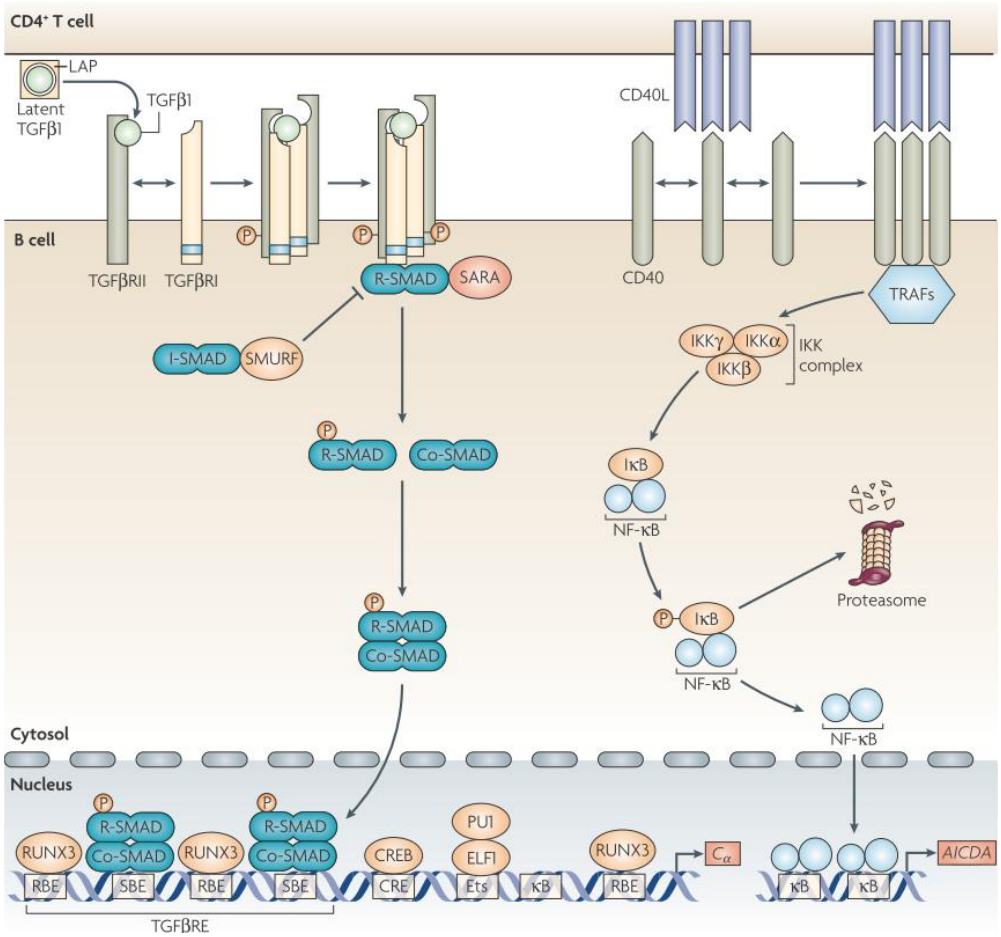


Figure 17 - Voies de signalisation activées par l'interaction des lymphocytes B et T initiant la commutation de classe vers l'isotype A dans les centres germinatifs. (Cerutti, 2008)

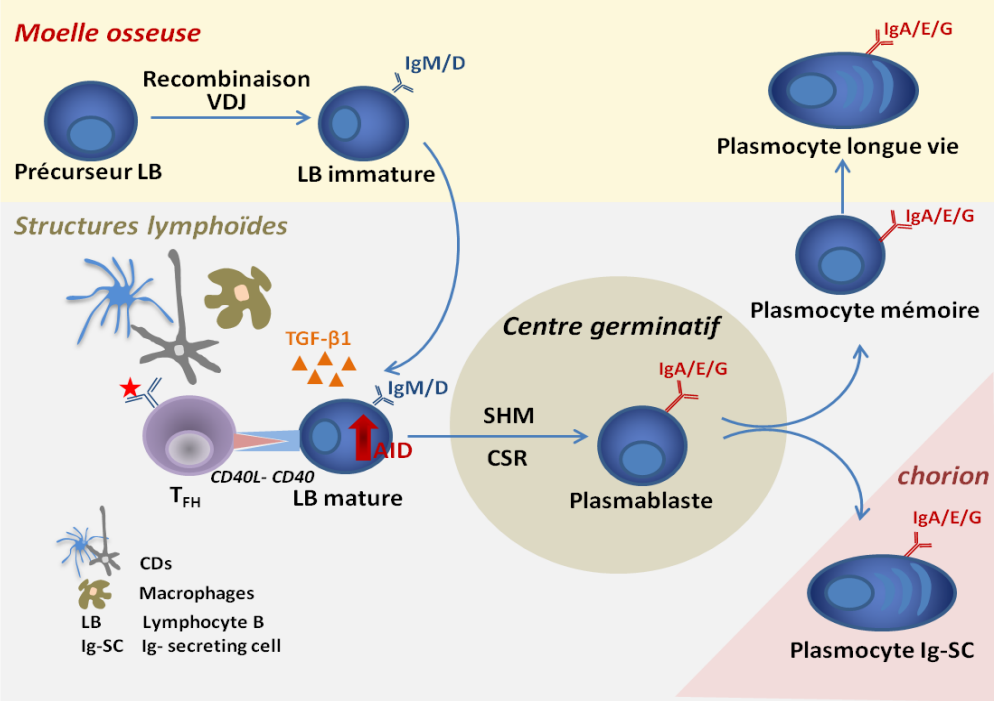


Figure 18 - Schéma de différenciation des lymphocytes B dans les centres germinatifs des structures lymphoïdes

(CSR pour Class-Switch Recombination, SHM pour Somatic Hypermutation)

L'orientation particulière de la commutation de classe des Ig vers l'isotype A au sein des muqueuses, et notamment dans le compartiment intestinal, semblent dépendante de la sécrétion de TGF-β1, notamment produit par les lymphocytes T. Complexé aux récepteurs TGF-βRI/II présents sur les lymphocytes B, le TGF-β1 conduit à l'activation de la voie de signalisation SMAD qui active la transcription de Cα, chaîne lourde des IgA (Cerutti, 2008) (Figure 17). La sécrétion de TGF-β1 est finement régulée et implique la dissociation de la forme active de son complexe latent (latency-associated peptide ou LAP). Les différents signaux moléculaires requis ne sont pas complètement établis mais nécessitent pour partie l'action de métalloprotéases (MMPs) notamment produites par les CD et macrophages environnants. La synthèse de TNF-α par ces cellules participe à réguler la sécrétion des MMPs. Par ailleurs, l'expression du récepteur TGF-βRII à la surface des lymphocytes B est dépendante de la présence de monoxyde d'azote (NO). Ainsi, les CDs sécrétrices de l'enzyme inducible-nitric-oxide-synthase ($iNOS^+$) impliquée dans la synthèse de NO, présentes dans les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques et qui prédominent dans le chorion, pourraient jouer un rôle important dans l'initiation des réponses IgA intestinales. La faible détection de CD $iNOS^+$ chez les souris axéniques ou déficientes pour MyD88, suggère un rôle du microbiote dans l'induction et/ou le recrutement de ces populations à travers les voies de signalisation des TLRs (Tezuka *et al.*, 2007).

La différenciation terminale des plasmablastes en plasmocytes sécréteurs d'IgA (IgA-SC pour IgA-Secreting Cell) implique la coopération des cellules épithéliales, CDs, macrophages, et d'autres cellules de l'immunité innée avec celles de l'immunité adaptative, lymphocytes B et T. Les centres germinatifs des plaques de Peyer reconstituent ce microenvironnement qui assure à la fois la capture des antigènes et le recrutement des cellules immunocompétentes. La structure réticulée qui caractérise ces formations lymphoïdes secondaires, favorise le contact entre les cellules de l'immunité innée présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes B et T. Par ailleurs, à la différence des autres structures lymphoïdes secondaires périphériques, les plaques de Peyer présentent une activation constante de leurs centres germinatifs induite par la présence microbienne intestinale (Fagarasan *et al.*, 2002) (Thurnheer *et al.*, 2003). Ces structures semblent donc plus particulièrement propices à l'initiation des réponses IgA intestinales induites par le microbiote.

iii-Rôle particulier des plaques de Peyer dans l'initiation des réponses IgA intestinales

Les expériences de transfert adoptif de cellules isolées des plaques de Peyer ou isolées des ganglions ou du sang périphérique réalisées chez des lapins irradiés ont montré que les cellules précurseurs des réponses IgA détectées dans le chorion de ces animaux sont originaires des plaques de Peyer (Craig and Cebra, 1971). Le rôle privilégié des plaques de Peyer dans l'initiation des réponses IgA intestinales a été par la suite controversé dans un modèle de souris déficientes en plaques de Peyer, traitées *in utero* avec la protéine de fusion bloquant le développement de ces structures (LTβR-Ig) et immunisées oralement avec de l'ovalbumine. Les souris dépourvues de plaques de Peyer, présentent une réponse IgA intestinale spécifique de l'ovalbumine pourtant fortement altérée chez des souris TNF/LTα double-déficientes chez lesquelles tout développement de structure lymphoïde est alors inhibé (Yamamoto *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent donc qu'en l'absence des plaques de Peyer, d'autres structures lymphoïdes dont le développement est inhibé chez les souris TNF/LTα double-déficientes sont susceptibles de relayer l'initiation des réponses humorales. Les auteurs proposent que les ganglions mésentériques assurent ce relai en l'absence des plaques de Peyer, les structures lymphoïdes isolées, les FLI, n'étant pas encore identifiées à ce moment-là. Par ailleurs, l'ablation chirurgicale des ganglions mésentériques réalisée chez la souris axénique n'altère pas les réponses IgA intestinales observées après colonisation suggérant qu'en présence des plaques de Peyer, ces structures ne semblent pas nécessaires à l'initiation des réponses IgA intestinales (Macpherson and Uhr, 2004b).

Enfin, une initiation des réponses humorales à l'extérieur des structures lymphoïdes, directement dans le chorion intestinal, est suggérée par la détection dans ce compartiment des transcrits d'*Aicda*, gène de la cytidine désaminase (AID), et du transcrit circulaire α-CT, produit suite à la commutation de classe des Ig, dans les cellules $B220^{+}$ IgA^{+} (Fagarasan *et al.*, 2001). Néanmoins, on ne peut exclure que ces réponses soient initiées dans les FLI, identifiées après cette étude.

Une question encore controversée est l'origine des lymphocytes B impliqués dans l'induction des réponses IgA intestinales. Deux types de lymphocytes B sont décrits sur la base de leur phénotype : les lymphocytes B1 IgM^{hi} IgD^{low} $B220^{low}$ $Mac1^{int}$ $CD5^{+/-}$, dits non conventionnels, originaires de la cavité péritonéale, et les lymphocytes B2 $B220^{+}$ IgM^{+} IgD^{+} $CD5^{-}$, dits conventionnels, issus de la moelle osseuse. Le rôle des lymphocytes B1 dans la réponse IgA intestinale a été suggéré chez des souris TCR-déficientes irradiées et

reconstituées avec un mélange de cellules de différents allotypes, provenant de moëlle osseuse de donneur TCR-déficient (souris C57BL/6) en association avec des cellules issues de la cavité péritonéale de souris sauvages (souris BALB/c) (Macpherson *et al.*, 2000). Cependant, dans d'autres modèles de souris immunodéficientes comme les souris SCID, le transfert de cellules B1 ne permet pas de rétablir la réponse IgA intestinale (Bos *et al.*, 2001)

Par ailleurs, chez des souris immunocompétentes, le recrutement de lymphocytes B1 dans le chorion peut être induit soit par lésion chimique de l'intestin soit directement par injection intra-péritonéale de lipide A ou de peptidoglycane, éléments de parois des bactéries. L'étude du mécanisme impliqué suggère que ces signaux bactériens sont capables d'activer les voies de signalisation des TLRs présents sur les lymphocytes B1, régulant ainsi leur migration de la cavité péritonéale vers le chorion (Lotz *et al.*, 2006). Cependant, ces expériences sont menées en conditions inflammatoires associées à une présence bactérienne dans la cavité péritonéale, ce qui pose la question de la relevance physiologique de ce mécanisme. De plus, l'étude menée chez des souris axéniques chimères pour l'allotype des Ig d'origine B1 ou B2, monocolonisées avec différentes bactéries symbiotiques (*B. distasonis*, *M. morganii*, *Segmented Filamentous Bacterium*), présentent toutes une activation des centres germinatifs des plaques de Peyer et une réponse IgA intestinale majoritairement originaire des cellules B2, les cellules B1 contribuant plus particulièrement à la réponse IgM sérique (Thurnheer *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces résultats suggèrent l'existence d'une initiation des réponses IgA intestinales dans des sites extra-folliculaires. Cependant, en conditions physiologiques, le rôle des lymphocytes B1 originaires de la cavité péritonéale dans l'initiation de ces réponses n'est pas démontré. Ces données soulèvent de nouvelles questions quant à l'importance de la réaction des centres germinatifs et des mécanismes T-dépendants associés, dans l'initiation des réponses IgA intestinales induites par la colonisation bactérienne.

iv- *Importance de la réaction des centres germinatifs dans l'initiation des réponses IgA intestinales*

Les souris déficientes pour CD40 sont en effet incapables de développer des centres germinatifs mais présentent une réponse IgA intestinale normale. Inversement, des souris déficientes pour AID, enzyme nécessaire à la commutation de classe isotypique des Ig, présentent un défaut de réponses IgA qui est associé à une hyperplasie des centres germinatifs des formations lymphoïdes intestinales (Bergqvist *et al.*, 2006), (Fagarasan *et al.*, 2002). Ces

données suggèrent l'absence de relation directe entre l'activation des centres germinatifs des structures lymphoïdes et l'initiation des réponses IgA intestinales, bien que ces deux phénomènes soient fortement induits par la colonisation bactérienne. En effet, des données récentes suggèrent que l'induction du changement de classe isotypique des Ig vers l'isotype A implique différents mécanismes dissociables ou non de la réaction des centres germinatifs. Des mécanismes de commutation de classe T-dépendants *via* l'interaction CD40L-CD40, s'établissant lors de la réaction des centres germinatifs, et des mécanismes T-indépendants ne nécessitant pas la réaction des centres germinatifs (Bergqvist *et al.*, 2010).

v- Mécanismes T-dépendants versus T-indépendants

Les arguments en faveur de l'existence de mécanismes T-indépendants à l'extérieur des structures lymphoïdes sont notamment soutenus par le modèle murin déficient pour le facteur de transcription Id2 nécessaire à la différenciation des cellules lymphoïdes progénitrices en cellules iTLs. En effet, ces souris développent une réponse IgA intestinale en l'absence de structures lymphoïdes (Uematsu *et al.*, 2008). De façon remarquable, tous les modèles murins déficients dans la voie de signalisation impliquant le récepteur LTβR (LTα-/-, LTβ-/-, LTβR-/-) présentent une absence de structures lymphoïdes associée à une forte altération des réponses IgA intestinales (Fagarasan *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que la mise en place des réponses IgA intestinales dans les structures lymphoïdes et/ou à distance de ces structures nécessite un signal *via* le récepteur LTβR. L'activation de ce récepteur sur les cellules stromales isolées du chorion chez la souris semble en outre nécessaire à la synthèse des molécules d'adhésion et chimiokines d'adressage permettant le recrutement des lymphocytes B naïfs dans le chorion (Kang *et al.*, 2002). Par ailleurs, des études menées *in vitro* sur des cellules stromales isolées de chorion intestinal murin montrent d'une part que ces cellules expriment les transcrits du TGF-β1 et d'autre part, qu'elles sont capables d'induire la différenciation terminale de plasmablastes $B220^+$ IgM^+ isolés de la rate, en plasmocytes $B220^-$ IgA^+, en présence de lipopolysaccharide (LPS) (Fagarasan *et al.*, 2001). L'implication de la voie MyD88 est fortement suggérée par une absence de réponse IgA détectable dans le chorion intestinal des souris Id2/MyD88 double-déficientes. Ces auteurs identifient le rôle particulier de CD $TLR5^+$ du chorion capables de sécréter l'acide rétinoïque, notamment nécessaire à l'adressage et/ou à la rétention des cellules dans le chorion intestinal (Uematsu *et al.*, 2008). Les bactéries intestinales pourraient alors induire des réponses IgA à distance des structures lymphoïdes directement dans le chorion *via* un mécanisme T-

indépendant impliquant les voies de signalisation des TLRs et certaines CD $TLR5^+$ sécrétrices d'acide rétinoïque.

D'autres expériences menées dans des souris RORγt déficientes, ne développant pas de structures lymphoïdes et présentant une altération des réponses IgA intestinales, ont plus particulièrement permis d'observer la mise en place de mécanismes T-indépendants au sein des FLI (Tsuji *et al.*, 2008). En effet, l'analyse des mécanismes T-indépendants réalisée *in vitro* montrent l'importance de signaux relatifs à la mise en place et à la maturation des FLI. L'activation des cellules stromales impliquées dans la formation de ces structures est augmentée en présence de LPS suggérant une signalisation impliquant les TLRs. Enfin, les macrophages et CD isolés du chorion semblent plus particulièrement impliqués dans la production locale de TGF-β1 sous forme active, par la sécrétion de TNF-α et des métalloprotéases MMP9 et MMP13. Par ailleurs, les cellules stromales, les CD et les macrophages isolés du chorion expriment des niveaux élevés des transcrits de BAFF et de a proliferation-inducing ligand (APRIL), ligands du récepteur Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor (TACI) présent sur les lymphocytes B, capable d'induire l'expression d'AID indépendamment de la liaison CD40L-CD40 (Tsuji *et al.*, 2008).

L'importance de cette voie BAFF/APRIL-TACI, T-indépendante, dans l'initiation des réponses IgA intestinales a été particulièrement décrite chez l'homme pour induire la commutation de classe des IgA_2 majoritairement secrétées dans la partie distale de l'intestin. Le mécanisme associé à cette voie T-indépendante semble impliquer les cellules épithéliales intestinales capables de sécréter la cytokine Thymic Stroma Lymphopoietin (TSLP) après activation par un signal bactérien des PRRs. TSLP active alors la production d'APRIL par les CD environnantes (He *et al.*, 2007). De façon intéressante, des mutations de TACI sont retrouvées chez 8-10% des patients atteints de Déficit Immunitaire Commun Variable (CVID), syndrome marqué par une prédisposition accrue aux infections bactériennes, notamment au niveau des voies respiratoires, accompagnée d'une déficience en Ig sériques (Lee *et al.*, 2008). Néanmoins, l'importance de cette voie T-indépendante APRIL-dépendante reste controversée chez l'homme, d'autant qu'un certain nombre de patients porteurs de mutations sur TACI n'ont pas de modifications des niveaux de sécrétion en Ig intestinales et périphériques. Par ailleurs, de récents travaux suggèrent que les mécanismes APRIL-dépendants pourraient avoir lieu uniquement dans les structures folliculaires, APRIL et

l'enzyme AID n'étant détectées qu'au sein de ces structures sur des biopsies humaines saines (Barone *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces travaux suggèrent que l'initiation des réponses IgA intestinales impliquent des mécanismes T-dépendants et T-indépendants selon le compartiment intestinal considéré, plaques de Peyer ou FLI et chorion respectivement, et potentiellement différents entre l'homme et la souris (Figure 19). Le rôle de la colonisation bactérienne dans l'initiation de ces réponses et les mécanismes impliqués restent à identifier. Néanmoins, il semble que la présence microbienne favorise la mise en place d'un microenvironnement, nécessaire à l'initiation des réponses IgA intestinales, soit par activation de centre germinatif soit en favorisant la mise en place d'autres structures restant à définir.

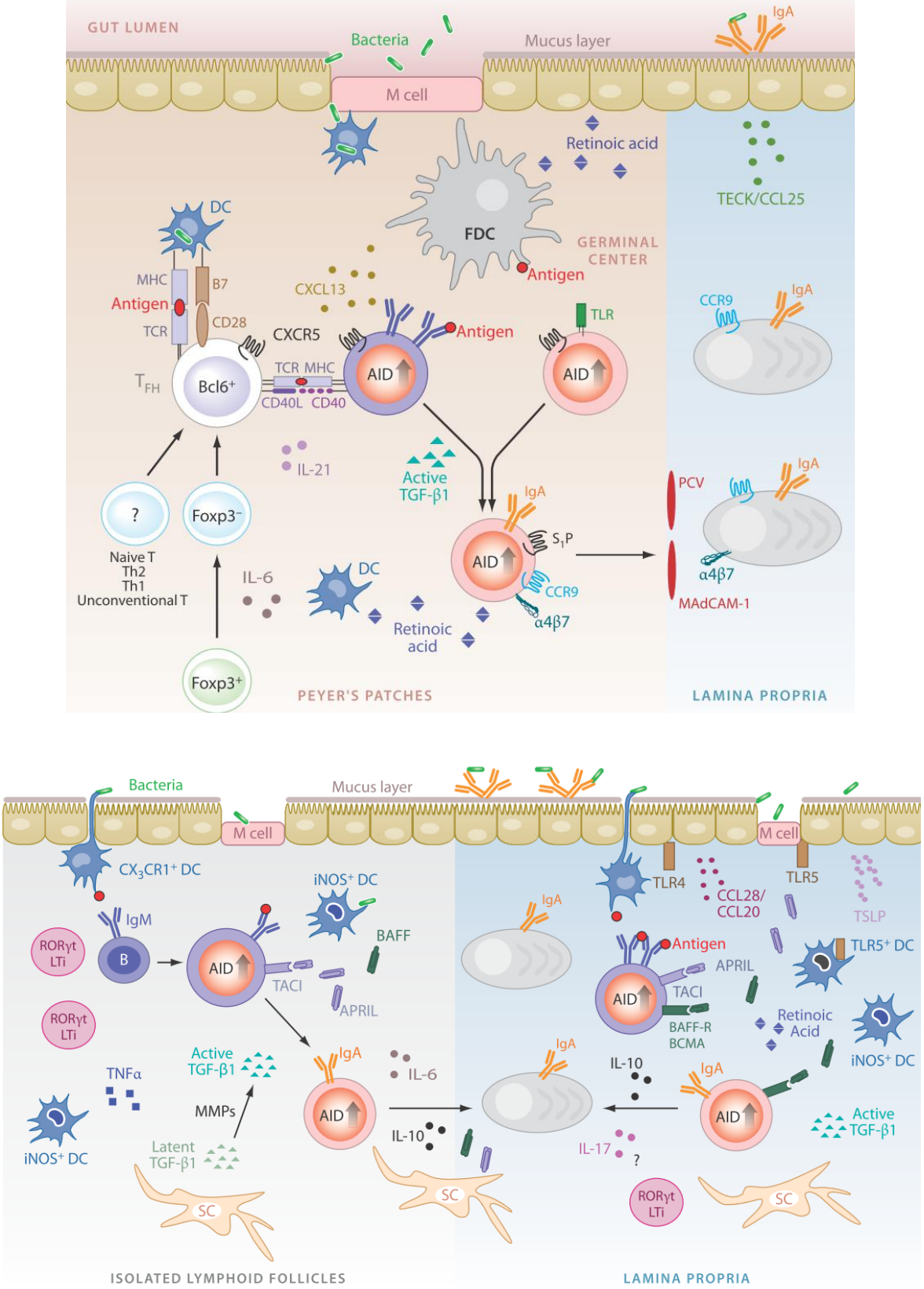


Figure 19 - Représentation schématique des mécanismes T-dépendants et T-indépendants initiant les réponses IgA intestinales dans les différents compartiments Plaques de Peyer, FLI, chorion

(Fagarasan *et al.*, 2010)

c) Migration vers le compartiment effecteur

Les lymphocytes B et T sensibilisés dans les structures lymphoïdes intestinales vont migrer vers les ganglions mésentériques par passage dans le réseau lymphatique sous-séreux. A l'issue de cette étape transitoire les lymphocytes B et T sensibilisés par l'antigène intestinal entament leur différenciation terminale et rejoignent la circulation sanguine par le canal thoracique pour être principalement redirigés vers les sites effecteurs de la muqueuse intestinale (Gowans and Knight, 1964) (Guy-Grand *et al.*, 1974).

Les mécanismes moléculaires qui assurent la sortie des lymphocytes activés des structures lymphoïdes vers le réseau lymphatique ne sont pas complètement élucidés et semblent impliquer la sphingosine-1-phosphate (S1P) dont le récepteur est exprimé à la surface des lymphocytes (Chiba *et al.*, 2006). Les mécanismes d'adressage vers le compartiment intestinal sont en revanche mieux établis et requièrent l'expression sur les lymphocytes B et T de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ et de la molécule d'adressage CCR9. La déplétion en lymphocytes observée dans la muqueuse intestinale des animaux suivant un régime pauvre en vitamine A, ou rétinol, a permis de mettre en évidence le rôle particulier des CDs $CD103^+$, capables de métaboliser le rétinol en acide rétinoïque. Ces CD $CD103^+$ sont alors capables d'induire l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ et de CCR9 sur les lymphocytes activés (Iwata *et al.*, 2004) (Mora *et al.*, 2006). De façon intéressante, la colonisation microbienne semble influencer la migration des CD $CD103^+$ chargées en antigène luminal du chorion vers les ganglions mésentériques, favorisant la recirculation et l'adressage particulier des lymphocytes activés des ganglions vers le compartiment intestinal (Jang *et al.*, 2006) (Niess and Adler, 2010).

L'interaction de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ avec MAdCAM-1 exprimé par l'épithélium des veinules post-capillaires du chorion intestinal, participe à l'entrée des lymphocytes activés du sang vers le tissu. Par ailleurs, la sécrétion de CCL25, produit de manière constitutive par l'épithélium intestinal, favorise le recrutement des lymphocytes dans le chorion intestinal par l'interaction CCL25-CCR9 (Mora, 2008) (Hart *et al.*, 2010).

Les lymphocytes achèvent leur migration et leur différenciation dans la muqueuse intestinale, compartiment effecteur de la réponse immunitaire. L'épithélium intestinal et le chorion représentent les sites effecteurs du système immunitaire intestinal au sein desquels s'établissent les réponses immunitaires innées et adaptatives. Les lymphocytes B devenus majoritairement plasmocytes sécréteurs d'IgA (IgA-SC) s'établissent dans le chorion. Les lymphocytes T muqueux, principalement porteurs d'un récepteur T αβ (TCRαβ) associé au

CD3 pour la reconnaissance de l'antigène, peuplent les compartiments chorioniques et intra-épithéliaux. Je présenterai dans la partie suivante les réponses immunes qui s'établissent en réponse à la colonisation bactérienne au sein des deux compartiments effecteurs, épithélium et chorion et développerai plus particulièrement les réponses immunes adaptatives T et IgA qui s'établissent dans le chorion.

B. Etablissement des réponses immunitaires dans le compartiment effecteur

1. Renforcement de la barrière épithéliale intestinale

a) La cellule épithéliale intestinale

Les cellules épithéliales intestinales sont en première ligne des mécanismes de défense innés dans ce compartiment. Elles sont situées à l'interface hôte-microbiote et jouent un rôle essentiel de barrière physico-chimique notamment *via* la formation de jonctions serrées, la production d'une couche de mucus et la sécrétion des peptides antimicrobiens (Figure 20).

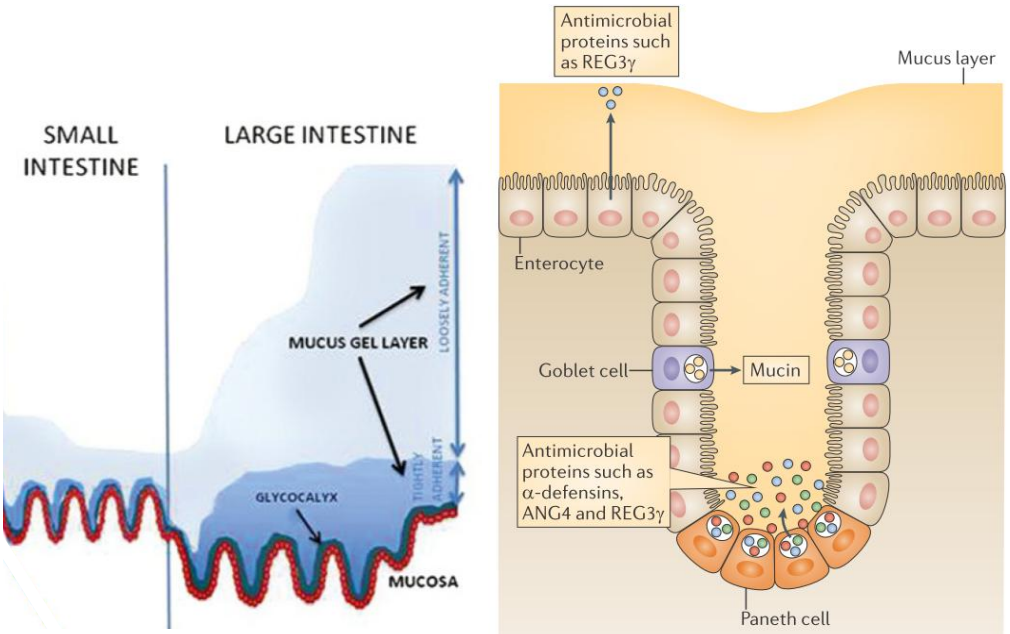


Figure 20 - Structure de la couche de mucus le long de l'intestin et sécrétion des peptides antimicrobiens par les entérocytes et les cellules de Paneth

(Moran *et al.*, 2011) (Gallo and Hooper, 2012)

La mise en place de cette barrière est en partie dépendante de la présence microbienne et son efficacité est renforcée par la colonisation bactérienne.

En effet, la formation des jonctions serrées et la glycosylation des protéines et lipides de surface des cellules épithéliales intestinales qui participent à la constitution du glycocalyx, composante fixe du mucus, sont dépendants de la présence bactérienne (Bry *et al.*, 1996) (Hooper *et al.*, 2001). Le mucus participe au confinement et à la rétention des bactéries dans la lumière intestinale, les maintenant ainsi à distance des cellules épithéliales de l'hôte. L'importance de ce mécanisme a notamment été illustré dans des souris déficientes pour MUC2, une glycoprotéine majeure du mucus sécrétée dans le côlon, qui développent une colite spontanée due au contact des bactéries avec l'épithélium intestinal, associée à une importante pénétration bactérienne au niveau des cryptes (Johansson *et al.*, 2008) (Van der Sluis *et al.*, 2006).

Les cellules épithéliales sont également capables de sécréter des peptides antimicrobiens. Ces molécules bactéricides sont sécrétées dans la lumière intestinale et diffusent au sein de la couche de mucus. Ils assurent ainsi une protection contre les bactéries pathogènes, et participent également au maintien des relations homéostatiques entre l'hôte et son microbiote à la fois en régulant les communautés bactériennes et en les maintenant à distance de l'épithélium intestinal (Hooper and Macpherson, 2010).

La synthèse de peptides antimicrobiens est pour partie induite par le microbiote et requiert l'activation des voies de signalisation des récepteurs de l'immunité innée (Figure 21).
Les souris déficientes pour MyD88 dans les cellules de Paneth présentent une forte diminution de la synthèse des peptides antimicrobiens et une augmentation de la translocation bactérienne détectée dans les ganglions mésentériques (Vaishnava *et al.*, 2008).

Outre la mise en place de mécanismes renforçant l'effet barrière au niveau de la lumière intestinale, ces cellules participent également au renforcement de l'effet barrière au sein de la muqueuse intestinale.

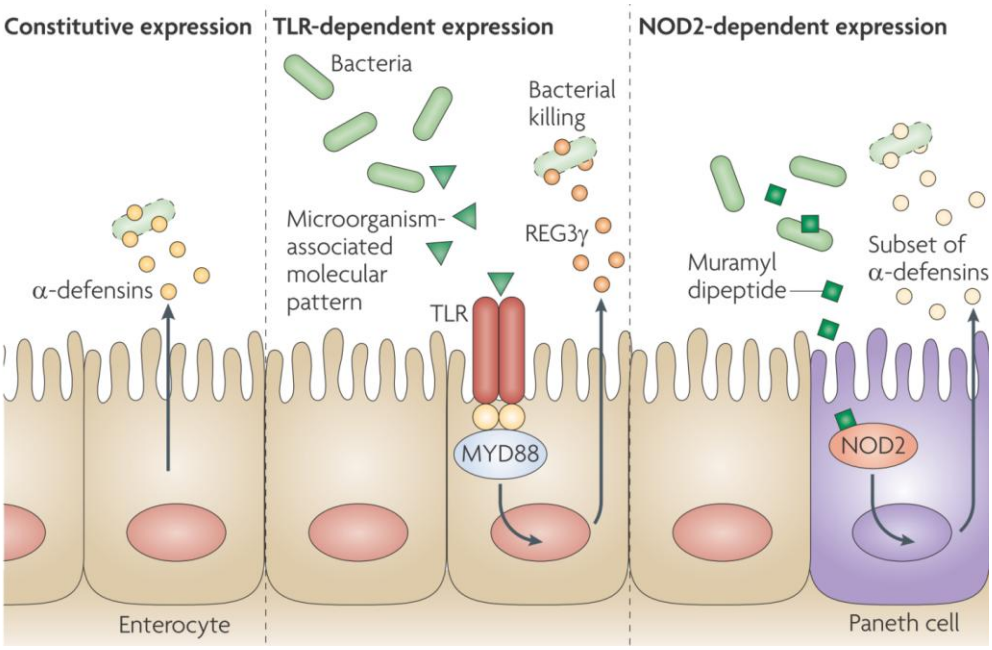


Figure 21 - Régulation de l'expression des peptides antimicrobiens par le microbiote

(Hooper and Macpherson, 2010)

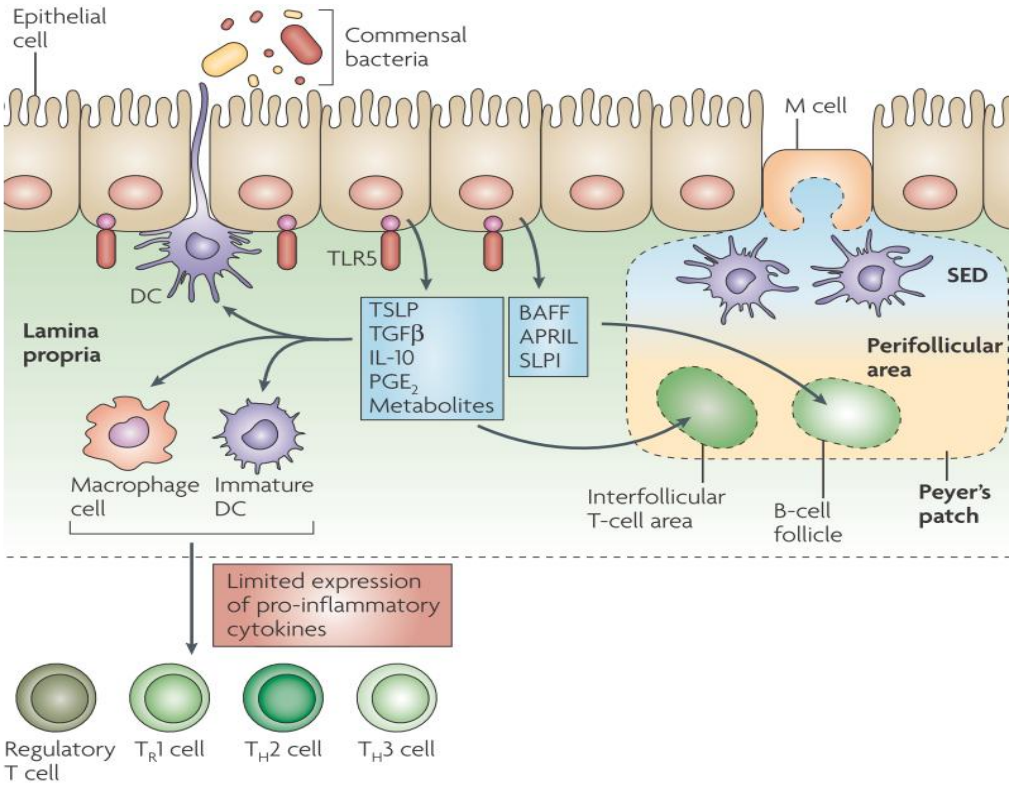


Figure 22 - Conditionnement des cellules immunitaires présentes dans la muqueuse intestinale par les cellules épithéliales intestinales

(Artis, 2008)

En effet, les cellules épithéliales intestinales sécrètent de nombreuses cytokines et métabolites participant au conditionnement des différents types cellulaires présents dans la muqueuse, CD, macrophages, cellules stromales et lymphocytes, les orientant vers un profil régulateur. Le microbiote intestinal contrôle pour partie l'expression de ces cytokines notamment par l'activation des voies de signalisation des récepteurs de l'immunité innée présents sur les cellules épithéliales intestinales (Artis, 2008) (Figure 22).

Par ailleurs, ces cellules épithéliales expriment de façon constitutive le CMH II à leur pôle basolatéral. Elles sont ainsi capables de présenter l'antigène endocyté au niveau du pôle apical, aux lymphocytes T $CD4^+$ du chorion sous-jacent. En conditions physiologiques, ces cellules sont en revanche incapables d'exprimer les molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Cette présentation antigénique en l'absence de molécules de co-stimulation induirait l'anergie des lymphocytes T $CD4^+$, participant à la régulation locale de leur activation. Les lymphocytes intra-épithéliaux T $CD8^+$ présents dans l'épithélium sont également susceptibles d'être activés par les cellules épithéliales qui expriment le CMH I. La nature des antigènes présentés et le rôle physiologique de cette activation ne sont cependant pas complètement déterminés (Snoeck *et al.*, 2005).

b) Les lymphocytes intra-épithéliaux

La majorité des LIE de l'intestin sont des lymphocytes T activés porteurs soit d'un TCRαβ soit d'un TCRγδ, ces derniers pouvant représenter jusqu'aux deux-tiers des LIE retrouvés dans ce compartiment. Une forte proportion des LIE expriment une molécule CD8 sous forme d'un homodimère CD8αα, un récepteur natural killer (NK) et contiennent dans leur cytoplasme des granules à activité cytotoxique. Deux populations de LIE intestinaux se distinguent par leurs caractéristiques phénotypiques, développementales et fonctionnelles (Tableau 4) (Cheroutre *et al.*, 2011).

L'origine extra-thymique de la différenciation des LIE $TCR\gamma\delta^+$ $CD8\alpha\alpha^+$ notamment présentes dans l'intestin de souris nude (*Nu*/*Nu*), athymiques est toujours débattue. Par ailleurs, certaines controverses ont également soulevé une possible différenciation extra-thymique des populations de LIE $TCR\alpha\beta^+$ (Guy-Grand *et al.*, 1991) (Rocha *et al.*, 1991).

Cell type	Characteristics						
	Antigen dependency	IEL phenotype	Frequency of TCRγδ and TCRαβ IELs	Kinetics of accumulation	Development and TCR repertoire	Potential beneficial functions	Potential pathogenic functions
Small intestinal epithelium							
Natural IELs	Self and non-self	$CD2^{-}CD5^{-}CD28^{-}$; $CTLA4^{-}THY1^{-/low}$; $B220^{+/-}CD69^{hi}$; NK receptors (+++++)	$TCR\gamma\delta^{+}$ (+++): – $CD4^{-}CD8^{-}$ (++) – $CD8\alpha\alpha^{+}$ (+++) $TCR\alpha\beta^{+}$ (+++): – $CD4^{-}CD8^{-}$ (+) – $CD8\alpha\alpha^{+}$ (+++)	Present at birth; decrease with age	'Alternative' positive selection for $CD8\alpha\alpha^{+}TCR\alpha\beta^{+}$ IELs in the thymus; oligoclonal TCR repertoire; unknown MHC restriction	Anti-inflammatory responses; antimicrobial responses; tolerance to intestinal antigens; immune regulation; homeostasis of the epithelium	Promote epithelial damage during intestinal inflammation
Induced IELs	Non-self	$CD2^{+}CD5^{+}CD28^{+/-}$; $CTLA4^{+/-}THY1^{hi}$; $B220^{-}CD69^{hi}$; NK receptors (++++)	$TCR\alpha\beta^{+}$ (+++): – $CD8\alpha\beta^{+}$ (+) – $CD8\alpha\beta^{+}CD8\alpha\alpha^{+}$ (+++) – $CD4^{+}$ (+) – $CD4^{+}CD8\alpha\alpha^{+}$ (++)	Absent at birth; increase with age	'Conventional' positive selection in the thymus; oligoclonal TCR repertoire; restricted on MHC class I or MHC class II	Oral tolerance; protective antimicrobial responses	Excessive inflammation and cytotoxicity in response to luminal antigens; exacerbate coeliac disease

Tableau 4 - Principales caractéristiques des populations de LIE du compartiment épithélial intestinal chez la souris

N.B. : la fréquence d'expression est notifiée de faible (+) à forte (+++++)

(Cheroutre *et al.*, 2011)

De façon remarquable, les souris axéniques présentent une réduction des populations de LIE $TCR\alpha\beta^{+}$ et $TCR\gamma\delta^{+}$ par rapport aux souris conventionnelles, suggérant un rôle de la colonisation microbienne intestinale sur l'établissement de ces populations lymphocytaires dans l'épithélium. Cette hypothèse est confortée par le fait que la colonisation de souris axéniques adultes avec un microbiote conventionnel induit l'expansion de LIE $TCR\alpha\beta^{+}$ $CD8\alpha\alpha^{+}$, jusqu'à des niveaux équivalents à ceux retrouvés chez les souris conventionnelles. Une thymectomie pratiquée dans les heures précédant la colonisation n'a pas eu d'effet sur l'expansion des populations de LIE $TCR\alpha\beta^{+}$ $CD8\alpha\alpha^{+}$. Ces résultats suggèrent que la colonisation par un microbiote conventionnel participe à la différenciation extra-thymique des LIE $TCR\alpha\beta^{+}$ $CD8\alpha\alpha^{+}$ mais pas des LIE $TCR\gamma\delta^{+}$ dont le nombre reste constant tout au long de l'expérience de colonisation (Umesaki *et al.*, 1993). Il a été suggéré que ces derniers pourraient déjà être présents dans la muqueuse en période périnatale et participer à la mise en place de mécanismes de tolérance vis-à-vis du microbiote en cours d'établissement. Cette hypothèse n'est pas démontrée à ce jour (Cheroutre *et al.*, 2011). Les mécanismes à l'origine de l'établissement de ces populations de LIE dans l'intestin en réponse à la colonisation bactérienne ne sont pas encore établis. Le rôle potentiel des FLI, structures lymphoïdes néo-induites par la colonisation microbienne en période post-natale, dans la génération extra-thymique de lymphocytes intra-épithéliaux reste controversé (Saito *et al.*, 1998) (Eberl and Littman, 2004) (Suzuki *et al.*, 2000) (Lambolez *et al.*, 2006).

La colonisation microbienne contribue donc à renforcer la barrière immune au premier niveau de l'interface hôte-microbe, l'épithélium intestinal. D'autres réponses immunitaires viennent compléter cette première ligne de défense pour s'établir dans le compartiment sous-jacent, le chorion.

2. Etablissement des réponses immunitaires dans le chorion

a) Réponses humorales médiées par les IgA

i- Principales caractéristiques

Les plasmablastes $B220^+$ IgA^+ et les plasmocytes $B220^-$ IgA^+ qui s'établissent dans le chorion sécrètent des IgA, isotype majoritairement produit au niveau des muqueuses. En effet, les plasmocytes sécréteurs d'IgA (IgA-SC) représentent, chez l'homme comme chez la souris, plus de 90% des plasmocytes sécréteurs du compartiment intestinal. En conditions physiologiques, l'homme produit jusqu'à 3g d'IgA par jour dont la majorité est sécrétée au niveau du tractus digestif (Brandtzaeg, 2010).

A la différence des IgA sériques monomériques, la structure des IgA intestinales est polymérique, principalement dimérique. Les monomères sont associés par une pièce jointe « pièce J » qui facilite le transport des IgA intestinales vers la lumière. Cette pièce J possède en effet la capacité de se lier de façon non covalente au récepteur des Ig polymériques (pIgR), synthétisé par les entérocytes et exprimé au pôle basolatéral. Ce récepteur réalise la transcytose des Ig polymériques (pIg) à travers la cellule épithéliale intestinale. Une partie du pIgR, la pièce sécrétoire, reste associée aux pIg libérées dans la lumière intestinale. Le transport des IgM intestinales pentamériques au travers de l'épithélium est identique à celui des IgA alors que les IgG intestinales diffusent passivement à travers les espaces intercellulaires (Figure 23).

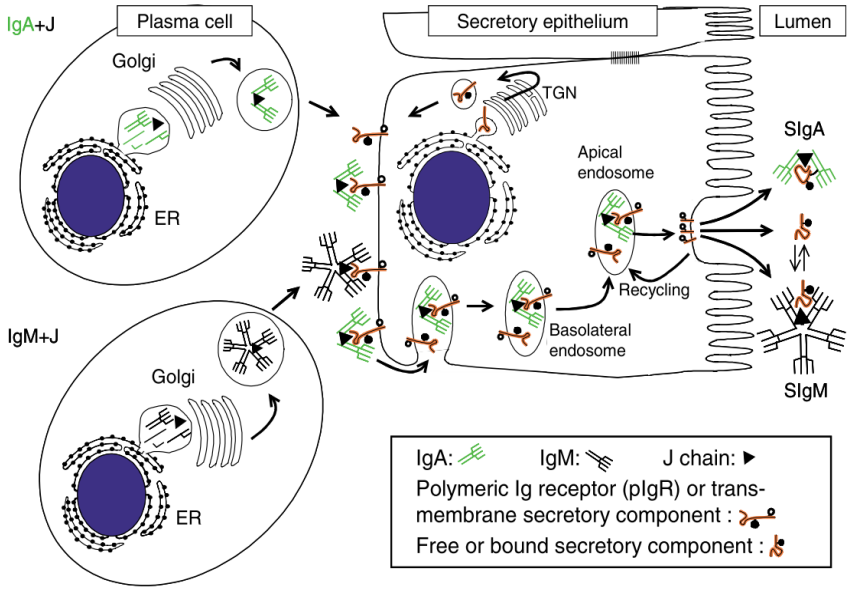


Figure 23 - Transcytose des IgA et des IgM à travers la cellule épithéliale intestinale
(Brandtzaeg, 2003) (TGN : trans golgi network)

Les IgA humaines sont subdivisées en deux classes. Les IgA1, principalement sécrétées dans les parties hautes de l'intestin et aussi retrouvées dans le sérum, et les IgA2, plus résistantes à la protéolyse par les enzymes bactériennes, sécrétées majoritairement dans l'iléon terminal et le côlon. Chez la souris, seule une classe d'IgA est identifiée.

Les IgA intestinales assurent à la fois un rôle de défense immune contre les pathogènes bactériens ou viraux et de tolérance immune en régulant les rapports homéostatiques entre l'hôte et son microbiote (Brandtzaeg, 2003) (Strugnell and Wijburg, 2010).

Ces deux fonctions s'exercent principalement dans la lumière intestinale où les IgA sécrétées dans la lumière (SIgA) sont capables de se fixer sur les bactéries favorisant ainsi leur rétention dans le mucus et limitant d'éventuels contacts avec les cellules épithéliales de l'hôte. Ce mécanisme appelé « exclusion immune » permet l'élimination des complexes SIgA-bactéries par le flux luminal favorisé par l'interaction de la pièce sécrétoire au mucus (van der Waaij *et al.*, 1996) (Phalipon *et al.*, 2002). Les SIgA qui se complexent aux bactéries de la lumière contrôlent à la fois la translocation bactérienne dans la muqueuse intestinale, leur dissémination en périphérie et participent à réguler la densité et la diversité des populations bactériennes luminales (Fagarasan *et al.*, 2002) (Suzuki *et al.*, 2004) (Sait *et al.*, 2007).

Les mécanismes de régulation de l'écologie microbienne par les IgA ne sont cependant pas clairement identifiés. De façon remarquable, la compensation de l'absence d'IgA par une hyperproduction d'IgM chez les souris *Aicda*$^{-/-}$ ne permet ni de contenir les bactéries dans la lumière, ni de réguler l'écologie microbienne et conduit à une hyperactivation des centres germinatifs au niveau intestinal et systémique chez les souris (Suzuki *et al*., 2004). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle clé des IgA dans le contrôle de l'homéostasie avec le microbiote. Par ailleurs, une étude récente utilisant un modèle murin porteur d'une mutation bloquant spécifiquement l'activité de l'enzyme AID qui contrôle les hypermutations somatiques, a permis de souligner l'importance de la diversité du répertoire des IgA produites en réponse à la colonisation bactérienne, dans la régulation des rapports homéostatiques hôte-microbiote. En effet, en l'absence d'IgA hypermutées les bactéries prolifèrent dans la lumière intestinale et transloquent dans la muqueuse (Wei *et al.*, 2011). Ces derniers résultats montrent qu'en conditions physiologiques, la fonction de protection des IgA sécrétées dans la lumière du tube digestif n'est effective que lorsque celles-ci subissent le processus d'hypermutation somatique. Ceci soulève en outre la question du degré d'affinité et donc nécessairement de la spécificité des IgA induites par la colonisation microbienne.

ii- Spécificité des réponses IgA intestinales induites par la colonisation microbienne

Comme suggéré ci-avant, la réponse humorale physiologique est largement dépendante de la colonisation du tractus digestif par le microbiote intestinal (Crabbe *et al.*, 1970) (Macpherson *et al*., 2001) (Figure 24).

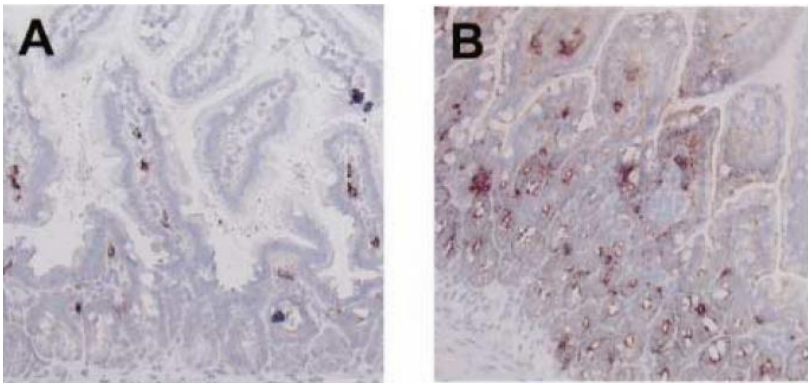


Figure 24 - Coupes histologiques du chorion intestinal de souris axénique et de souris SPF

A : souris axénique, B : souris SPF - Les IgA-SC sont colorées en marron - (Macpherson *et al.*, 2001)

De façon remarquable, il semble que la capacité à induire des SIgA soit redondante au sein du microbiote. En effet, une réponse IgA est observée quelles que soient l'espèce bactérienne ou le groupe d'espèces symbiotiques associées en souris axénique. Néanmoins il semble que

l'intensité des réponses et leur cinétique d'établissement varient en fonction de la ou des bactéries inoculées (Moreau *et al.*, 1978) (Bos *et al*., 2001) (Macpherson, 2006) (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009). De plus, la colonisation conditionnelle de souris axéniques par une bactérie auxotrophe a montré que même une exposition transitoire à un stimulus bactérien est capable d'induire une réponse IgA intestinale relativement stable dans le temps (Hapfelmeier *et al*., 2010).

Une question encore actuellement non résolue est la spécificité de la réponse IgA induite par le microbiote. En effet, la caractérisation qualitative et quantitative de la spécificité des réponses IgA intestinales induites par un microbiote conventionnel s'avère difficile, notamment compte-tenu de la diversité des espèces présentes.

L'étude de la spécificité des réponses IgA a alors été plus particulièrement adressée dans des modèles simplifiés de souris monocolonisées par une bactérie particulière. La détermination de la spécificité des réponses a longtemps été réalisée par western blot et quantifiée par ELISA sur du contenu intestinal. Or, du fait de la formation de nombreux complexes SIgA-bactéries dans la lumière intestinale, il est difficile de conclure quant aux résultats obtenus par ces méthodes. Au contraire, la détection *ex vivo* des SIgA produites dans des surnageants de cultures organotypiques de fragments d'intestin de souris monocolonisées et leur réactivité contre le lysat de la bactérie considérée par RIA a permis de quantifier plus précisément la spécificité des SIgA produits. Il apparaît ainsi que la colonisation par différentes souches symbiotiques induit une réponse IgA spécifique qui représente une part minime de la réponse IgA totale, ne dépassant pas 5%. La plus forte spécificité détectée est obtenue après colonisation avec une souche non invasive de *Listeria monocytogenes*, et la spécificité représente alors 15% de la réponse IgA totale (Bos *et al.*, 2001) (Figure 25). Il est par ailleurs intéressant de remarquer que la spécificité des réponses IgA détectées en modèle d'infection virale se situe entre 10 et 20% de la réponse totale (Talham *et al*., 1999). Ces données suggèrent que contrairement aux microbes pathogènes (virus et bactérie), les bactéries du microbiote semblent inductrices de réponses SIgA peu spécifiques.

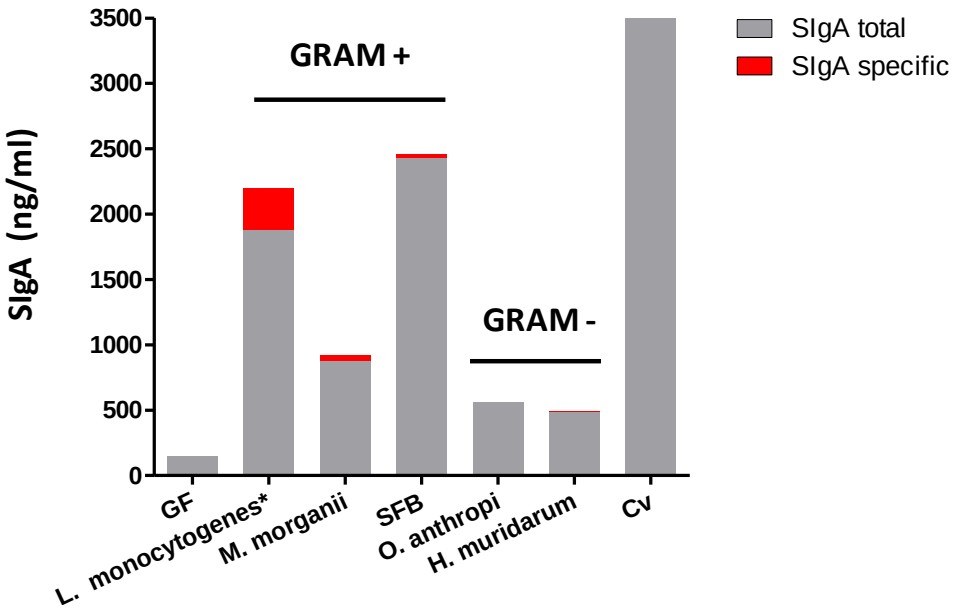


Figure 25 - Détermination de la production de SIgA spécifiques par radioimmunoassay (RIA).

Dosage réalisé sur des surnageants après 7 jours de culture organotypique des fragments intestinaux de souris monocolonisées avec la bactérie indiquée * *L. monocytogenes actA(-)* (d'après (Bos *et al.*, 2001))

En dépit de la difficulté d'appréhender les études de spécificité des réponses IgA en contexte conventionnel, cette question a récemment été adressée chez l'homme. Les tests de réactivité d'une banque d'anticorps monoclonaux, conçue à partir de plasmablastes IgA^+ et IgG^+ isolés de biopsies d'iléon terminal de trois donneurs sains, indiquent que la majorité de ces clones, *in vitro*, répondent de manière antigène spécifique, seuls 25% des ces clones sont polyréactifs. De façon intéressante, il apparaît que la spécificité de cette banque d'anticorps intestinaux humains soit dirigée en partie contre des bactéries du microbiote intestinal, notamment *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Morganella morganii*. Cependant, la proportion des clones concernés semble relativement faible et la proportion de clones à polyréactivité bactérienne, notamment ceux issus des plasmablastes IgA^+, est plus élevée (Benckert *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent l'existence chez l'homme de réponses IgA intestinales spécifiques de bactéries du microbiote. Néanmoins, il semble qu'une part importante de la réponse IgA spécifique « anti-microbiote » soit polyréactive suggérant une faible affinité de ces réponses.

L'analyse du répertoire de la région V des chaînes lourdes (V_H) des IgA de plasmablastes isolés d'intestin de souris conventionnelles, indique que celui-ci est fortement réduit. Ces résultats suggèrent que ces plasmablastes auraient subi pas ou peu de maturation d'affinité,

plaidant en faveur d'une proportion relativement faible de SIgA spécifiques de forte affinité dirigés contre le microbiote intestinal (Stoel *et al.*, 2005). Cependant, une étude plus vaste du répertoire des SIgA du compartiment intestinal nuance ces résultats, soulignant notamment l'importance de la colonisation microbienne intestinale dans l'expansion des clones B hypermutés chez la souris (Lindner *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces données illustrent la difficulté d'établir la spécificité des réponses SIgA intestinales contre le microbiote. Néanmoins, leur faible représentativité pourrait être en partie liée à l'induction par les symbiontes d'une réponse IgA T-indépendante, associée dans la littérature à la production d'Ig polyréactives, potentiellement d'origine B1 (Slack *et al.*, 2012) (Figure 26).

Le rôle des IgA spécifiques dans la régulation des rapports homéostatiques hôte-microbiote a été étudié dans un modèle particulier de souris *Rag1*$^{-/-}$ monocolonisées par *B. thetaiotaomicron* et porteuses d'une tumeur qui sécrète des IgA spécifiques d'un épitope de la paroi de cette bactérie symbiotique. La sécrétion d'IgA spécifiques chez ces souris est associée au contrôle des réponses immunitaires innées induites par le microbiote, notamment celles liées au stress oxydatif (production de NO) (Peterson *et al.*, 2007).
La complexité des interactions entre réponses immunes innées et réponses humorales dans le maintien des relations homéostatiques entre l'hôte et son microbiote est renforcée par les travaux récents de Slack *et al*.. En effet, chez les souris *MyD88*$^{-/-}$, le défaut d'induction de réponses immunes innées locales est compensé par le développement de réponse humorale sérique, notamment IgG, contrôlant la pénétration bactérienne dans les tissus de l'hôte (Slack *et al.*, 2009).

Les mécanismes de régulation des réponses immunes par les IgA qui reconnaissent spécifiquement certaines bactéries du microbiote ne sont pas clairement démontrés mais ils pourraient impliquer le rétrotransport des SIgA complexées à une bactérie intestinale de la lumière, *via* les cellules M des plaques de Peyer. La reconnaissance de ce complexe par les CD du dôme des plaques de Peyer permettrait de réguler négativement les réponses inflammatoires et/ou d'induire des réponses régulatrices. Ce rétrotransport pourrait alors contribuer à la mise en place des mécanismes de tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal mais également d'autres antigènes, alimentaires par exemple (Mantis *et al.*, 2011).

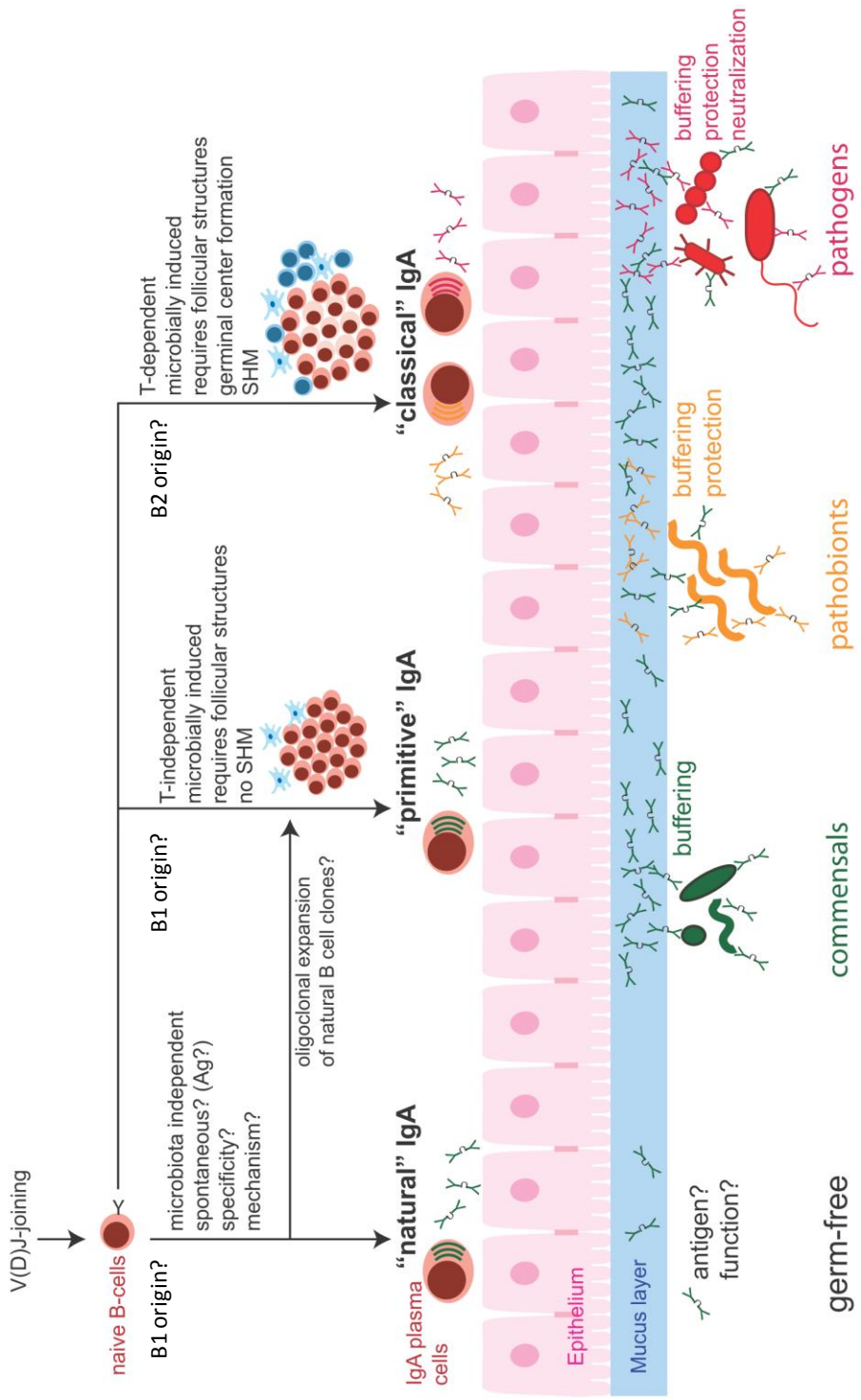


Figure 26 - Différentes réponses IgA intestinales en fonction du type d'antigène

Les IgA produites dans le compartiment intestinal sont réparties en trois catégories, « naturelles » (microbiote-indépendantes), « primitives » (microbiote-dépendantes, T-indépendantes, extrafolliculaires, non hypermutées) et « classiques » (microbiote/pathogène-dépendantes, T-dépendantes, folliculaires, hypermutées). (Slack *et al.*, 2012)

Parallèlement à l'établissement des IgA promotrices d'une réponse régulatrice, se met en place dans le chorion une réponse cellulaire majoritairement constituée de lymphocytes T CD4$^+$ responsables d'une réponse inflammatoire physiologique. La caractérisation des populations T CD4$^+$ qui se mettent en place en réponse à la colonisation microbienne est plus récente et a notamment fait l'objet d'une revue à laquelle je suis associée et qui figure dans la partie « Annexe » du manuscrit (Gaboriau-Routhiau *et al*., 2011).

b) Réponses cellulaires à lymphocytes T CD4$^+$

Les lymphocytes T CD45RO$^+$, activés dans les structures lymphoïdes, rejoignent le chorion de la muqueuse intestinale où elles s'établissent en tant que cellules effectrices ou mémoires.

Chez l'homme comme chez la souris, la spécialisation fonctionnelle des populations effectrices T CD4$^+$ conduit à leur différenciation en lignées « T helper » (Th) présentant des profils de sécrétion de cytokines distincts. Chacune des ces lignées Th est définie et contrôlée par un unique facteur de transcription qui régule la production des cytokines (Figure 27) (Zhu *et al*., 2010).

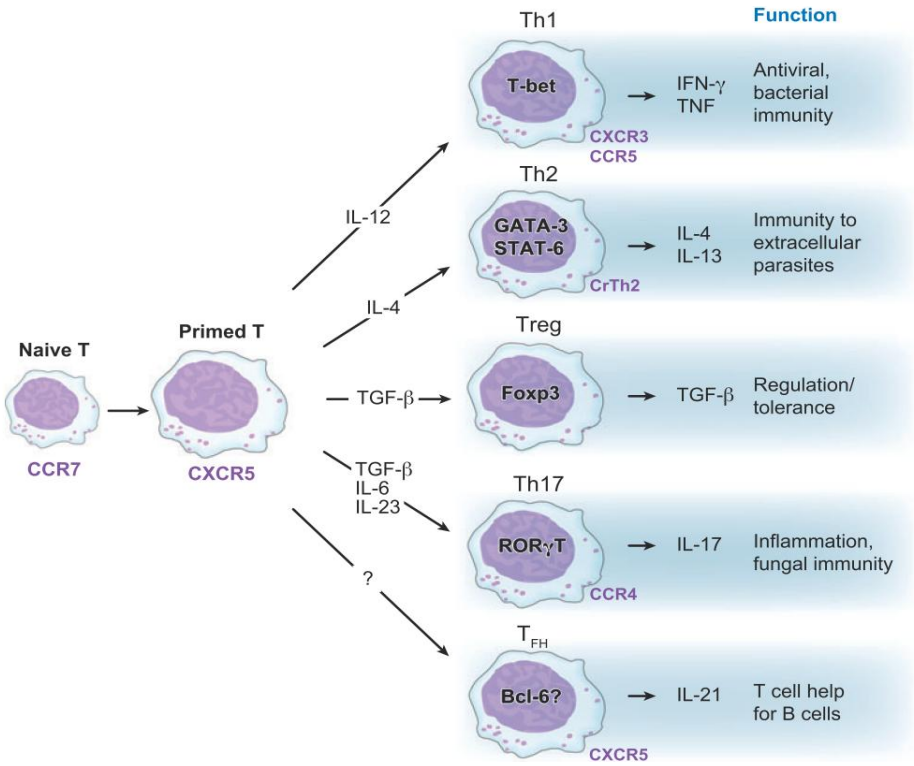


Figure 27 - Diversification des populations effectrices de lymphocytes T CD4$^+$ (King *et al*., 2008)

Au niveau du chorion intestinal, la mise en place des lymphocytes T $CD4^+$ est conditionnée par la colonisation microbienne du tube digestif. En effet, les souris axéniques présentent une réduction du nombre de ces cellules qui est corrigée par colonisation des souris avec un microbiote conventionnel (Macpherson *et al.*, 2001) (Figure 28).

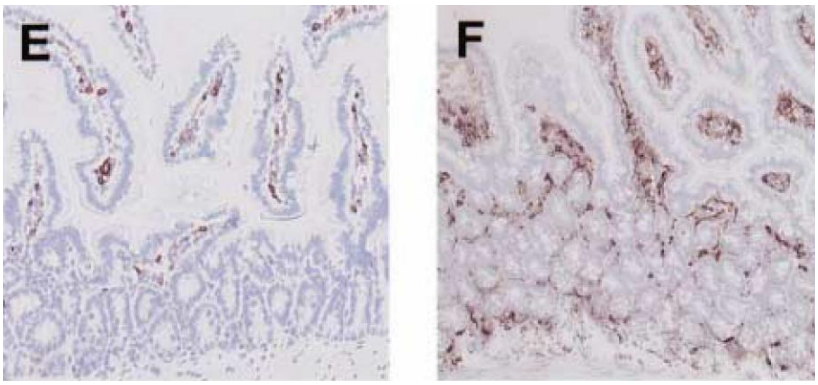


Figure 28 - Coupes histologiques du chorion intestinal de souris axénique et de souris SPF

E : souris axénique, F : souris SPF - Les lymphocytes T $CD4^+$ sont colorés en marron - (Macpherson *et al.*, 2001)

Les profils de sécrétion de cytokines des cellules T $CD4^+$ isolées du chorion chez la souris conventionnelle et chez l'homme montrent une forte capacité à sécréter de l'interferon (IFN)-γ et de l'IL-17. L'orientation préférentielle vers les profils Th1 et Th17, respectivement, reflète la mise en place dans ce compartiment d'une inflammation physiologique. Ces réponses sont régulées par les populations de lymphocytes T $CD4^+$ régulatrices (Treg) capables d'inhiber l'activation des cellules Th1 et Th17, notamment *via* la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β (Geuking *et al.*, 2011) (Maynard and Weaver, 2009). Par ailleurs l'orientation des lymphocytes T $CD4^+$ vers un profil particulier de sécrétion est dépendant des cytokines présentes dans le milieu environnant. Ces cytokines sont alors capables d'activer ou d'inhiber les facteurs de transcription conditionnant ainsi l'orientation Th de la cellule. L'étude de cette plasticité a récemment mis en évidence le rôle particulier des cellules stromales dans la régulation de l'orientation des populations effectrices Th (Huff *et al.*, 2011).

Il apparaît en outre que la stimulation e*x vivo* de ces lymphocytes isolés du chorion par un anticorps anti-CD3 seul induit peu de prolifération cellulaire en comparaison de lymphocytes isolés du sang périphérique, suggérant une signalisation par le TCR réduite (MacDonald, 1999). La co-stimulation avec un anticorps anti-CD28 augmente les capacités de réponse de ces cellules. Ces données suggèrent l'importance du conditionnement local des lymphocytes T $CD4^+$ intestinaux par les autres types cellulaires présents dans le chorion (macrophages et

CD par exemple) et indiquent qu'en l'absence de signaux de co-stimulation celles-ci semblent relativement anergiques en conditions physiologiques.

De façon intéressante, la mise en place de cette inflammation physiologique est dépendante du microbiote intestinal, et il apparaît que la colonisation microbienne de souris axéniques immunocompétentes par un microbiote murin conventionnel est capable de rétablir les différents profils Th1, Th17 et Treg associés à cette inflammation physiologique (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009). Il ressort de récents travaux que la colonisation microbienne intestinale influence également le recrutement et l'activation des différentes populations de CD et de macrophages. Ces cellules de l'immunité innée activées par les signaux microbiens *via* les PRRs, sont capables d'exprimer les molécules de co-stimulation CD80/CD86 mais également de sécréter des cytokines contribuant à orienter les réponses des lymphocytes T $CD4^+$ (Denning *et al.*, 2007) (Maynard and Weaver, 2009). Malgré certaines preuves expérimentales manquantes, il est décrit que les CD $CX3CR1^+$ capables de capter les antigènes bactériens directement dans la lumière intestinale pourraient localement contribuer à orienter les cellules effectrices T $CD4^+$ vers un profil de sécrétion Th17 pro-inflammatoire. Ces CD $CX3CR1^+$ dépourvues de capacité migratoire, seraient par ailleurs susceptibles de répondre à la flagelline ou à l'ATP, inducteur d'une réponse Th17 intestinale chez des souris axéniques (Atarashi *et al*., 2008). Au contraire, les CD $CD103^+$ sensibilisées par des cytokines ou métabolites dans l'environnement muqueux, notamment produits par les cellules épithéliales, orienteraient les réponses T $CD4^+$ vers un profil régulateur (Rescigno, 2011).

D'autres cellules susceptibles d'orienter les réponses effectrices et mémoires T $CD4^+$ et dont la fonction est influencée par la présence microbienne, sont les cellules lymphoïdes innées (ILCs). De façon intéressante, les ILCs partagent certaines caractéristiques développementales et fonctionnelles avec les populations T $CD4^+$ (Figure 29). Néanmoins contrairement aux lymphocytes T $CD4^+$ ces populations sont activées indépendamment de la présentation antigénique par le CMH II, suggérant que ces populations reconnaissent l'antigène de façon non spécifique (Cherrier *et al.*, 2012) (Sonnenberg and Artis, 2012).

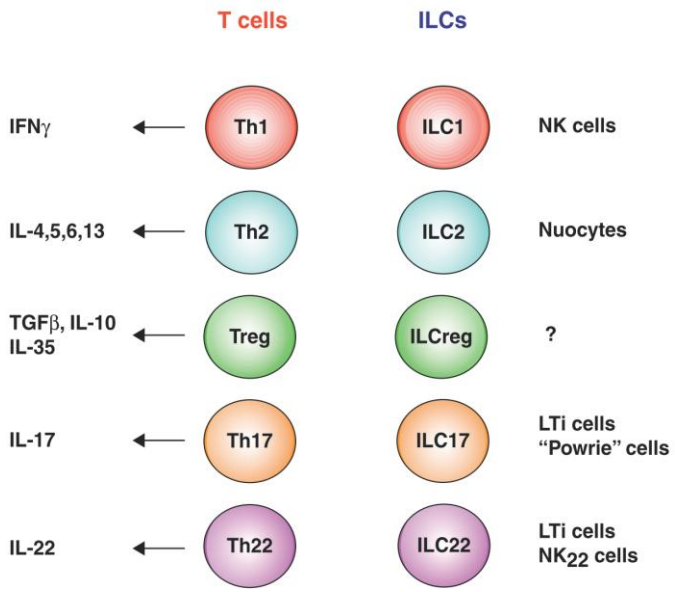


Figure 29 - Parallélisme des lignées Th et des lignées d'ILCs
L'existence des ILCreg est hypothétique (Cherrier *et al*., 2012)

En effet, la différenciation et la sélection thymique des lymphocytes T $CD4^+$ génèrent un vaste répertoire de spécificités du récepteur T qui permet d'assurer la surveillance, en périphérie du thymus, par reconnaissance de l'antigène présenté par le CMH II des CPA. Bien que l'engagement spécifique du TCR en réponse à la colonisation du tube digestif par le microbiote n'ait pas vraiment été démontré, les souris transgéniques exprimant un TCR spécifique d'un antigène absent du microbiote, développent une réponse Th17 normale dans le chorion, suggérant que cette réponse Th17 induite par la présence microbienne est non spécifique (Lochner *et al*., 2011a). Ces résultats nécessitent cependant d'être confirmés dans un modèle de souris non transgéniques afin d'établir la part des mécanismes TCR/CMH II-dépendant dans l'induction des différentes populations Th en réponse à la colonisation bactérienne.

La mise en place de cette inflammation physiologique contrôlée, et notamment l'orientation particulière vers des profils Th17 et/ou Treg dans le chorion des souris, semble dépendre de la bactérie ou du groupe de bactéries qui s'établissent dans l'intestin. Ainsi, la colonisation de souris axéniques avec la fraction cultivable du microbiote fécal murin est incapable de restaurer le vaste profil Th1/Th2/Th17 et Treg observé chez une souris conventionnelle (Gaboriau-Routhiau *et al*., 2009). De façon remarquable, une forte variabilité de la proportion de cellules Th17 est détectée dans l'intestin de souris SPF provenant de fournisseurs différents (Jackson Laboratory *versus* Taconic Farms). La colonisation de souris axéniques

avec le contenu caecal provenant de souris de l'un ou l'autre des fournisseurs conduit aux mêmes profils Th17 distincts, suggérant que ces différences sont dues à une présence microbienne variable entre les deux types de souris SPF (Ivanov *et al.*, 2008). Cette hypothèse a été confirmée par la même équipe dans une étude ultérieure (Ivanov *et al.*, 2009a). La colonisation par différentes espèces de *Clostridium*, induit en outre une plus forte proportion de cellules Treg dans le chorion colique des souris que lorsque celles-ci sont colonisées avec un microbiote SPF (Atarashi *et al.*, 2011).

Bien que les mécanismes à l'origine des différents profils Th/Treg qui se mettent en place dans le chorion en réponse à la colonisation bactérienne ne soient pas encore établis, ils semblent impliquer pour partie les récepteurs de l'immunité innée. En effet, les souris *Myd88*$^{-/-}$*Trif*$^{-/-}$ colonisées par un microbiote standardisé ASF pour « Altered Schaedler Flora », constitué de huit genres bactériens, présentent une réduction des cellules Treg Foxp3^{+} CD103^{+} dans le chorion colique (Geuking *et al.*, 2011).

L'étude des réponses adaptatives qui s'établissent dans le chorion indique que si le profil immunitaire T CD4^{+} est dépendant du type de microbiote, toutes les bactéries testées, seules ou en association semblent, au contraire induire des réponses IgA intestinales. En effet la colonisation de souris avec un microbiote isolé de selles humaines est effectivement capable d'induire un niveau relativement élevé de SIgA détectées dans les fèces. Au contraire, le profil transcriptomique réalisé sur biopsie iléale chez ces souris humanisées fait apparaître qu'une majorité des gènes induits sont associés au métabolisme. Au contraire, ceux associés à l'immunité sont faiblement induits (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009).

A la difficulté de caractériser la nature, la fonction et les mécanismes cellulaires et moléculaires régissant l'ensemble des réponses immunitaires qui se mettent en place dans les différents compartiments de la muqueuse intestinale en réponse à la colonisation microbienne, s'ajoute celle d'identifier les espèces bactériennes particulièrement promotrices de ces réponses. Ces recherches reflètent la complexité du dialogue mutualiste qui s'est établit entre l'hôte et son microbiote au cours de leur longue coévolution et constituent un véritable défi que tente de relever de nombreuses équipes conscientes des enjeux scientifiques et médicaux associés.

Parameter	Evidence from germ-free compared with conventionally reared animals	Evidence from ex-germ-free animals
Secondary lymphoid tissue development	Lymphatic tissue and lymphatic system underdeveloped Peyer's patch number and cellularity reduced Reduced ILFs mLNs smaller and less cellular, with reduced germinal centers	Recovery of lymphatic tissue and the lymphatic system upon conventionalization of germ-free animals Recovery of mLN size and cellularity upon conventionalization of germ-free animals Peptidoglycan from gram-negative bacteria necessary and sufficient to induce ILF genesis via NOD1 in epithelial cells
Macrophage development	Decreased surface expression of macrophage activation markers in the intestine Intestinal macrophages present at high levels from birth Reduced monocyte/macrophage numbers in the ileum and spleen	Recovery of ileum and spleen monocytes/ macrophages upon monoassociation of germ-free mice with *L. acidophilus* and *L. reuteri*
DC development and function	Normal expression of surface markers and ability to stimulate T cell proliferation by DCs from the spleen and mLNs Reduced DCs in the intestine	Recruitment of DCs to the lamina propria upon monoassociation of germ-free animals with *E. coli* Lamina propria APCs stimulated by ATP to produce IL-6, IL-23, and TGF-β, resulting in Th17 cell differentiation
LTi/NK cell development	Reduced NK-22 cells	LTi cells and NK-22 cells upregulate IL-22 production shortly after birth

Tableau 5 - Impact de la colonisation microbienne sur le développement structural et fonctionnel de l'immunité innée (Hill and Artis, 2010)

Parameter	Evidence from germ-free compared with conventionally reared animals	Evidence from ex-germ-free animals
B cell development and function	Reduced numbers of plasma cells in small intestine Decreased IgA production in small intestine Reduced systemic germinal centers and plasma cells Low systemic immunoglobulin levels Decreased IgM and IgG response to DNP-BSA Normal IgM response to sheep red blood cells or phosphorylcholine Normal IgM and IgG response to DNP-lys-Ficoll Delayed and reduced primary antibody titers against heat-killed *E. coli* Increased antibody response to ferritin and DNP-Ficoll Increased IgE-bearing B cells in Peyer's patches	Recovery of intestinal IgA upon conventionalization of germ-free animals Recovery of systemic germinal centers and plasma cells upon conventionalization of germ-free animals Recovery of systemic immunoglobulin levels upon conventionalization of germ-free animals
Th17/Treg cell development and function	Reduced Th17 cells in the small intestine Increased Th17 cells in the large intestine Reduced Foxp3 mRNA in $CD4^+$ T cells from the mLNs Selective reduction in the percentage of $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ T cells in the mLN $CD4^+$ T cell proliferation not suppressed as well in vitro by Tregs from the mLN Less IL-10 produced by Tregs from the mLN disease not protected as well by Tregs Increased frequency of $CD4^+Foxp3^+$ in the small intestine Similar frequency of lamina propria $CD4^+Foxp3^+$ T cells from the colon	Monoassociation of germ-free mice with cytophaga-flavobacter-bacteroidetes rescues Th17 cell defect

Parameter	Evidence from germ-free compared with conventionally reared animals	Evidence from ex-germ-free animals
Th1/Th2 balance cell development and function	Decreased delayed-type hypersensitivity in response to sheep red blood cells Reduced αβ TCR–bearing IEL Decreased response to T cell mitogens Normal response to Ova but reduced oral tolerance Reduced tolerance to Th2 antigens Normal graft-versus-host reaction Reduced T cell numbers in the jejunum	Recovery of response to T cell mitogens upon conventionalization of germ-free animals Recovery of αβ TCR-bearing IELs upon conventionalization of germ-free animals Recovery of jujunal T cells upon mono-association with *E. coli* Recovery of oral tolerance upon conventionalization of germ-free or antibiotic-treated animals Recovery of long-term Th2-skewed immunological memory upon Kanamycin treatment through oral inoculation with *Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus acidophilus*
$CD8^+$ T cell development and function	More diverse repertoire of $CD8^+$ IELs in germ-free rats , no difference in mice Reduced number and cytotoxicity of $CD8^+$ IELs Delayed development of IELs	Recovery of $CD8^+$ IEL diversity upon conventionalization of germ-free animals Recovery of number and cytotoxicity of $CD8^+$ IELs upon conventionalization of germ-free animals Reduced numbers of naive, splenic $CD8^+$ lymphocytes in animals colonized with nonpathogenic *Clostridium* sp. compared with conventionally reared controls

Tableau 6 - Impact de la colonisation microbienne sur le développement structural et fonctionnel de l'immunité adaptative (Hill and Artis, 2010)

PARTIE III

LA SFB :

ROLE PARTICULIER DE LA BACTERIE SEGMENTEE FILAMENTEUSE DANS LA MATURATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

La longue coévolution entre l'hôte et son microbiote a conduit à la sélection d'une majorité d'espèces bactériennes augmentant les capacités métaboliques de l'hôte. De façon remarquable, la colonisation de souris par un microbiote fécal humain conduit à l'activation majoritaire des voies métaboliques détectées en transcriptomique chez celles-ci, suggérant que les bactéries compétentes ne sont pas spécifiques de l'hôte concerné et que cette capacité est transmissible entre hôtes de différentes espèces. Paradoxalement, il semble qu'au cours de la sélection des espèces bactériennes qui colonisent l'intestin, seul un nombre restreint de bactéries a été conservé pour leurs fortes propriétés immunostimulantes, nécessaires à promouvoir la maturation complète du système immunitaire de l'hôte. Cette capacité n'est pas transmissible entre hôtes de différentes espèces et pour le moment une seule bactérie responsable de cette maturation a été identifiée chez la souris, la bactérie segmentée filamenteuse, ou SFB (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009) (Chung *et al.*, 2012).

A. Caractérisation de la SFB : de l'observation microscopique au séquençage

1. Une morphologie segmentée filamenteuse

En 1849, Joseph Leidy (1823-1891), un paléontologue américain, fervent utilisateur du microscope et passionné par l'étude des parasites, était curieux du régime alimentaire des termites. Il observa alors leur contenu intestinal au microscope. A son plus grand étonnement il constata la présence de nombreux « parasites » de morphologie très particulière (longs filaments) qu'il considéra comme étant des endophytes, issus des végétaux digérés par les termites, qu'il classifia comme *Arthromitus intestinalis*. Ces travaux d'observation ont été publiés en 1881 (Leidy, 1881) (Figure 30).

Un siècle plus tard, différentes équipes ont plus précisément observé et caractérisé ce « composant » de la lumière intestinale chez différentes espèces animales, poulets et rongeurs principalement. La capacité de cet organisme à s'attacher aux cellules épithéliales intestinales lui a valu une attention très particulière. (Hampton and Rosario, 1966) (Reimann, 1965) (Eyssen *et al.*, 1965) (Davis and Savage, 1974) (Chase and Erlandsen, 1976; Snellen and Savage, 1978). Par microscopie électronique, les chercheurs ont tenté de mieux définir sa nature, son habitat et sa morphologie. Ils constatent qu'il s'agit d'une bactérie à coloration de Gram positive, associée à l'épithélium intestinal par un appendice en forme d'aiguillon. Ils

observent différentes morphologies de cette bactérie dont la longueur est variable, allant de 1µm à 1000µm. Des formes courtes, et des formes plus longues, filamentaires, divisées en segments par des septa. Certains segments contiennent une ou plusieurs endospores à la structure cellulaire propre (Figure 31).

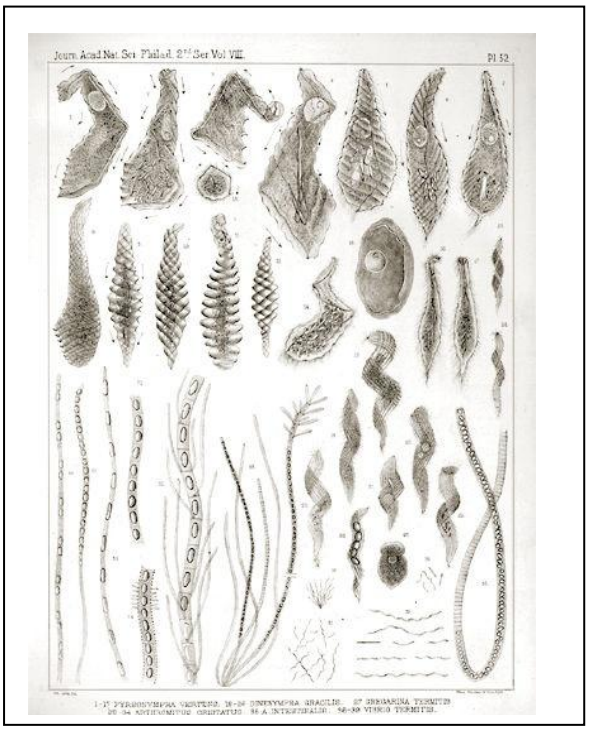


Figure 30 - Lithographie de J. Leidy représentant les parasites observés dans le contenu intestinal de termites

N.B. : La SFB figure en bas à gauche (Leidy, 1881)

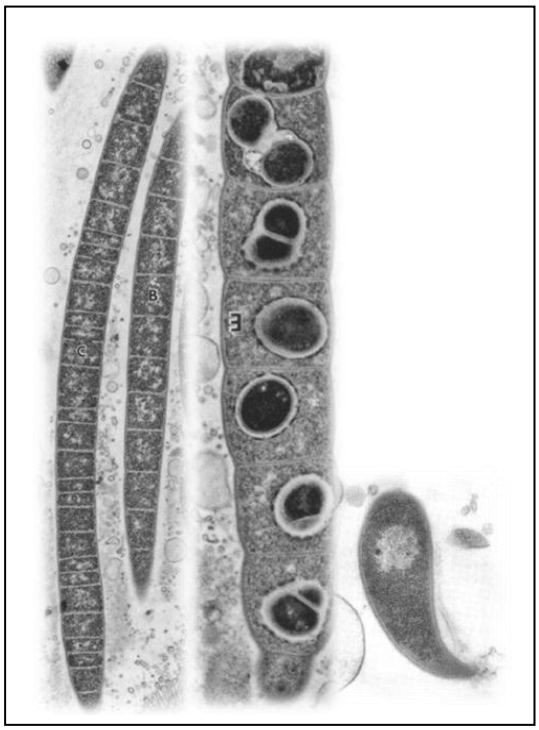


Figure 31 - Différents morphotypes de la SFB observés par microscopie électronique

(Chase and Erlandsen, 1976)

Ces endospores peuvent donner lieu au développement de nouveaux corps bactériens ou être libérés sous forme de spores qui contribueront à la dissémination de la souche. Ce type de reproduction par formation d'endospores multiples, est observée chez d'autres bactéries comme *Bacillus subtilis*, notamment présente dans le sol, et assure une bonne dispersion bactérienne (Angert, 2005). La SFB est donc capable de coloniser rapidement et de façon continue l'épithélium intestinal iléal, site majeur d'implantation de la bactérie. Cette propriété permet à la SFB de faire face au rapide renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal (3 à 5 jours chez l'homme et environ 2 jours chez la souris).

2. Caractéristiques génétiques

De façon remarquable, il semble que cette bactérie soit conservée au cours de l'évolution, ayant été décrite en premier lieu chez le termite puis plus récemment chez les grands singes (Leidy, 1881) (Prakash *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'observation par microscopie de bactéries morphologiquement ressemblantes à la SFB a été réalisée chez une grande variété d'hôtes (Tableau 7) (Klaasen *et al.*, 1993a).

VERTEBRATES					
Animal Species	**Intestinal Region**	**Year**	**Animal species**	**Intestinal Region**	**Year**
Mouse	Forestomach	1974	Frog (tadpole)	Rectum	1957
	Ileum	1962	Toad (tadpole)	Intestine	1957
Rat	Forestomach	1987	Calf	Intestine	1997
	Ileum	1965	Horse	Ileum	1995
Guinea pig	Caecum	1990	Human	Ileum	1993
Dog	Ileum	1977	Rabbit	Ileum	2000
Cat	Ileum	1985	Pig	Ileum	1991
	Oral cavity	1988	INVERTEBRATES		
Sheep	Ileum	1985	Myriapod	Small intestine	1957
Zebra	Large intestine	1987		Large intestine	1957
Vervet monkey	Ileum	1991		Rectum	1957
Chicken	Ileum	1971	Termite	Small intestine	1881
	Caecum	1978		Large intestine	1881
Domestic duck	Small intestine	1925	Beetle	Intestine	1881
	Caecum	1925	Isopod	Intestine	1990
			Cockroach	Large intestine	1881

Tableau 7 - Tableau récapitulatif de l'observation par microscopie de bactéries de morphologie ressemblante à la SFB chez différents hôtes et année d'observation (Klaasen *et al.*, 1993a)

La difficulté majeure pour étudier la SFB est qu'elle n'est toujours pas cultivable par les différentes méthodes de culture bactérienne. Néanmoins, grâce à ses propriétés d'adhésion à la muqueuse intestinale et à former des spores, il a été possible de purifier cette bactérie chez des rongeurs (souris et rats) axéniques et ainsi de développer des modèles animaux monocolonisés par la SFB. L'entretien de la souche se fait par passages successifs en rongeur axénique (Klaasen *et al.*, 1991a). La classification phylogénétique de la SFB a été réalisée après isolement de la bactérie de contenu intestinal de souris monoassociées et analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S (Snel *et al.*, 1995).

Récemment, le séquençage du génome entier de la SFB, a notamment permis de confirmer son rattachement à l'ordre des *Clostridiales*, au subphylum des *Clostridium*, et au genre *Candidatus arthromitus* (Kuwahara *et al.*, 2011) (Prakash *et al.*, 2011) (Sczesnak *et al.*, 2011) (Pamp *et al.*, 2012). Néanmoins, cette classification sera probablement amenée à évoluer du

fait d'une récente publication identifiant la SFB d'intestin de termite comme appartenant à la famille des *Lachnospiraceae*, distincte de celles des *Clostridiaceae* à laquelle la SFB des rongeurs est rattachée. De plus il a été suggéré que la seule comparaison des séquences des gènes de l'ARNr 16S ne suffit pas à l'évaluation des caractéristiques évolutives d'une espèce bactérienne, qui requiert la comparaison des séquences de plusieurs gènes conservés dans l'évolution des procaryotes (Peterson and Cardona, 2010; Thompson *et al*., 2012). Toutefois, l'étude comparative des séquences de l'ARNr 16S de SFB isolées de différents hôtes semble indiquer que la SFB murine est plus proche de celle isolée de rat que de la SFB isolée du poulet domestique (Snel *et al.*, 1995) (Prakash *et al.*, 2011) (Figure 32).

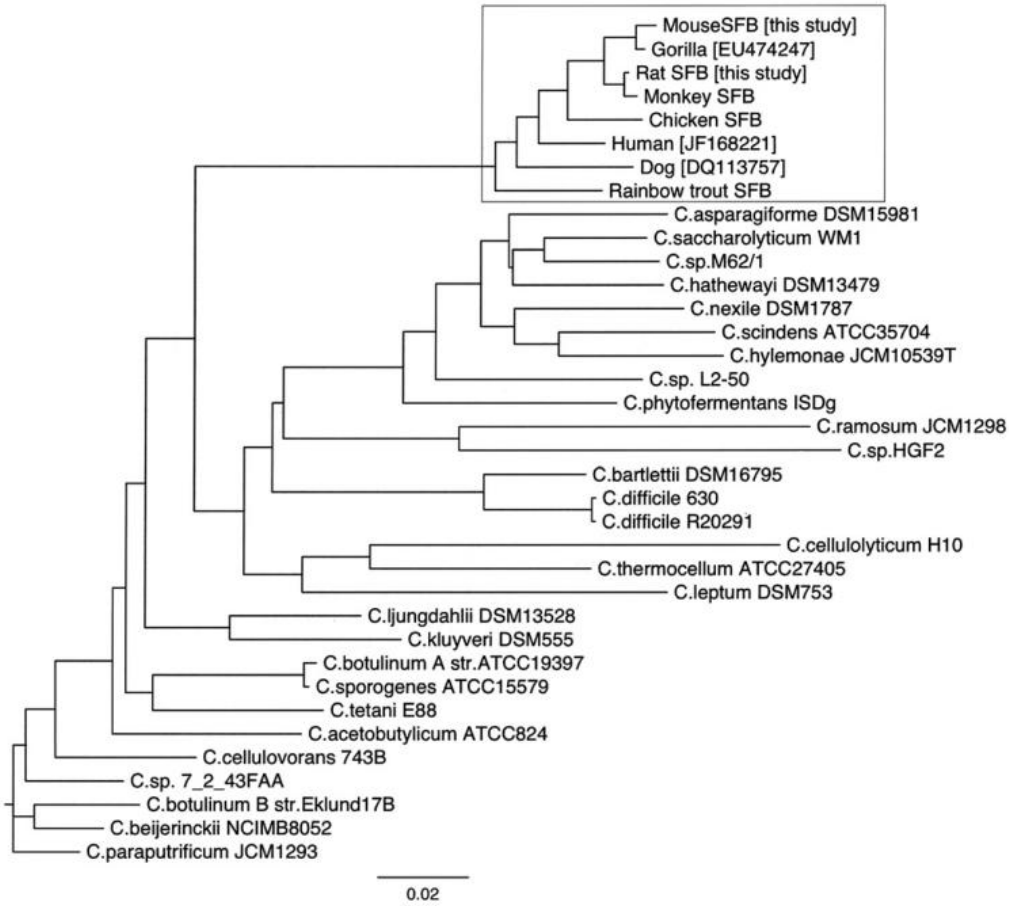


Figure 32 - Arbre phylogénétique rattachant la SFB au groupe *Clostridium*.

Cet arbre est réalisé d'après les séquences des gènes de l'ARNr 16S de SFB isolées chez le rat et la souris, comparées à celles publiées chez différents hôtes et aux séquences de 28 espèces de *Clostridium* publiées

N.B. : la SFB humaine est détectée dans une banque d'ADN bactérien isolé à partir de peau humaine (Prakash *et al.*, 2011)

Malgré la proximité phylogénétique observée entre la SFB de rat et celle de souris, des expériences de transplantations croisées de microbiote entre rat et souris, d'un donneur conventionnel vers un receveur axénique, ne permet pas l'implantation de la SFB. Celle-ci ne s'établit que lors du transfert de microbiote entre animaux de même espèce, suggérant que la SFB est spécifique d'hôte. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que cette spécificité d'hôte pourrait être liée à la présence d'un récepteur particulier permettant son attachement à la muqueuse intestinale de l'hôte, nécessaire à la survie de la bactérie (Tannock *et al.*, 1984).

Par ailleurs, le séquençage du génome de la SFB a permis d'établir la relative petite taille de son génome. Celui-ci est constitué d'un chromosome bactérien circulaire de 1,6 millions de paires de bases (Mpb). Cette taille est relativement petite par rapport à d'autres génomes, comme celui de *E. coli* qui comprend 4,6 Mpb, et représente le plus petit génome séquencé au sein des *Clostridia*, prédictif d'environ 1400 protéines. Il montre près de 76% d'homologies de séquences codantes avec les génomes des *Clostridia* séquencés, la différence de profil étant majoritairement due à la plus faible taille du génome de la SFB. Néanmoins, 8,6% des protéines prédites seraient spécifiques de la SFB.
La petite taille de ce génome et son faible taux en bases G-C d'environ 30%, caractéristiques de symbiontes obligatoires, et le nombre prédictif de gènes, positionnent la SFB à l'interface des symbiontes obligatoires et facultatifs (Sczesnak *et al.*, 2011) (Prakash *et al.*, 2011).

Cependant, une question qui n'est toujours pas résolue concerne l'existence de la SFB chez l'homme. En effet, peu d'arguments publiés à ce jour sont en faveur de l'existence d'une SFB humaine. L'analyse par microscopie optique de biopsies ou de segments entiers d'iléon provenant de 6 patients adultes (20 à 67 ans) présentant des polypes, une recto-colite hémorragique ou la maladie de Crohn, a permis d'observer des bactéries de morphologie ressemblante à la SFB chez un seul des patients et uniquement dans une biopsie saine de ce patient (Figure 33) (Klaasen *et al.*, 1993a).

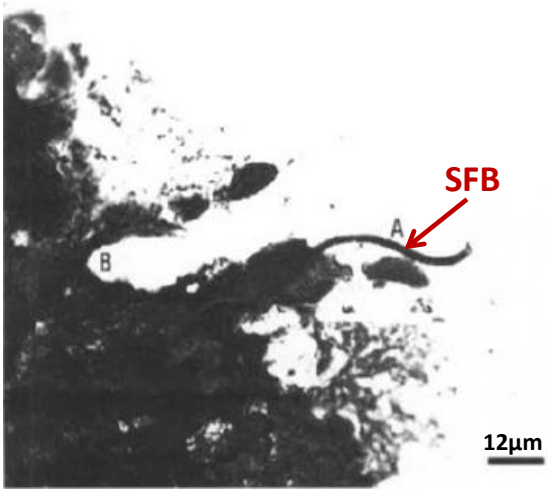


Figure 33 - Image d'observation réalisée par microscopie optique de la SFB sur une biopsie iléale humaine (Klaasen *et al.*, 1993a)

Plus de 94% d'homologies ont été détectées entre les séquences des gènes de l'ARNr 16S de SFB de rongeurs avec celles de bactéries non cultivables identifiées dans l'intestin du chien, dans les fèces de gorille, chez le singe et sur la peau humaine. Néanmoins, la comparaison de ces mêmes séquences avec celles des plus grandes banques métagénomiques établies à partir du microbiote fécal d'individus humains adultes, âgés de 18 à 69 ans, « MetaHIT database » et « HMP metagenomic database », n'a pas permis d'établir de correspondance (Prakash *et al.*, 2011) (Qin *et al.*, 2010) (Sczesnak *et al.*, 2011). La possible disparition de la SFB du tractus digestif au cours du temps notamment observée chez le chien, le poulet et le cochon et la forte diminution détectée chez la souris peut laisser penser qu'il soit plus facile d'identifier cette bactérie chez le nourrisson (Hoskins *et al.*, 1982) (Sanford, 1991) (Klaasen, 1990) (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant de pouvoir réaliser la comparaison des séquences de SFB à celles de banques métagénomiques constituées à partir de biopsies intestinales de nourrissons sains.

3. Ecologie de la SFB

a) Distribution spatio-temporelle

La majorité des études qui ont permis de caractériser la SFB ont été menées chez les rongeurs. Chez ces animaux, le site privilégié d'implantation de la SFB est l'iléon, site notamment riche en sucres simples issus de la digestion et où la couche de mucus ne dépasse pas 400µm d'épaisseur. Cette niche semble notamment favorable à l'établissement de la bactérie en terme nutritif (*cf A-4) biologie prédictive de la SFB*). De façon intéressante, la SFB n'est observée dans l'iléon de souris qu'au moment de la période du sevrage, soit environ vingt et un jours après la naissance, où elle fait alors partie des espèces bactériennes dominantes (Davis and Savage, 1974). Chez cet hôte, il semble que la bactérie disparaisse progressivement de l'intestin grêle, colonisant par ailleurs de façon permanente et dans une moindre mesure le cæcum et la partie haute du côlon où elle est en outre retrouvée non adhérente à la muqueuse (Klaasen, 1990). Cette dynamique de colonisation spatio-temporelle semble fortement influencée par le système immunitaire de l'hôte. Les souris SCID, immunodéficientes, monocolonisées avec la SFB, conservent la bactérie qui est alors détectée dans l'intestin grêle au-delà de l'âge de un an. De plus, la mise en place de la réponse IgA chez le jeune animal, après disparition des IgA maternels transmis par le lait, pourrait expliquer son établissement particulier au moment du sevrage chez les mammifères puis son décrochage progressif de la muqueuse intestinale. Des expériences menées sur des souriceaux allaités par des mères SCID présentent une colonisation plus précoce que des souriceaux allaités par des mères immunocompétentes (Jiang *et al.*, 2001). Ces travaux d'observation réalisés par microscopie sont qualitatifs et nécessiteraient d'être confirmés par des techniques de biologie moléculaire plus quantitatives.

b) Influence de facteurs exogènes sur la densité de colonisation par la SFB

De nombreux facteurs exogènes semblent susceptibles d'influer négativement sur la colonisation intestinale par la SFB, néanmoins les mécanismes impliqués sont encore à ce jour non établis.

Le régime alimentaire de l'hôte semble être un des facteurs les plus importants. Des expériences anciennes menées chez la souris ont permis d'observer qu'un régime varié permettait une meilleure implantation de la SFB en comparaison d'un régime uniquement

constitué de lait en poudre. Ces expériences n'ont cependant pas permis d'établir la ou les substance(s) nutritive(s) nécessaire(s) au développement de la bactérie (Klaasen *et al.*, 1991a). Nous avons également observé cet impact du régime alimentaire chez des souris monocolonisées par SFB nourries avec des aliments provenant de deux fournisseurs différents (données non publiées). D'autre part, il est intéressant de noter que la coprophagie, qui constitue une part du régime alimentaire des rongeurs, ne semble pas nécessaire au maintien de la densité de SFB, suggérant que celle-ci est capable de faire face au constant renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal par des vagues de colonisations internes successives (Klaasen, 1990).

La SFB est par ailleurs très sensible aux traitements antibiotiques. Tous les antibiotiques testés, amoxycilline, doxycycline, gentamicine, vancomycine, ciprofloxacine, trimethoprime, metronidazole, clindamycine, streptomycine et cefotaxime, même à de faible dose allant jusqu'à 1% de la dose thérapeutique, diminuent la quantité de SFB. Cette étude, entreprise dans le but de caractériser plus précisément cette bactérie non cultivable, a également permis de classer la SFB parmi les bactéries anaérobies (Klaasen *et al.*, 1991a).

4. Biologie prédictive de la SFB

a) Métabolisme

Sur la base du séquençage des génomes entiers de la SFB murine et de la SFB de rat, les analyses comparatives des séquences codantes avec les bases de données prédictives de protéines, ont montré le caractère auxotrophe de la SFB vis-à-vis de l'hôte. Celle-ci est en effet dépourvue de la majorité des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des acides aminés, des nucléotides et de nombreuses vitamines et cofacteurs. Cette économie métabolique, qui pourrait notamment expliquer les difficultés pour cultiver la bactérie en dehors de sa niche écologique, est par ailleurs retrouvée chez de nombreuses souches de *Clostridia* pathogènes (C. *perfringens* et *C. tetani*). Un grand nombre de protéases, de nucléases et de systèmes de transporteur, notamment de transporteur Adenosine triphosphate (ATP) Binding Cassette (ABC), ont cependant été identifiés, et permettraient ainsi à la SFB de puiser dans son environnement les nutriments essentiels à sa survie, qu'ils soient issus de la cellule de l'hôte ou bien de la digestion des aliments. L'absence d'enzymes de dégradation des sucres complexes est compensée par la présence de ces transporteurs capables d'assurer

le transport unidirectionnel des sucres simples, comme le ribose, le mannose, le cellobiose ou le fructose, présents dans l'environnement de la bactérie, en échange de l'énergie fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Ces substrats sont alors métabolisés en énergie et gaz (CO_2 et H_2) favorisant ainsi la mise en place d'un milieu anaérobie nécessaire à la survie de la SFB.

Si très peu de protéines prédictives ont été associées au métabolisme énergétique bactérien, un grand nombre de séquences identifiées semblent impliquées dans la biosynthèse de la paroi bactérienne, la sporulation, la formation d'un flagelle, le chimiotactisme et la fermentation anaérobie. De ce fait, la glycolyse anaérobie pourrait alors être la source principale d'énergie pour la SFB, comme c'est le cas pour le pathogène *C. perfringens* (Figure 35) (Prakash *et al.*, 2011) (Sczesnak *et al.*, 2011).

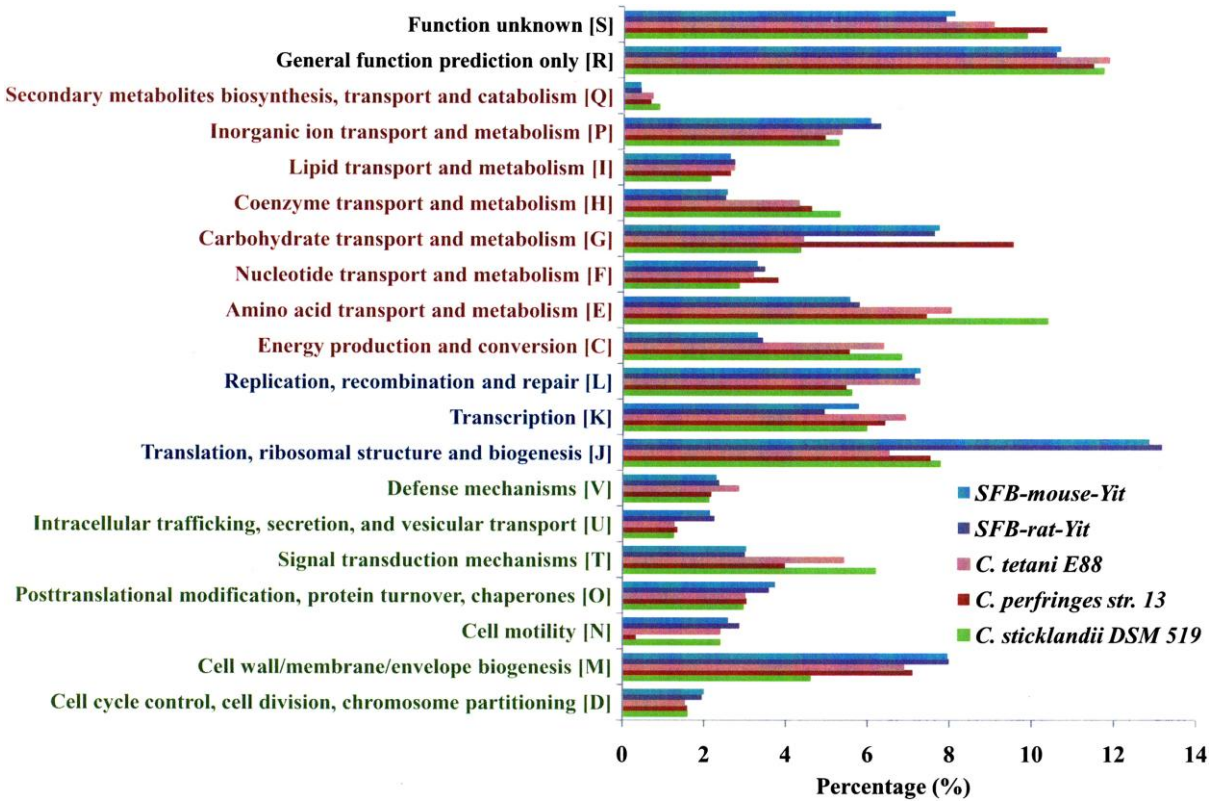


Figure 34 - Classification prédictive des séquences isolées des SFB de rongeurs dans les bases de données COG

Comparaison des groupes de protéines orthologues (COG) prédictifs de la SFB à ceux de trois autres espèces de *Clostridia* dont deux pathogènes *C. perfringes* et *C. tetani* (Prakash *et al.*, 2011)

b) Cycle de vie

Les différences de morphologie des filaments de SFB observées par microscopie et les récentes données du séquençage de son génome suggèrent l'existence d'un cycle de vie particulier de la bactérie (Figure 35). De façon prédictive, trois stades de développement distincts peuvent y être décrits. Un premier stade serait celui de la spore mobile (de H à A sur le schéma). Ce stade très « furtif », difficile à observer au microscope, permettrait la migration et l'ancrage de la SFB à la muqueuse intestinale. La motilité de la bactérie serait permise grâce à l'expression d'un flagelle dont les mouvements, générés par des cascades de phosphorylations, permettraient d'orienter le déplacement de la bactérie en fonction des signaux chimiotactiques présents dans son environnement. Les enzymes de dégradation du mucus (alpha-N-acétylglucosaminidase) faciliteraient la progression de la SFB en direction de son point d'attache, la muqueuse intestinale de l'hôte. Un deuxième stade serait celui de la croissance de la forme végétative (de B à D). Une fois implantée, la bactérie pourrait alors puiser les nutriments essentiels à sa survie dans la cellule de l'hôte grâce à un grand nombre de systèmes de transporteurs, dont les nombreux transporteurs ABC. La SFB se développerait une fois attachée à la cellule épithéliale intestinale par segmentation et adopterait une structure filamentaire constituée de segments séparés par des septa. Au cours du troisième stade de développement, certains segments de la forme végétative de la SFB se différencieraient en segments reproducteurs (de E à G). Ces segments formeraient alors des endospores multiples. La libération des spores, forme plus résistante aux stress physico-chimiques (température, irradiation, *etc*.), assure probablement la transmission interindividuelle de la bactérie (Pamp *et al.*, 2012).

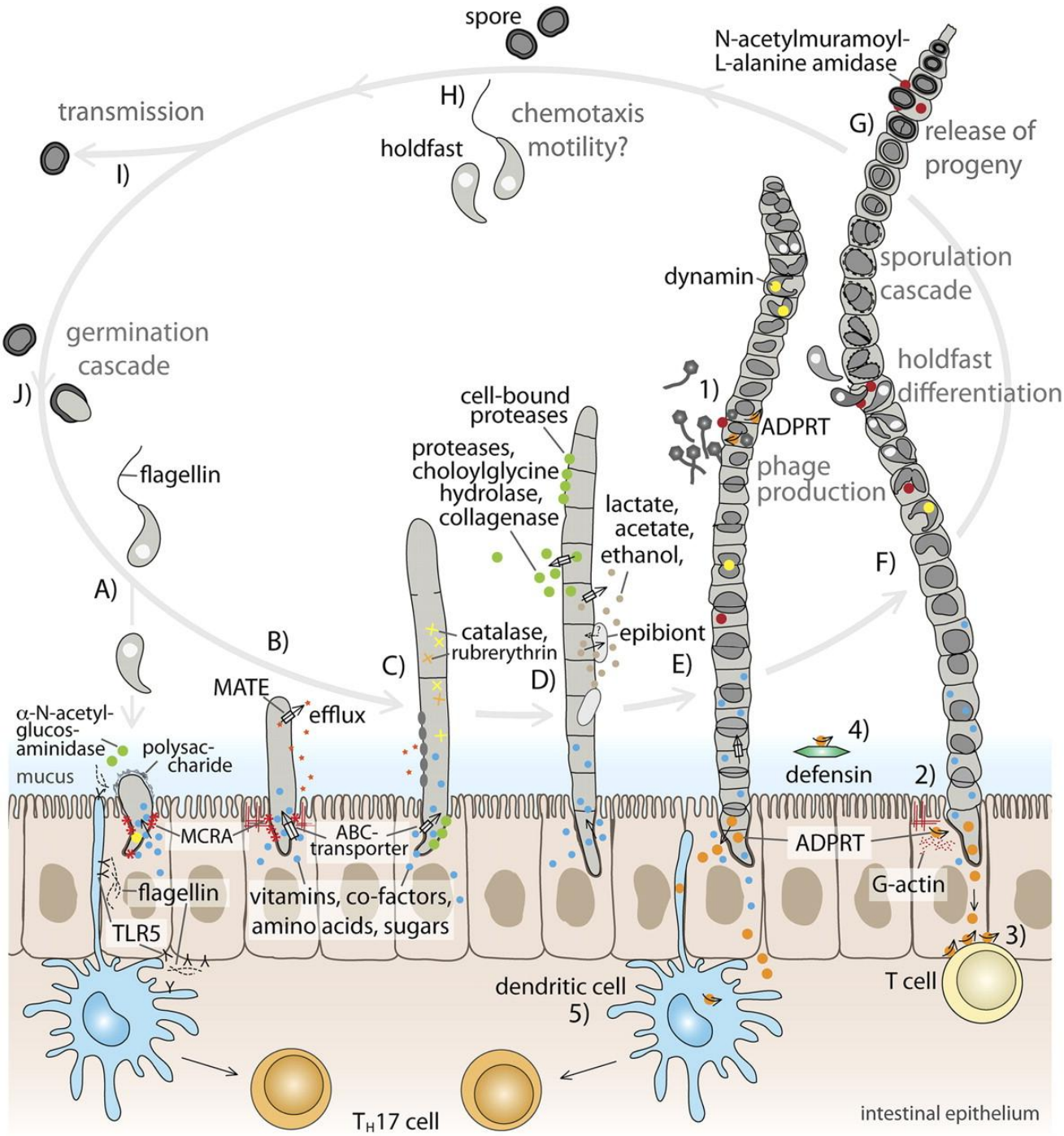


Figure 35 - Cycle de vie prédictif de la SFB dans l'intestin de son hôte (Pamp *et al.*, 2012)

B. Effets immunomodulateurs de la SFB

1. Effet Barrière

De par sa capacité à adhérer à l'épithélium intestinal et notamment à celui des plaques de Peyer, la SFB est susceptible d'entrer en compétition pour les sites d'adhésion des pathogènes. C'est pourquoi dès les premières observations microscopiques, Hampton et Rosario font l'hypothèse de son effet barrière contre l'invasion par des bactéries pathogènes (Hampton and Rosario, 1966). Cette hypothèse est par ailleurs renforcée par l'observation d'une forte corrélation entre la présence de SFB dans l'iléon de rat et la résistance à l'infection par *Salmonella enteritidis*, une bactérie pathogène qui adhère aux plaques de Peyer, et envahit ensuite les ganglions mésentériques et le foie. La présence de *S. enteritidis* dans les biopsies iléales des animaux infectés n'est observée qu'en l'absence de SFB (Garland *et al.*, 1982). De plus, des données chez le lapin montrent que selon la répartition géographique, ceux-ci sont résistants, ou non, à la colonisation par une souche entéropathogène d'*E. coli* REPEC O103. De façon remarquable, le profil de résistance chez les animaux d'élevage est associé à la détection de SFB par microscopie électronique (Heczko *et al.*, 2000).

La démonstration de l'effet barrière de la SFB est cependant assez récente. En effet, la colonisation de souris SPF par la SFB permet de prévenir pour partie les effets colitogènes du pathogène intestinal *C. rodentium* (Ivanov *et al*., 2009a). Bien que *C. rodentium* infecte les deux groupes, la SFB semble bloquer l'invasion de *C. rodentium*. Néanmoins, le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) la SFB exerce cet effet protecteur ne sont pas démontrés.

Une première possibilité pourrait être que la SFB occupe un site d'adhérence priviligié pour les pathogènes ci-dessus mentionnés. Cette hypothèse pourrait s'appliquer à *S. enteriditis* qui adhère essentiellement aux plaques de Peyer, mais pas à *C. rodentium* qui colonise plus particulièrement l'épithélium colique. La compétition pour le site d'adhésion n'est donc pas suffisante pour expliquer le mécanisme par lequel la SFB exerce cet effet barrière. Une deuxième possibilité pourrait être que la SFB prévient la colonisation par ces pathogènes à travers l'activation de réponses immunitaires protectrices. Et en effet, la SFB induit la production de cytokines (l'IL-17 et l'IL-22), de défensines (RegIIIγ) et de stress oxydatif (iNOS), qui sont autant de mécanismes aux effets protecteurs avérés contre ces pathogènes (Hapfelmeier *et al.*, 2010) (Brandl *et al.*, 2007). Ainsi, l'effet protecteur de la SFB conférant

à son hôte une résistance face à la colonisation par des pathogènes pourrait provenir de sa forte capacité à stimuler le système immunitaire de l'hôte.

L'étonnante particularité de la SFB est qu'elle possède des caractéristiques biologiques proches de certaines *Clostridia* pathogènes mais qu'elle ne semble pas pour autant induire chez l'hôte immunocompétent de réaction immunitaire inflammatoire délétère. Une des principales caractéristiques est son adhésion à l'épithélium intestinal, et notamment à celui de certaines structures lymphoïdes organisées associées aux muqueuses de l'intestin telles que les plaques de Peyer particulièrement décrites chez les rongeurs (Figure 36) (Koopman *et al.*, 1984) (Jepson *et al.*, 1993). La première hypothèse était qu'elle pourrait de par ses propriétés d'adhésion fortement stimuler le système immunitaire associé à la muqueuse intestinale.

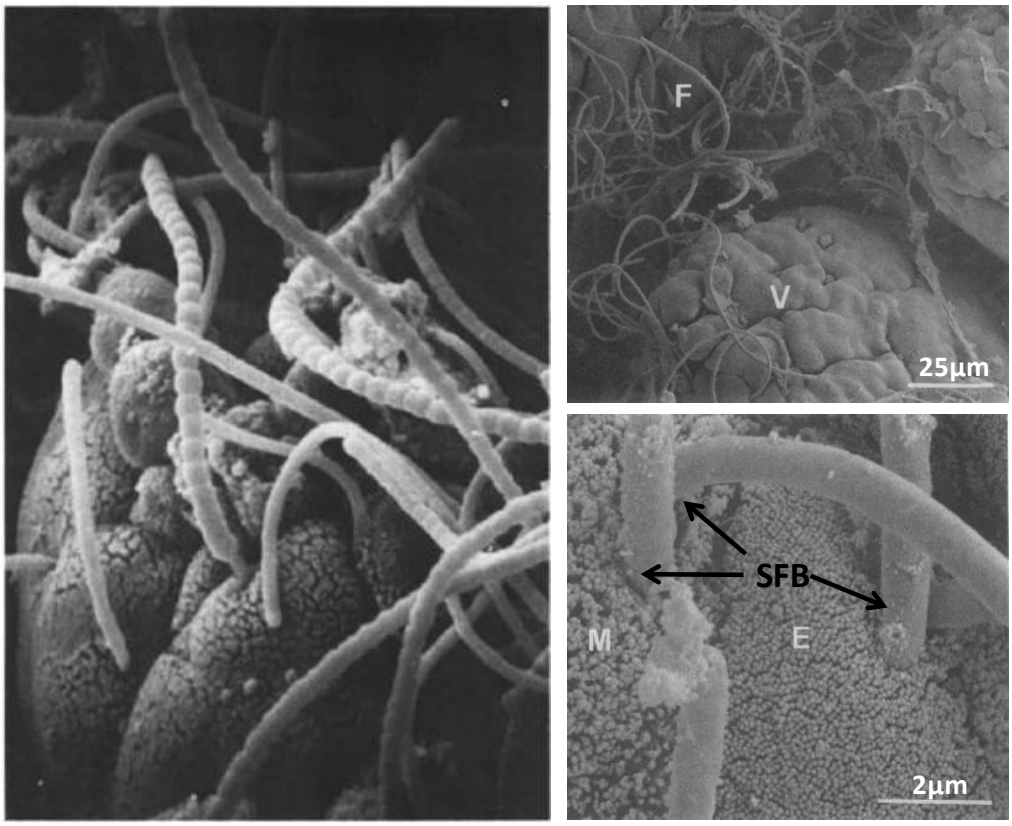


Figure 36 - Images de microscopie électronique d'iléon de souris illustrant l'adhésion de la SFB à l'épithélium intestinal et notamment à celui des plaques de Peyer.

L'image de gauche provient d'intestin de souris colonisées par un microbiote murin complexe SPF (Koopman *et al.*, 1984). Les images de droite proviennent d'intestin de souris conventionnelles (Jepson *et al.*, 1993). L'image du haut est obtenue au grossissement x 610 et permet d'observer l'attachement de la SFB à l'épithélium des structures folliculaires intestinales (F) et aux villosités intestinales (V). L'image du bas est obtenue au grossissement x 10100 et permet de distinguer l'attachement de la SFB à l'épithélium intestinal (E) riche en microvillosités de celui de l'épithélium associé aux plaques de Peyer (M) caractérisé par des microvillosités irrégulières.

2. La SFB induit une réponse intestinale inflammatoire physiologique

L'hypothèse du rôle stimulant de la SFB sur le système immunitaire intestinal de l'hôte a initialement été suggérée par une ancienne étude visant à caractériser les différents paramètres nécessaires à la « normalisation » des souris axéniques. Les sept critères de normalisation retenus à l'époque étant : un test de résistance à la colonisation par *E. coli*, la réduction du poids relatif du caecum, la détermination du *ratio* villosités/cryptes (élevé chez les souris axéniques), la présence dans l'intestin de certains métabolites issus de la fermentation bactérienne (acides gras volatils) et, par opposition, la présence de composés métaboliques non fermentés (le β-aspartyl-glycine), l'index de métabolisation bactérienne des acides biliaires (secondaires/primaires), et le nombre de cellules productrices d'IgA. Ainsi, des souris axéniques sont colonisées par un inoculum issu d'une culture anaérobie d'un contenu caecal de souris conventionnelles préalablement dilué soit à 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5} ou 10^{-7} et cultivé sur boîte d'agar pendant sept jours. Les souris axéniques contrôles ont été « naturellement » colonisées par cohabitation avec des souris SPF. Les résultats indiquent que seul l'inoculum provenant de la culture réalisée à partir de la plus faible dilution du contenu caecal (10^{-1}) est capable de restaurer les sept paramètres à un niveau comparable à celui qui est observé chez les souris naturellement colonisées. De façon remarquable, les auteurs constatent que la présence de SFB n'est détectée par microscopie que chez les souris colonisées avec la culture réalisée à partir de la dilution 10^{-1} et suggèrent alors que le processus de « normalisation » déterminé par ces sept paramètres, classiquement utilisés à l'époque, nécessiterait d'intégrer comme huitième paramètre, la détection de SFB dans l'intestin des souris (Koopman *et al.*, 1984) (Corpet, 1989).

L'analyse des effets immunostimulants de la SFB a pu être initiée suite à la mise au point du modèle de souris monocolonisées. L'élaboration de ces « souris SFB » a permis en outre de remarquer que la densité de colonisation de l'intestin par la SFB est fortement dépendante de la quantité de bactéries présentes dans l'inoculum (Klaasen, 1990) (Klaasen *et al.*, 1991b).

a) La SFB stimule l'établissement des réponses immunes dans l'épithélium

Après colonisation de souris axéniques avec la SFB, la cellule épithéliale semble s'activer. En effet, l'augmentation de l'expression du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II) et la fucosylation transitoire des glycolipides asialo GM1 sont détectés à la surface des cellules épithéliales intestinales. D'autre part, l'induction de l'expression de l'antigène Thy-1 suggère un recrutement probable de LIE (Umesaki *et al.*, 1995). Cette maturation de la cellule épithéliale pourrait alors être associée à l'expansion et l'activation des populations de LIE dans ce compartiment. En effet, cinquante à soixante jours après la colonisation de souris axéniques par la SFB, l'augmentation des populations de lymphocytes T $CD8^+$ et de cellules NK est détectée dans l'intestin des souris (Cebra *et al.*, 1998).

b) La SFB stimule la mise en place des réponses immunes dans le chorion

i) Activation des centres germinatifs

Les premières études des « souris SFB » analysant les réponses immunitaires au sein du chorion ont montré que la SFB est capable d'induire la réaction des centres germinatifs, six jours après la monocolonisation (Talham *et al.*, 1999). De façon intéressante, les auteurs décrivent une activation durable mais inconstante des centres germinatifs des plaques de Peyer des souris monocolonisées avec la SFB. Ce profil d'activation des centres germinatifs est observé dans d'autres modèles de souris monocolonisées. Au contraire, les centres germinatifs des souris conventionnelles sont activés de façon permanente et durable. Ces différences suggèrent que la colonisation par plusieurs espèces bactériennes est nécessaire à l'activation permanente des centres germinatifs de ces structures (Cebra *et al.*, 1998) (Fagarasan *et al.*, 2010). Ces résultats indiquent que la colonisation par la SFB pourrait favoriser la maturation des structures lymphoïdes secondaires. Néanmoins, aucune donnée n'a été publiée quant à son impact sur la maturation des FLI qui se développent pourtant sous l'influence du microbiote, notamment au moment où la SFB colonise l'intestin chez la souris.

ii) Induction d'une réponse IgA locale et périphérique

Associée à cette activation des centres germinatifs des plaques de Peyer, une augmentation des réponses IgA est détectée dans les fèces et dans le chorion des souris monoassociées avec la SFB. La comparaison du nombre de plasmocytes sécréteurs d'IgA (IgA-SC) dans le chorion de trois groupes de souris, axéniques, monocolonisées avec la SFB et SPF dépourvues de SFB par traitement à la ciprofloxacine, montre que seule la SFB semble

capable de stimuler de fortes réponses IgA intestinales (Klaasen *et al*., 1993b). Cependant, il est difficile de conclure quant à la différence de niveau des réponses IgA des souris SFB et des souris SPF dépourvues de SFB, puisque l'utilisation de la ciprofloxacine, un antibiotique à large spectre, ne peut exclure que d'autres groupes bactériens impliqués dans cette réponse aient également été ciblés par le traitement. Le niveau de colonisation bactérienne n'est par ailleurs pas contrôlé dans ces souris. Par ailleurs, les auteurs rapprochent cette augmentation des réponses IgA à celle qui est observée chez la souris au moment du sevrage, fenêtre de colonisation de l'hôte par la SFB. Ils émettent l'hypothèse de son rôle potentiel dans l'élévation rapide de l'immunité humorale au moment où le petit n'est plus protégé par celle de sa mère au moment du sevrage.
De façon remarquable, il semble que la monocolonisation des souris avec la SFB induise également une réponse IgA détectée dans la rate des animaux monocolonisés (Klaasen *et al.*, 1993b). Ces derniers résultats sont particulièrement intéressants car ils soulèvent la question encore non résolue et controversée dans la littérature, de la compartimentation des réponses immunitaires induites par la colonisation bactérienne intestinale (Macpherson and Uhr, 2004a) (Clarke *et al.*, 2010).

Si la SFB apparaît fortement inductrice des réponses IgA intestinales, il semble que cette réponse soit peu spécifique. En effet, les réponses IgA totales et spécifiques ont pu être déterminées dans le surnageant de cultures organotypiques de biopsies intestinales de souris monocolonisées stimulé soit en présence d'un anticorps anti-Fab (pour Fragment antigen-binding, fragment variable des chaînes lourdes des Ig) soit en présence de lysat bactérien, et mesurées par RIA. Les résultats indiquent qu'un très faible pourcentage des SIgA, 1,3% de la réponse IgA totale, réagit spécifiquement contre le lysat de SFB. Ce pourcentage est plus faible que celui obtenu avec une autre bactérie monoassociée en souris axénique, *M. morganii*, pour laquelle les auteurs détectent 4,8% de spécificité de la réponse IgA intestinale. Or, *M. morganii* a été décrite et étudiée notamment pour sa capacité à transloquer à travers l'épithélium des plaques de Peyer dans les ganglions mésentériques et jusque dans la rate des souris monoassociées. Cette particularité qui n'a pas été établie pour la SFB pourrait peut-être expliquer la différence de spécificité entre ces deux bactéries. Cependant ces spécificités sont relativement modérées en comparaison à celle obtenue avec la bactérie pathogène mutante *L. monocytogenes actA*- (15% de spécificité) *(cf figure 25)* (Bos *et al.*, 2001) (Shroff *et al.*, 1995).

Par ailleurs, la faible spécificité des réponses IgA intestinales pourrait suggérer un rôle adjuvant de la SFB. Cette question a été adressée dans deux études mettant en œuvre des approches différentes. Dans la première étude, les souris axéniques ont été monoassociées avec la SFB puis, après quatre mois, elles ont été colonisées avec *M. morganii*. La colonisation préalable par la SFB ne semble pas modifier les réponses IgA totales et spécifiques qui se mettent en place suite à la « sur-colonisation » avec *M. morganii*. En effet la cinétique et le niveau de ces réponses sont comparables à ceux observés en souris monocolonisées avec *M. morganii*. De façon surprenante les auteurs observent que la SFB ne permet pas de bloquer la translocation de *M. morganii* détectée dans les ganglions mésentériques et dans la rate des souris, translocation qui perdure même après la mise en place de la réponse IgA spécifique contre *M. morganii*. Ces derniers résultats diffèrent cependant de ceux établis dans une étude précédente, dans laquelle la translocation de *M. morganii* était diminuée à partir de la détection d'IgA anti-*M. morganii* (Shroff *et al.*, 1995) (Talham *et al.*, 1999).

Dans une seconde étude, des souris ont été immunisées contre l'ovalbumine (OVA) puis ont été gavées à l'OVA. Les réponses IgA intestinales spécifiques contre l'OVA dans des souris monoassociées avec la SFB ou *Clostridium inocuum* ont alors été comparées. Ce symbionte appartient à la même famille que la SFB et partage un certain nombre de caractéristiques communes (bactérie anaérobie, sporulante et non pathogénique en conditions physiologiques) mais à la différence de la SFB *C. inocuum* est cultivable et non adhérente à la muqueuse intestinale. Les réponses IgA intestinales sont comparables dans ces deux modèles, suggérant que la SFB n'est pas particulièrement adjuvante dans l'établissement de cette réponse spécifique anti-OVA qui s'établit par ailleurs avec la même cinétique que celle observée dans une souris conventionnelle. Néanmoins, il apparaît que la réponse IgA totale est dix fois plus élevée chez les souris SFB que chez les souris monoassociées à *C. innocuum* (Snel *et al.*, 1997).

Dans ces deux études, les souris ont été colonisées par la SFB un à quatre mois avant l'immunisation. Or la SFB ne s'implante qu'après la période du sevrage chez les mammifères, au moment même où la diversité des antigènes qui arrivent dans l'intestin s'accroit considérablement. Il est donc possible que l'effet adjuvant de la SFB doive être étudié en administrant conjointement l'antigène et l'adjuvant, comme cela a été fait pour d'autres adjuvants comme la toxine cholérique.

De façon remarquable, l'absence de réponse IgA chez des souris SPF *Aicda*$^{-/-}$ conduit à une pullulation microbienne qui est détectée dans la lumière intestinale. L'analyse de la diversité bactérienne par les techniques de biologie moléculaire a permis d'observer une prolifération particulière de la SFB qui perdure dans le temps, notamment dans la partie haute de l'intestin de ces souris (Fagarasan *et al.*, 2002) (Suzuki *et al.*, 2004).

Ces données suggèrent que la réponse IgA induite en situation de microbiote complexe, dont on peut supposer qu'elle soit peu spécifique de la SFB, est nécessaire au contrôle de la prolifération de cette bactérie. La pullulation de la SFB est en outre associée à une hypertrophie et une hyperplasie des structures lymphoïdes dans le compartiment intestinal, plaques de Peyer et FLI, avec une hyperstimulation des centres germinatifs des structures lymphoïdes intestinales, des ganglions mésentériques et de la rate. Il n'est cependant pas mentionné si ce phénotype est associé à une atteinte intestinale chez les souris déficientes. Par ailleurs, la sécrétion de peptides antimicrobiens, impliqués dans la régulation de la diversité des populations bactériennes, n'est pas augmentée en l'absence d'IgA ce qui semble renforcer le rôle particulier des IgA dans cette fonction. Néanmoins les réponses immunes innées n'ont pas toutes été analysées, et il aurait été particulièrement intéressant de déterminer les réponses associées au stress oxydatif, qui sont d'une part induites par monoassociation de souris axéniques avec la SFB et qui, d'autres part sont fortement induites chez les souris immunodéficientes *Rag1*$^{-/-}$ (Salzman *et al.*, 2010) (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009) (Peterson *et al.*, 2007). De façon intéressante le traitement par antibiotiques rétablit le phénotype des souris et l'apport d'IgA par parabiose avec une souris sauvage est également capable de restaurer le phénotype. Ces derniers résultats confortent l'idée d'un rôle particulier des SIgA dans le contrôle de l'écologie des populations bactériennes qui s'établissent dans l'intestin et notamment de la SFB, rôle qui n'est pas compensé par la production de SIgM chez les souris déficientes pour l'enzyme AID.

De façon remarquable, les souris présentant une déficience complète en IgA par introduction d'une mutation sur le locus de la chaîne lourde des IgA, ne développent pas d'hyperplasie des structures folliculaires intestinales (Harriman *et al.*, 1999). Contrairement aux souris déficientes pour AID, ces souris sont capables de produire des IgM et IgG hypermutées, suggérant qu'en l'absence d'IgA, la compensation par les IgM et les IgG (vingt cinq fois et trois fois augmentées, respectivement, dans les sécrétions intestinales des souris déficientes par rapport aux souris de phénotype sauvage dans l'étude de Harriman *et al.* n'est effective qu'à la condition que ces Ig subissent des hypermutations somatiques. L'importance des

mécanismes d'hypermutations somatiques a par ailleurs été étudiée chez des souris SPF présentant une mutation particulière de l'enzyme AID, souris AID^{G23S}, qui inhibe son activité SHM mais pas CSR. Ces souris sont donc capables de produire des IgA mais non hypermutées. Les souris AID^{G23S} développent le même phénotype que les souris *Aicda*$^{-/-}$. L'hyperstimulation des structures lymphoïdes intestinales et périphériques observée chez les souris AID^{G23S} est cependant d'un niveau intermédiaire entre les souris de phénotype sauvage et les souris *Aicda*$^{-/-}$. Par ailleurs, la prolifération bactérienne observée n'est plus spécifiquement associée à une pullulation de la SFB comme chez les souris *Aicda*$^{-/-}$, mais atteint différents groupes bactériens qui sont variables pour chacune des quatre souris dont la diversité bactérienne a été analysée. De façon ambigüe, les auteurs mentionnent que la SFB n'est pas détectée chez les souris SPF AID^{G23S} sans préciser si la SFB est détectée dans le microbiote SPF des souris de phénotype sauvage, utilisées comme contrôle. Ces résultats soulignent néanmoins la difficulté de caractériser les réponses qui s'établissent entre l'hôte et une espèce particulière lorsque l'on se place en situation de microbiote complexe.

Par ailleurs, les mécanismes associés à l'induction des réponses IgA intestinales après monocolonisation de souris axéniques avec la SFB ne sont pas établis. Néanmoins, différents arguments suggèrent une initiation dans les plaques de Peyer, site majeur d'induction des réponses intestinales SIgA. En effet, la SFB possède la particularité d'adhérer à l'épithélium associé aux plaques de Peyer et elle est capable d'activer les centres germinatifs de ces structures lymphoïdes secondaires. Il a en outre été décrit que la monocolonisation de souris avec la SFB induit l'augmentation des transcrits du CD40L dans les plaques de Peyer de souris SFB (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009). L'hypothèse d'un mécanisme T-dépendant, suggéré par l'activation des centres germinatifs, est cependant paradoxal compte tenu de la faible spécificité des réponses IgA détectée et en désaccord avec ce qui est décrit dans la littérature (Slack *et al.*, 2012). De nouvelles recherches sont donc nécessaires pour établir les mécanismes soutenant l'initiation de ces réponses IgA à la fois au niveau intestinal mais également des réponses IgA détectées dans la rate des souris monoassociées avec la SFB.

Un autre effet immunostimulant de la SFB, qui a plus récemment été caractérisé, est son rôle dans l'établissement d'une réponse cellulaire effectrice T $CD4^+$ dans le chorion des souris monoassociées. Par ailleurs, le rôle particulier du microbiote et notamment d'autres symbiontes dans la mise en place et l'orientation de ces réponses a fait l'objet d'une revue

récente à laquelle je suis associée et qui figure en annexe du manuscrit (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2011).

iii) Stimulation d'une réponse T CD4$^+$ à large spectre

L'observation d'une activation des populations T CD4$^+$ dans les plaques de Peyer des souris monocolonisées avec la SFB n'est pas récente (Cebra *et al.*, 1998), cependant la nature des réponses et les mécanismes impliqués commencent seulement à être appréhendés .

La restauration du profil de sécrétion de cytokines des souris axéniques dépend de l'interaction qui s'établit entre l'hôte et son microbiote. Il apparaît en outre que la mise en place des réponses T CD4$^+$ est fortement dépendant du type de microbiote qui est introduit en souris axénique. En effet, la fraction cultivable du microbiote murin n'est pas capable de rétablir le profil équilibré Th/Treg observé dans l'intestin des souris conventionnelles (Cv) ou conventionnalisées (Cvd). D'autre part, il apparaît que cette fraction cultivable du microbiote murin est spécifiquement réduite en espèces issues du groupe des *Clostridium*, qui comprend la SFB. L'inoculation de la fraction sporulée résistante à la chaleur qui caractérise ce groupe de symbiontes est capable de restaurer le profil intestinal Th/Treg à un même niveau que celui d'une souris Cv ou Cvd. Vingt jours après monocolonisation de souris axéniques, la SFB est capable de récapituler la balance des réponses intestinales Th/Treg induite en situation conventionnelle (souris Cv et Cvd) (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009).Contrairement au large spectre des réponses intestinales T CD4$^+$ décrit dans cette première étude, une autre équipe a observé l'induction par la SFB d'un profil T CD4$^+$ restreint au profil Th17 (Ivanov *et al*., 2009a). De façon intéressante, ils observent une forte induction des transcrits du serum amyloid A (SAA), une protéine produite en phase aigüe d'inflammation. Les trois isoformes de SAA figurent en outre parmi les transcrits majoritairement induits par la colonisation avec la SFB. Le mécanisme d'induction des réponses Th17 par la SFB proposé par ces auteurs et testé *in vitro* implique cette protéine (Figure 38).

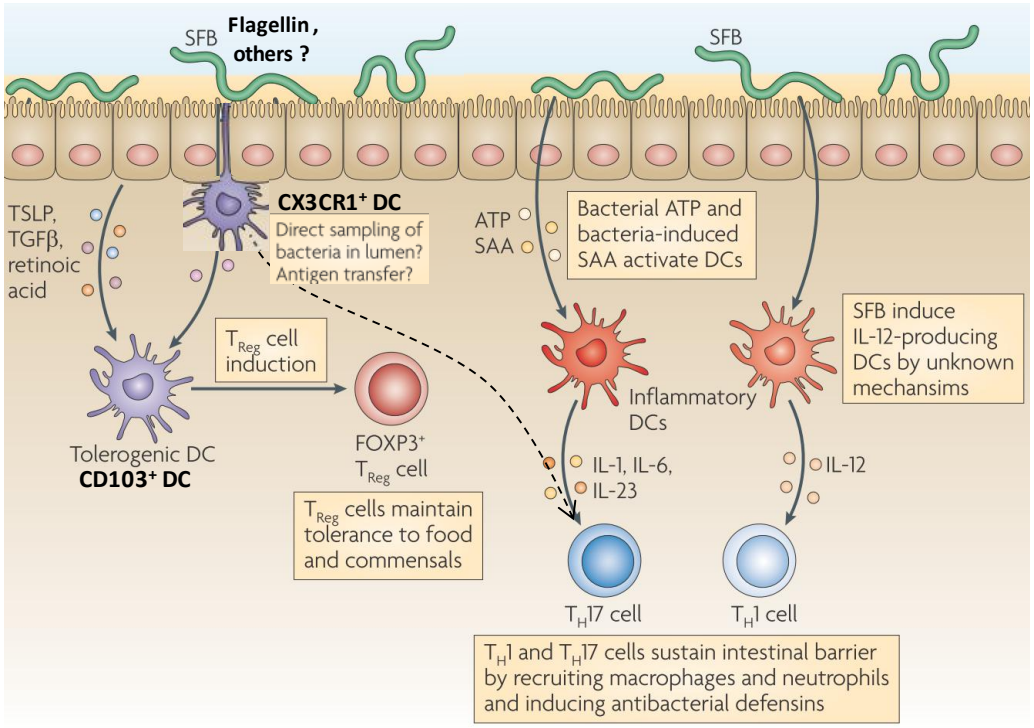


Figure 37 - Mécanismes potentiels d'induction des réponses intestinales T CD4$^+$ par la SFB impliquant les CD (adapté de (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010))

La fonction protectrice de la réponse Th17 induite par la SFB notamment contre l'invasion par des pathogènes, renforçant l'effet barrière, est probable mais non démontrée. Par ailleurs et plus largement discuté dans la littérature est le rôle inflammatoire de la réponse Th17 en périphérie, notamment associée au développement de maladies auto-immunes (Chervonsky, 2010). Enfin la SFB induit le recrutement dans l'épithélium de LIE au fort pouvoir cytotoxique, également impliqués dans certaines pathologies intestinales comme la maladie cœliaque (Meresse *et al.*, 2012). Dans ce contexte on peut s'interroger quant au rôle potentiellement délétère de la colonisation par la SFB.

J'ai choisi dans cette troisième partie de présenter certaines données de la littérature qui permettront peut-être d'apporter quelques éléments de réponse à cette question.

C. Symbionte ou pathobionte : la pathogénicité de la SFB en question

Le terme de pathobionte, récemment employé par Sarkis Mazmanian qualifie le rôle potentiellement inflammatoire d'une bactérie symbiotique qui, dans un contexte particulier, est susceptible d'induire ou de contribuer à une pathologie chez son hôte. Le « contexte particulier » est fortement dépendant de la génétique de l'hôte, de sa physiologie, mais également d'éléments externes capables de déstabiliser l'homéostasie de l'hôte. Les bactéries *Helicobacter hepaticus* et *Helicobacter pylori* sont des pathobiontes qui ont été respectivement identifiés comme tels chez la souris et chez l'homme, et pour lesquels les facteurs présents chez l'hôte et les mécanismes orientant leur pathogénicité commencent tout juste à être déterminés (Polk and Peek, 2010) (Chow and Mazmanian, 2010).

Certaines caractéristiques morphologiques, écologiques et biologiques de la SFB, associées aux puissants effets immunostimulants qu'elle génère chez son hôte, tendraient à la rapprocher d'une bactérie pathogène notamment chez l'hôte génétiquement prédisposé.

1. Singularité du dialogue hôte-SFB : l'adhésion à la cellule épithéliale

L'étonnante capacité de la SFB à adhérer à l'épithélium de la muqueuse intestinale confère à la cellule épithéliale intestinale un rôle central dans cette interaction et questionne quant au dialogue cellulaire et moléculaire qui s'établit entre les deux partenaires.

Les mécanismes impliqués dans cet attachement hôte-spécifique relatifs à l'existence d'un récepteur particulier, aux voies de signalisation activées et aux conséquences physiologiques qu'il occasionne, potentiellement variables d'une espèce à l'autre, restent à découvrir. Néanmoins, chez la souris, les observations de la réaction cellulaire qui se produit lors de l'ancrage de la bactérie, par microscopie électronique après cryofracture, montrent que le cytoplasme adjacent au site d'attachement de la SFB subit un changement de structure physique, de liquide à solide, qui pourrait conduire à la fixation de l'interaction de la bactérie avec la cellule épithéliale de l'hôte (Snellen and Savage, 1978) (Figure 39).

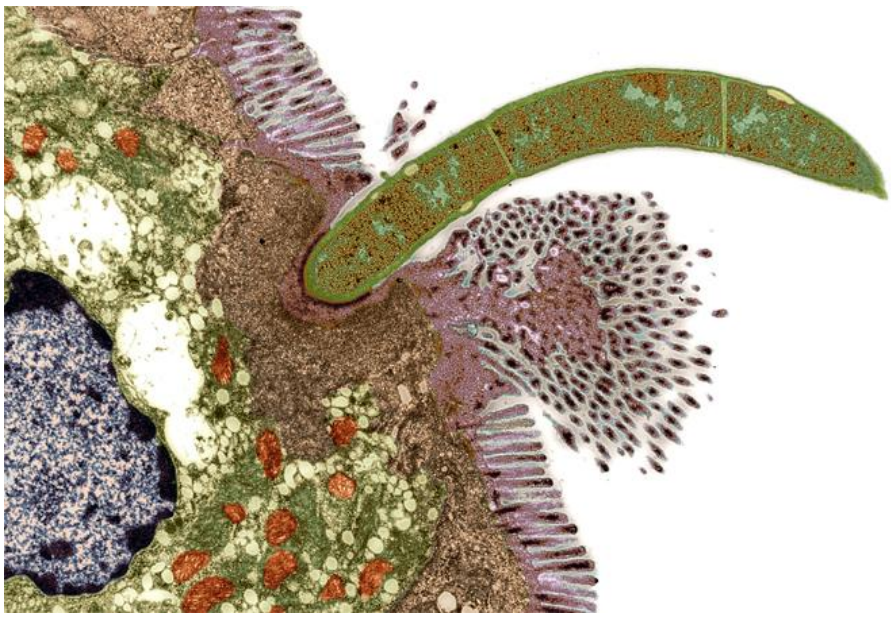


Figure 38 - Interaction entre la SFB et la cellule épithéliale intestinale de souris SPF

Image de microscopie électronique coloriée de façon à distinguer les mitochondries (orange), le cytoplasme (vert), les noyaux (bleu) et les microvillosités (violet**)** (Ivanov *et al*., 2009b)

D'autres observations de microscopie confocale, réalisées après immuno-marquage des cellules M et de l'actine d'une plaque de Peyer de souris Cv, indiquent que l'interaction de la SFB avec la cellule épithéliale intestinale de l'hôte aboutit à l'invagination de la membrane plasmique et à la formation d'un réseau sous-jacent d'actine polymérisée associé à une augmentation intracellulaire de la concentration de calcium libre. Ce mécanisme est observé avec certaines *E. coli* entéro-pathogéniques (EPEC) mises en culture avec des cellules épithéliales mais diffèrent de ceux observés lors de l'invasion par *Salmonella* où le réseau d'actine qui se forme est plus diffus (Jepson *et al.*, 1993).

D'autre part, contrairement à de nombreuses bactéries pathogènes, aucune des protéines prédictives correspondant aux adhésines d'ancrage qui leurs sont caractéristiques n'a été identifiée pour la SFB de rongeur. Il apparaît en outre qu'elle serait faiblement pourvue en facteurs de virulence, les seuls ayant été identifiés au sein de son génome étant la fibronectin binding protein, l'hemolysin A, deux copies de collagenases, et deux copies de phospholipases C zinc binding protein (Prakash *et al.*, 2011).

Bien que peu de données aient été publiées chez d'autres espèces non-mammaliennes, une étude relativement récente, reposant uniquement sur des observations par microscopie

électronique chez le jeune poulet domestique, *Gallus gallus domesticus*, suggère que la SFB serait phagocytée et digérée par la voie lysosomale dans les cellules épithéliales intestinales (Yamauchi and Snel, 2000). Chez une autre espèce mammalienne de la famille des suidés, des observations microscopiques suggèrent que la SFB interagit avec des cellules mononuclées présentes dans l'épithélium intestinal (Meyerholz *et al.*, 2002).

Malgré l'interaction avérée de la SFB à son hôte et la réaction sous-jacente de la cellule hôte, un défaut d'adhésine d'ancrage et le faible nombre de facteurs de virulence identifiés, pourraient expliquer son absence de pathogénicité chez les rongeurs. Ces données associées à la forte dépendance de la SFB vis-à-vis de son hôte, suggèrent qu'une coadaptation mutualiste aurait permis de sélectionner au cours de l'évolution un mécanisme d'ancrage bactérien sans pouvoir pathogène associé, particulier à la SFB des rongeurs. Par ailleurs l'éventualité d'autres mécanismes d'interaction chez les hôtes non-mammaliens est à considérer. Enfin, il reste à démontrer l'importance de cette interaction dans l'orientation des réponses immunes chez l'hôte et les mécanismes moléculaires associés.

Si l'absence de pouvoir pathogène caractérise la SFB des rongeurs, elle demeure fortement stimulatrice des réponses immunes innées et adaptatives de cet hôte, on peut donc se demander ce qu'il peut se produire chez l'hôte immunodéficient.

2. Instabilité du dialogue chez l'hôte immunodéficient

De façon intéressante, les souris SPF *Aicda*$^{-/-}$ présentent une pullulation intestinale de SFB. La technique utilisée ne permet cependant pas de discerner les bactéries présentent dans la lumière de celles adhérentes à la muqueuse. Le phénotype associé à l'absence d'IgA, est une hyperstimulation des structures lymphoïdes intestinales dans la muqueuse (Suzuki *et al.*, 2004). De façon intéressante, les souris SPF AID^{G23S}, capables de produire des IgA mais non hypermutées, présentent un phénotype assez semblable, légèrement moins sévère, mais les auteurs ne précisent pas si l'absence de détection de SFB chez ces animaux est due à la perte de SFB qui n'est pas détectée où si la SFB n'était pas présente chez les animaux à l'origine (Wei *et al.*, 2011). Par ailleurs, chez les rongeurs athymiques asymptomatiques, des observations par microscopie photonique semblent indiquer que le niveau de SFB adhérente n'est pas modulé, suggérant que les lymphocytes T n'influencent pas l'adhésion de la SFB à

l'épithélium (Klaasen *et al.*, 1993a). Ces données nécessiteraient d'être confirmées par les techniques de biologie moléculaire.

Il semblerait que l'un des mécanismes capable de contrôler le dialogue homéostatique qui s'établit entre l'hôte et la SFB soit associé aux SIgA, eux-mêmes fortement induits par la SFB. Cependant, l'absence de SIgA n'est pas systématiquement associée à une pathologie intestinale chez l'homme et d'autres mécanismes immunologiques innés ou/et adaptatifs sont susceptibles de compenser cette déficience et de maintenir l'homéostasie. Comment le dialogue hôte-SFB évolue-t-il dans un contexte d'immunodéficience sévère ?

Chez les souris SCID conventionnelles, qui n'ont pas de réponse immunitaire adaptative, il apparaît que le transfert de cellules naïves T $CD4^+$ isolées de la rate de souris Cv induit une colite associée à une altération des jonctions serrées de la barrière intestinale, détectée par immuno-histochimie des *zona occludens*. Les mêmes expériences de transfert dans des souris SCID axéniques ou monoassociées avec la SFB n'induit pas de colite ni d'altération de la barrière intestinale. En revanche la colonisation par un groupe de plusieurs bactéries choisies en association avec la SFB induit une colite et l'altération de cette barrière. De façon surprenante, la bi-association, ou dixénie, entre SFB et chacune des bactéries du mélange précédent n'induit pas de colite ni d'altération de la barrière intestinale. Les animaux qui présentent une colite ont une proportion de cellules $CD11b^+$ dans le chorion du côlon suggérant un recrutement de monocytes inflammatoires (Stepankova *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que la SFB semble potentialiser l'orientation pro-inflammatoire des réponses effectrices T $CD4^+$ en situation d'immunodéficience sévère, puisque sa présence semble nécessaire au développement de la colite mais n'est pas suffisante en monoxénie ou dixénie pour induire la colite. Néanmoins un certains nombres de paramètres manquent dans cette étude pour pouvoir conclure quant aux mécanismes. Par ailleurs, la détection de SFB uniquement dans la lumière intestinale ne permet pas de savoir si les niveaux de SFB adhérentes à la muqueuse sont comparables entre les différentes conditions.

De façon intéressante, il semble que la SFB puisse promouvoir le développement de pathologies inflammatoires au-delà du compartiment intestinal. En effet, des travaux menés dans des modèles animaux suggèrent un rôle potentiateur voir inducteur de la SFB dans des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques, par des mécanismes qui pourraient notamment impliquer les réponses Th17 (Wu *et al.*, 2010) (Lee *et al.*, 2011).

Les interactions qui s'établissent entre la SFB et son hôte semblent dépendre pour une part majeure de la génétique de l'hôte. En effet, la spécificité d'hôte de la bactérie suggère une coadaptation de la bactérie à son hôte. Bien que les mécanismes initiant cette interaction restent indéterminés pour le moment, l'adhésion particulière de la SFB à la cellule épithéliale intestinale de l'hôte pourrait être une des clefs du dialogue mutualiste qui s'établit entre les deux partenaires. Les IgA sécrétées dans la lumière intestinale semblent assurer en premier lieu, la régulation de ces interactions homéostatiques. Par ailleurs la forte capacité de la SFB à induire des réponses effectrices Th17 pro-inflammatoires pourrait contribuer au renforcement de l'effet barrière, empêchant la colonisation de la niche écologique de la bactérie par d'autres bactéries symbiotiques ou pathogènes. Néanmoins chez certains hôtes génétiquement prédisposés, la réponse Th17 induite par la SFB pourrait s'avérer délétère participant à initier ou à entretenir des maladies inflammatoires et/ou auto-immunes dans le compartiment intestinal et au-delà.

La détermination des mécanismes participant à initier les réponses immunitaires adaptatives IgA et Th/Treg qui s'établissent dans le chorion des souris monoassociées avec la SFB et la caractérisation de ces réponses ont été les objectifs principaux de mon travail de thèse.

Par ailleurs, le développement de nouveaux outils d'étude de la SFB, la culture *in vitro* de la bactérie, le développement d'anticorps monoclonaux, la réalisation d'une banque de clones génomiques permettant de tester, en systèmes cellulaires rapporteurs, l'induction *in vitro* de certaines voies de signalisation (NFκB ou PPARγ par exemple), permettra de vérifier certains des mécanismes identifiés et/ou d'en distinguer de nouveaux, notamment ceux qui sont en lien avec son adhésion à la cellule hôte intestinale.

Enfin, l'ensemble de ces recherches pourraient ouvrir la voie pour la découverte de nouvelles molécules, dérivées ou non de la SFB, au pouvoir immuno-régulateur comme cela a été réalisé avec le symbionte *Bacteroides fragilis* et son polysaccharide A, un composant de la paroi de la bactérie.

PRESENTATION DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

L'intestin héberge une masse considérable de bactéries qui, au cours de l'évolution avec leur hôte, ont établi des relations mutualistes permettant à chacun des partenaires de bénéficier de la présence de l'autre. L'étude de ces interactions symbiotiques a notamment permis de déterminer l'apport des symbiontes à la fonction digestive et métabolique de l'hôte (Tremaroli 2012). Par ailleurs, pour faire face à ces bactéries qui représentent une menace potentielle pour leurs hôtes, ceux-ci ont développé un système immunitaire sophistiqué qui, en étroite coopération avec l'épithélium intestinal, permet de construire une barrière immune efficace, finement régulée. Cette barrière immune permet non seulement de protéger l'hôte contre l'invasion par les bactéries pathogènes, mais aussi de circonscrire les bactéries symbiotiques dans la lumière intestinale au prix d'une réponse inflammatoire physiologique préservant l'intégrité des fonctions intestinales, notamment celles liées au métabolisme de l'hôte (Shulzhenko *et al*., 2011). De façon intéressante, un certain nombre de travaux ont permis de montrer l'influence majeure du microbiote intestinal sur la maturation post-natale de ce système immunitaire induisant notamment le recrutement dans le chorion intestinal de plasmocytes sécréteurs d'IgA et de lymphocytes T activés (Guy-Grand 1974) (Macpherson and Uhr 2004). Cependant, la caractérisation de la nature des réponses immunes mises en place sous l'influence du microbiote et l'identification des espèces bactériennes particulièrement promotrices n'est que plus récente.

Les études développées au laboratoire avant mon arrivée dans le groupe avaient pour but de répondre à ces questions, en s'intéressant plus particulièrement au rôle du microbiote sur le développement des réponses adaptatives T $CD4^+$. Celles-ci avaient permis de mettre en évidence que la colonisation de souris axéniques avec un microbiote murin conventionnel induisait l'expression de nombreux transcrits des réponses immunes innées et adaptatives de l'hôte. L'utilisation de différents modèles gnotoxéniques, souris axéniques colonisées à un temps donné par des bactéries choisies, isolées ou en groupe, avait en outre permis d'identifier le fort pouvoir immunostimulant de la SFB. La première partie de mon travail de thèse a consisté à compléter ce travail en étudiant plus particulièrement les profils de cytokines produites par les lymphocytes T $CD4^+$ isolés du chorion de nos différents modèles murins (axéniques, gnotoxéniques et conventionnels).

1- Rôle majeur de la SFB dans la maturation des réponses immunes intestinales adaptatives T

Valérie Gaboriau-Routhiau, Sabine Rakotobe, Emelyne Lécuyer, Imke Mulder, Annaïg Lan, Chantal Bridonneau, Violaine Rochet, Annamaria Pisi, Marianne De Paepe, Giovanni Brandi, Gérard Eberl, Johannes Snel, Denise Kelly, Nadine Cerf-Bensussan

(article publié en octobre 2009 dans Immunity)

Contexte L'homéostasie intestinale est influencée par les cytokines produites par les lymphocytes T qui s'établissent dans le chorion en réponse à la colonisation du tube digestif par le microbiote. Néanmoins, la nature des réponses T induites en condition physiologique et l'identité de la (ou des) bactérie(s) particulièrement promotrice(s) de ces réponses ne sont pas connues. **Méthode** Les réponses T mises en place dans l'intestin de souris axéniques colonisées par des bactéries individuelles ou en association, ont été caractérisées après 8, 20 et 60 jours de colonisation en combinant plusieurs approches : 1) une analyse transcriptomique, globale ou ciblée des marqueurs des différentes populations T sur des biopsies d'iléon et de côlon et, 2) l'analyse des cytokines produites par les lymphocytes isolés du chorion. **Résultats** La colonisation de souris axéniques adultes par un microbiote murin conventionnel induit le large spectre des réponses T $CD4^+$, à la fois pro-inflammatoires et régulatrices, détecté chez une souris conventionnelle du même âge. De façon remarquable, peu de bactéries ou groupes de bactéries, sont capables de récapituler l'ensemble de ces réponses. Cette propriété semble restreinte à la bactérie segmentée filamenteuse (ou SFB), une bactérie non cultivable, spécifique d'hôte, sporulée, appartenant au genre des *Clostridium*. **Conclusion** De façon inattendue, ces résultats suggèrent qu'un faible nombre de bactéries du microbiote intestinal, dont la SFB est le prototype, a été sélectionné au cours de l'évolution pour leur puissante capacité à promouvoir la maturation des réponses immunes adaptatives T de leur hôte.

Ces données révèlent le rôle majeur de la SFB dans la mise en place des réponses T $CD4^+$ intestinales et complètent d'anciens travaux qui suggéraient que cette bactérie est aussi un puissant inducteur des réponses IgA intestinales (Klaasen *et al*., 1993b). Le large spectre des réponses immunes adaptatives induites par SFB s'oppose aux réponses observées lors de la colonisation par d'autres bactéries, dominées essentiellement par des réponses IgA.

Contrairement à la majorité des bactéries commensales présentes dans le mucus et la lumière intestinale, où elles trouvent des conditions favorables à leur croissance, la SFB apparaît comme le prototype d'une classe rare de symbiontes qui adhère à l'épithélium intestinal. Ainsi, l'adhésion de la SFB, notamment à l'épithélium des plaques de Peyer, site important pour l'induction des réponses immunes intestinales, pourrait peut-être permettre la transduction de signaux à l'origine d'une activation massive des réponses immunes innées et adaptatives. A l'inverse, en l'absence d'adhésion, les bactéries du microbiote induiraient peu ou pas de réponse innée, des réponses IgA et peu ou pas de réponse T, dominée par une réponse T régulatrice (Geuking *et al*., 2011).

Nous avons alors cherché à déterminer les mécanismes à l'origine des fortes propriétés immunostimulantes de la SFB en nous appuyant sur l'étude des souris gnotobiotiques. Ces recherches ont constitué la majeure partie de mon travail de thèse.

2- Caractérisation des réponses immunes adaptatives intestinales en modèles murins gnotoxéniques: mise en évidence de différents sites d'initiation et mécanismes d'induction des réponses induites par la SFB

Emelyne Lécuyer, Sabine Rakotobe, Hélène Lengliné-Garnier, Corinne Lebreton, Catherine Juste, Nadine Cerf-Bensussan, Valérie Gaboriau-Routhiau

(article en cours de finalisation)

Contexte La maturation du système immunitaire en période post-natale est dépendante de la colonisation par le microbiote intestinal. Un nombre restreint de bactéries hôte-spécifiques semblent particulièrement compétentes pour cette fonction. Chez la souris, seule la bactérie segmentée filamenteuse (SFB) permet de récapituler le large spectre des réponses immunes intestinales, innées et adaptatives, observées en situation conventionnelle. L'attachement particulier de la SFB à l'épithélium intestinal, et notamment à celui des plaques de Peyer (PP), suggère une initiation des réponses immunes adaptatives intestinales dans ces structures. **Méthode** L'analyse des réponses immunes adaptatives intestinales, IgA et T $CD4^+$, de souris monocolonisées par la SFB ou par *E. coli* MG1655, choisie comme bactérie prototype des symbiontes non adhérents, est réalisée par ELISPOT et BioPlex, cytométrie en flux et PCR en temps réel, sur les cellules isolées du chorion, des PP et des ganglions

mésentériques, après 8, 20 et 60 jours de colonisation. La recherche du site d'initiation, folliculaire ou extra-folliculaire, de ces réponses adaptatives est menée chez des souris traitées par un antagoniste du récepteur à la lymphotoxine β. La stimulation polyclonale (anti-Fab ou anti-CD3/CD28) ou spécifique, par des lysats bactériens, des lymphocytes isolés des compartiments intestinaux et périphériques nous a permis de déterminer et de comparer la spécificité des réponses adaptatives intestinales induites dans les deux modèles gnotoxéniques. Enfin, l'importance d'une signalisation par les récepteurs de l'immunité innée (TLRs) est étudiée dans un modèle de souris MyD88/TRIF double-déficientes monocolonisées par SFB.

RESULTATS

Immunity
Article

The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses

Valérie Gaboriau-Routhiau,[1,2,*] Sabine Rakotobe,[1,2] Emelyne Lécuyer,[1,2] Imke Mulder,[3] Annaïg Lan,[3] Chantal Bridonneau,[1] Violaine Rochet,[1] Annamaria Pisi,[4] Marianne De Paepe,[2] Giovanni Brandi,[5] Gérard Eberl,[6] Johannes Snel,[7] Denise Kelly,[3] and Nadine Cerf-Bensussan[2]
[1]INRA, U910, Unité Ecologie et Physiologie du Système Digestif, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France
[2]INSERM, U793, Université Paris Descartes, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France
[3]Rowett Institute of Nutrition & Health, College of Life Sciences & Medicine, University of Aberdeen, Greenburn Road, Bucksburn, Aberdeen AB21 9SB, UK
[4]D.I.S.T.A., University of Bologna, Viale Fanin 44, 40127 Bologna, Italy
[5]Department of Hematology & Oncological Sciences "Seragnoli," Policlinico Sant'Orsola, University of Bologna, Via Massarenti 9, 40127 Bologna, Italy
[6]Institut Pasteur, Laboratory of Lymphoid Tissue Development, CNRS URA 1961, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
[7]NIZO Food Research, PO Box 20, 6710 BA Ede, The Netherlands
*Correspondence: valerie.gaboriau-routhiau@inserm.fr
DOI 10.1016/j.immuni.2009.08.020

SUMMARY

Microbiota-induced cytokine responses participate in gut homeostasis, but the cytokine balance at steady-state and the role of individual bacterial species in setting the balance remain elusive. Herein, systematic analysis of gnotobiotic mice indicated that colonization by a whole mouse microbiota orchestrated a broad spectrum of proinflammatory T helper 1 (Th1), Th17, and regulatory T cell responses whereas most tested complex microbiota and individual bacteria failed to efficiently stimulate intestinal T cell responses. This function appeared the prerogative of a restricted number of bacteria, the prototype of which is the segmented filamentous bacterium, a nonculturable *Clostridia*-related species, which could largely recapitulate the coordinated maturation of T cell responses induced by the whole mouse microbiota. This bacterium, already known as a potent inducer of mucosal IgA, likely plays a unique role in the postnatal maturation of gut immune functions. Changes in the infant flora may thus influence the development of host immune responses.

INTRODUCTION

Our bodies are home to trillions of commensal bacteria, 90% of which reside in our intestine. Only a restricted number of bacterial phylotypes colonize the intestine, indicating that strong selection pressures have shaped this microbial community (Ley et al., 2006). Although dependent on their capacity to adapt to the stringent conditions in the host intestine (Giraud et al., 2008) and to use host-derived substrates (Hooper et al., 1999), intestinal commensal bacteria can in return provide benefits to their host, including the breakdown of indigestible vegetal polysaccharides, the provision of fuel for colonic epithelial cells (Backhed et al., 2005), and a barrier against invasive pathogenic bacteria. In addition, the commensal gut microbiota orchestrates the postnatal maturation of gut immune defenses (Artis, 2008; Macpherson and Harris, 2004), which in turn preserve intestinal homeostasis and host integrity (Bouma and Strober, 2003). Deciphering the dialog between the microbiota and the host immune system should facilitate an understanding of how bacteria and their hosts coevolved to maintain mutually beneficial interactions. Recent work has placed emphasis on the innate immune system, illustrating how a complex signaling network involving host epithelial cells is elicited upon colonization, promoting the production of bactericidal peptides able to contain the microbiota in the lumen while also avoiding excessive proinflammatory signals harmful for both partners (Artis, 2008). B cell response to the microflora has also been highlighted (Macpherson, 2006). Colonization of germ-free (GF) mice elicits secretory IgA responses believed to play an important role in gut homeostasis by preventing luminal bacterial overgrowth (Fagarasan et al., 2002) and bacterial translocation (Macpherson and Uhr, 2004) and by minimizing flora-induced activation of the host oxidative system (Peterson et al., 2007). Host physiological T cell responses to the microbiota are less well delineated. Colonization by the commensal gut microbiota stimulates proliferation of lymphoblasts in Peyer's patch (PP) T cell areas and T cell immigration into the lamina propria (LP) and epithelium (Guy-Grand et al., 1974; Macpherson and Uhr, 2004). How the gut microbiota shapes intestinal helper T cell response at steady-state has recently stimulated much interest given the accumulating evidence of microbial dysbiosis in allergic (Kirjavainen et al., 2002) and inflammatory (Sokol et al., 2008) bowel diseases. Contradictory data regarding the capacity of the microbiota to stimulate proinflammatory and/or regulatory T cells have also been generated (discussed in Round and Mazmanian [2009]), perhaps resulting from compositional differences in the colonizing microbiota. This hypothesis is supported by recent evidence that specific members of the gut microbiota

can orientate host T cell responses (Ivanov et al., 2008; Mazmanian et al., 2008; Sokol et al., 2008) and/or by the newly recognized plasticity of helper T cell subsets (Zhou et al., 2009). By using gnotobiotic mouse models, we have investigated in depth the impact of the microbiota on host gut responses. Intestinal colonization orchestrated a broad spectrum of proinflammatory and regulatory T cell responses, which likely balance each other to maintain local homeostasis. Strikingly, little redundancy could be demonstrated between individual microbiota members in their capacity to stimulate steady-state gut T cell responses. This function appears the prerogative of a restricted number of bacteria, the prototype of which is the segmented filamentous bacterium (SFB), a nonculturable *Clostridia*-related host-specific species, which could largely recapitulate the immune-inducing effects of a complete conventional microbiota. Unexpectedly, these results suggest that only a restricted number of microbiota members have shaped host-immune T cell interactions during evolution.

RESULTS

Intestinal Colonization Simultaneously Drives Proinflammatory and Regulatory Immune Responses

Global transcriptomic analysis of terminal ileum tissues from healthy adult C3H/HeN GF, conventional (Cv), and conventionalized (Cvd) mice colonized with whole mouse fecal flora at adult age indicated that 45% of the genes induced by the microbiota could be assigned to immune response pathways, an effect evident at both 8 and 60 days (d) postcolonization (Figure 1A). Colonization had a strong and parallel impact on *Cd3e* transcription and T helper 1 (Th1)-type gene responses including *Interferon regulatory factor 1* (*Irf1), Interleukin (Il)18, Signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1)*, and *Interferon* γ *(Ifng)* (Figure 1B).

The nature and site of the physiological gut immune responses induced by the microbiota was further investigated with real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Comparison between GF and Cv mice and kinetics studies in Cvd mice showed that intestinal colonization resulted in the coordinated induction of a large panel of genes involved in innate and adaptive T cell immune responses, maximal in the terminal ileum (Table 1). For innate immune genes, the most important differences were noted for transcripts encoding IL-12p40, inducible nitric oxide synthase 2 (NOS2), and chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10 or IP10). *Il1b* and *Il6* mRNA were only modestly increased while mRNA encoding chemokine (C-X3-C) receptor 1 ligand (CX3CR1-L), chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (KC), IL-12p35, or IL-23p19 did not change (Table 1 and not shown). Analysis of T cell markers demonstrated that parallel to the increase in *Cd3e* mRNA and $CD3^+$ T cell numbers in LP (Table 1; Figure S1 available online), *Ifng* transcripts increased 30- to 40-fold in the mouse ileum upon colonization whereas *Il17* mRNA, detectable only in 2/15 tested GF mice, increased 1000- to 2000-fold. No change was observed in the transcription of *Il4* and *Il13* (not shown), but *Il10* and *forkhead box P3* (*Foxp3*) mRNA increased approximately 5- and 10-fold, respectively (Table 1). No significant changes in *retinoic acid-related orphan receptor (Ror)* γt (*Rorgt*) and *Rora* mRNA ($p = 0.7$ and $p = 0.07$, respectively) were detected parallel to the increase in *Il17* transcripts (Figure S2).

Cytokine production was next analyzed by BioPlex in the supernatants of lamina propria lymphocytes (LPL) from Cv and GF mice. Although CD3+CD28 stimulation induced very little cytokine secretion by LPL isolated from the ileum of GF animals, the same stimulation in ileal LPL from Cv mice resulted in the release of large amounts of IFN-γ, IL-17, IL-10, as well as of IL-4 and IL-13, the latter despite the lack of detectable mRNA increase (Figure 2A). Contrasting with the minor differences between GF and Cv mice in mRNA expression in the colon (Table 1), CD3+CD28 stimulation of LPL revealed the same striking difference in the capacity of colonic LPL from GF and Cv mice to produce cytokines as that observed in the ileum (Figure 2B). Taken together, these data suggested that intestinal colonization resulted in the combined induction of proinflammatory and regulatory T cells that disseminated along the whole intestine but were actively secreting cytokines only in the ileum.

Mucosal T Cell Responses Are Induced by a Restricted Number of Host-Specific Bacterial Species

To delineate which members of the microbiota are necessary to shape gut immune responses, the ileal transcriptomic responses were analyzed on d8, d20, and d60 after colonization of adult GF mice with complex or simplified microbiota. Because individual members of the microbiota such as *Bacteroides thetaiotaomicron* can reproduce the effect of the whole flora on intestinal metabolic changes (Hooper et al., 2001), we first assessed the impact of individual culturable strains representative of the two dominant bacterial phyla in the mammalian intestine, *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, and of *Escherichia coli*, a *Proteobacteria* species that colonizes the neonatal intestine. Despite a strong degree of colonization (10^8–10^9 colony-forming units [CFU]/g of feces), monocolonization by *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, and *E. coli* MG1655 did not modify mRNA expression for any of the studied immune genes and at all studied time points when compared to GF mice (not shown). Similar results were obtained with three distinct *Clostridium* strains (*Firmicutes*) derived from the mouse altered Schaedler's flora (ASF; not shown). These data suggested that efficient induction of mucosal responses might require a complex microbiota.

Surprisingly, colonization of GF mice with a fresh whole complex human fecal microbiota (humanized mice; Hum) failed to stimulate the transcription of most studied immune genes (Figures 1A, 1B, and 3A). Furthermore, when using Affymetrix to compare the numbers of genes changing in Cv mice with GF mice and mice colonized with either human or mouse flora, greatest differences were noted with human flora and GF mice, indicating that these mouse groups were most different from the Cv group (Figure 1C). Hierarchical clustering of immune system-related genes by heatmaps corroborated that Cv mice clustered with Cvd mice whereas Hum mice clustered with GF mice (Figure 1B). This result was unexpected given the degree of colonization of Hum mice (10^8–10^9 CFU/g of feces) and the large representation of the major bacterial groups initially present in the human stools as demonstrated by fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of fecal samples (Figure 3B). To explain the disparity between human and mouse flora effects, we postulated that the mouse flora contained specific bacterial

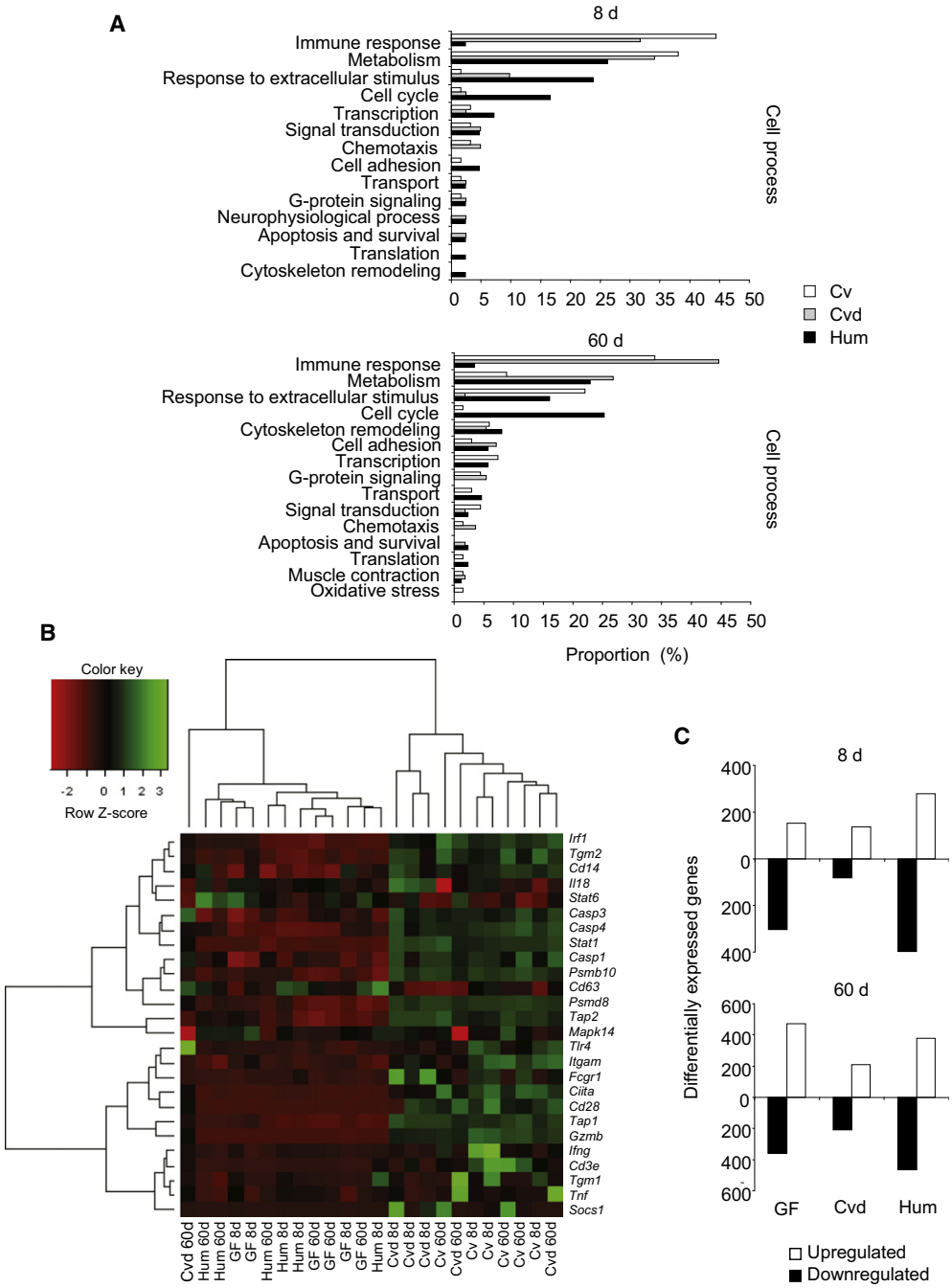


Figure 1. Conventional Mouse Microbiota Induces a Vast Repertoire of Intestinal Immune Responses

(A) RNA from ileal tissue of conventional (Cv), germ-free (GF), and mice colonized with whole mouse fecal microbiota (Cvd) or whole human fecal microbiota (Hum) for 8 and 60 days (n = 3/group) was hybridized to the Affymetrix NuGO Mouse Array (NuGO_Mm1a520177). Data were normalized with gcRMA and adjusted for multiple testing via the Benjamini Hochberg false discovery method ($p < 0.05$). Differentially expressed genes ($p < 0.05$) relative to the GF group were imported into GeneGo MetaCore analytical software to determine the significantly enriched canonical pathways in each group. Data represent the distribution (percent) in cell process categories of statistically significantly enriched pathways ($p < 0.05$).

(B) Heatmap generated from immune system-related genes significantly expressed ($p < 0.05$) between all treatments after 8 and 60 days. Columns represent individual arrays, and rows specific genes of interest. The Z-score depicts a measure of distance, in standard deviations, away from the mean. The relative value for each gene is depicted by color intensity, with green indicating higher expression and red depicting lower expression.

(C) Affymetrix microarray analysis of differentially expressed genes in GF, Cvd, and Hum mice relative to Cv (n = 3/group). Bar graphs represent number of genes higher expressed (open bar; fold change > 2, $p < 0.05$) and lower expressed (black bar; fold change < −2, $p < 0.05$) in each treatment relative to the Cv group after 8 and 60 days of colonization.

Table 1. Changes in Intestinal Gene Expression in Mice Colonized with Complex Mouse Microbiota

	Fold Increase (Relative to Germ-free)									
	Cv				Cvd			Cult		
					Ileum			Ileum		
	Duod	Cecum	Colon	Ileum	d 8	d 20	d 60	d 8	d 20	d 60
Gene	n = 8	n = 8	n = 8	n = 12	n = 5	n = 4	n = 5	n = 10	n = 8	n = 9
Nos2	nd	nd	nd	**11.4**	**4.8***	**13.3**	**11.6**	**1.8**	**1.9**	**3.9**
Cxcl10	2.1	1.6	0.7	**8.4**	**20.2**	**18.4**	**10.2**	1.2	1.7	**1.7**
Il1b	1.7	**2.4**	0.6	**3.5**	**3.8**	**6.4**	**5.0**	1.3	1.4	**1.7**
Il6	**2.0**	**1.4**	0.7	**2.4**	**4.7**	1.2	**1.8**	1.0	1.7	**1.5**
Il12p40	**4.5**	1.1	0.4	**24.5**	**21.6**	**25.9**	**31.4**	**2.1**	**4.0**	**2.9**
Cd3e	**2.9**	0.9	1.6	**10.6**	**2.8***	**6.7***	**10.5**	0.8	0.9	0.9
Tnfa	nd	nd	nd	**4.0**	**2.9**	**4.5**	**4.2**	0.7	0.9	1.2
Ifng	**5.8**	1.5	1.2	**40.2**	**28.4**	**30.3**	**31.9**	1.3	2.5	1.2
Il17	**322.3**	**87.8**	**11.0**	**1016.1**	**35.5***	**1616.4**	**1958.2**	5.4	2.5	3.0
Il10	**5.6**	**5.6**	2.3	**6.3**	**4.4**	**4.3**	**4.3**	**2.3**	**3.1**	**1.4**
Foxp3	1.9	0.6	**1.5**	**8.7**	**5.2**	**5.1**	**10.8**	0.9	2.0	**1.4**

Relative increase compared to GF mice (n = 15) of mRNA levels in duodenum (duod), ileum, cecum, and colon of Cv mice and in ileum of mice colonized with the whole mouse fecal microbiota (Cvd) or its cultured fraction (Cult, pool of two independent experiments) at d8, d20, and d60 postcolonization. Significant median fold increases with GF are in bold ($p < 0.05$).
*$p < 0.05$ between Cvd and Cv mice by a nonparametric Kruskal-Wallis test.
nd: not done.

species capable of stimulating immune activity in the gut over and above that induced by the predominant microbial groups commonly found in both human and mouse gut microbiota.

As a first step to delineate which components of the mouse microbiota might be necessary to efficiently induce mucosal innate and adaptive immune responses, GF mice were colonized with the cultured bacterial fraction from feces of Cv mice (Cult mice). Despite normal colonization (10^8–10^9 CFU/g of feces), induction of proinflammatory genes was very low. An increase in *Foxp3* and *Il10* mRNA expression was observed compared to GF but only in some animals (Figure 3A; Table 1). In keeping with mRNA data, the numbers of LP $CD3^+$ cells in ileal tissue sections and of effector $CD62L^-CD44^+CD4^+$ T cells in isolated LPL increased only very modestly compared to GF mice (Figure S1). Cytokine production was next analyzed in LPL isolated from ileum and colon and stimulated by anti-CD3+CD28 (Figure 2). For all cytokines tested, their release by LPL was much lesser in Cult than in Cv mice. Moreover, no significant difference with GF mice was observed for IFN-γ and IL-10 in both ileum and colon, whereas IL-4 and IL-13 production by ileal but not colonic LPL was modestly increased. An increased release of IL-17 was, however, observed, notably by ileal LPL from one Cult mouse (which also produced substantial amounts of other cytokines). Yet, median IL-17 secretion by colonic and ileal LPL was, respectively, 5- and 15-fold less than in Cv mice (Figure 2). Collectively, these results suggested that cultured flora were depleted in species able to efficiently stimulate intestinal adaptive T cell responses.

Efficient Induction of Intestinal T Cell Responses Depends on *Clostridia*-Related Sporulated Species

To assess the possible loss of specific species, the composition of the microbiota was compared by FISH in the feces of Cv mice used as donors of the culturable flora and of Cult mice on d8, d20, and d60 postcolonization. Although the flora of Cult mice remained highly diverse, a reduction in the proportion of bacteria in the *Clostridium coccoides* group was noted in both experiments (Figure 3B). A selective loss of bacteria from the *Clostridium* family was also observed when comparing the microbiota in the donor human stools and in the feces of Hum mice (Figure 3B, bottom). These results led us to hypothesize that host-specific, *Clostridia*-related bacterial species enriched in the nonculturable fraction of the flora were necessary to promote efficient maturation of the intestinal adaptive T cell responses.

Clostridia are typically sporulated bacteria enriched in the heat-resistant fraction of the microbiota. Therefore, adult GF mice were colonized with fecal heat-resistant microbiota from Cv mice (Spo mice). Colonization rose between 5×10^8 and 2×10^9 CFU/g of feces. qRT-PCR analysis showed a marked increase in ileal mRNA expression for all tested immune markers, comparable on d20 and/or d60 postcolonization with that observed in Cvd mice (Figure 4A and not shown). These results supported the hypothesis of a key role of one or several spore-forming bacteria related to the *Clostridia* class. One possible candidate bacterium was SFB, a *Clostridia*-related unculturable bacterium found in the normal intestine of all studied species, which demonstrates host-specific attachment to the ileal epithelial surface (Klaasen et al., 1992; Snel et al., 1995). SFB is a potent stimulus of the mouse intestinal IgA response (Klaasen et al., 1993; Talham et al., 1999) and induces the recruitment of intraepithelial lymphocytes (IEL) (Umesaki et al., 1995). The role of this bacterium was tested with mice colonized with SFB previously purified from the mouse ileum and kept as a single species by passage in GF mice (Klaasen et al., 1991).

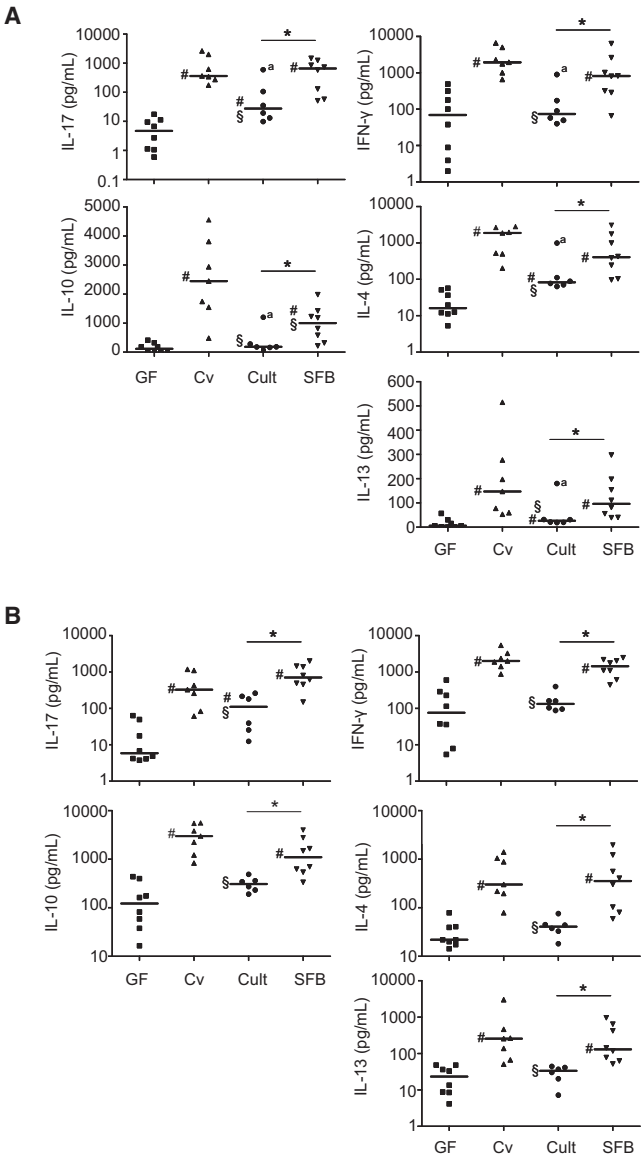


Figure 2. Cytokine Synthesis by Ileal and Colonic LPL Depends on the Composition of Intestinal Microbiota

Ileal (A) and colonic (B) LPL were isolated from GF and Cv mice and from mice colonized for 20 days with SFB or the cultured mouse microbiota (Cult). After a 72 hr stimulation by anti-CD3+CD28, cytokines were measured in culture supernatants by BioPlex. Data represent individual values and medians (n = 6–8/group). #, §, and *, $p < 0.05$ by a nonparametric Kruskal-Wallis test as compared to GF, Cv, and SFB, respectively. One Cult mouse (a) exhibited stronger ileal responses than other animals in the same group. In all groups, cytokine production by unstimulated LPL was <20 pg/mL (not shown).

SFB Is a Key Inducer of Intestinal T Cell Responses

Colonization of GF mice by SFB was first ascertained by RT-PCR with specific primers. A strong positive signal (absent in GF mice) was observed on d8 and d20 postcolonization, which decreased on d60 (Figures 4B and 4C). Analysis of cecum contents by temporal temperature gel electrophoresis indicated monocolonization by SFB (not shown). The presence of SFB was confirmed by scanning microscopy, which showed numerous bacteria with the typical rod-like and filamentous morphology anchored into ileal epithelial cells on d20 postcolonization (Figure 4D). Consistent with PCR data and previous observations (Snel et al., 1998), few adherent bacteria remained visible in the ileum on d60, although they were found in large amounts in the cecum.

The study of monocolonized mice demonstrated the major inducing role of SFB. Affymetrix analysis of all differentially expressed genes revealed closest similarity between SFB-colonized and Cv mice at d8 postcolonization (Figure S3). Analysis at this time point showed strong clustering between Cv and Cvd mice on the one hand and GF and Hum mice on the other hand, with SFB mice occupying an intermediate position (Figure 4E). The immune pathway most affected in Cv, Cvd, and SFB mice was related to bacterial interactions at mucosal surfaces and involved Toll-like receptor (TLR) signaling, induction of *RegIIIg* defensin mRNA, IFN-γ, and IL-1β driving Th1 cell events (Table S1 and Figure S4). Analysis of ileal cytokine transcripts by qRT-PCR showed a progressive increase in *Il10* and *Ifng* mRNA in SFB mice comparable to those in Cvd mice at d60 postcolonization, a striking increase in *Il17* mRNA expression similar at d8 to the one observed at d20 in Cvd mice and in mice colonized with the sporulated fraction of the microbiota (Figure 4A). Perhaps because of the reduction of adherent SFB in the ileum over time, *Il17* mRNA expression decreased on d60. This suggestion was consistent with Affymetrix data showing divergent responses between SFB and Cv mice at d60 (Figure S3). *Foxp3* mRNA increased 3.4-fold on d8 but also decreased at later time points. These changes correlated with the induction of *Cd3e* mRNA and an increase in $CD3^+$ T cells in ileal tissue sections (Figure 4A; Figure S1). Among innate markers, changes as compared to GF mice were noted for *Nos2* mRNA which increased 3.4-fold on d8 and 6-fold on d60, and *Il12p40* mRNA increased at later time points (32-fold on d60), particularly in mice with high *Ifng* mRNA expression (not shown). As previously observed in Cv mice, the increase in cytokine mRNA expression compared to GF mice was much less in the colon (Table S2).

Analysis of isolated LPL confirmed that colonization by SFB simultaneously induced strong Th1, Th2, Th17, and regulatory T cell responses. Thus, ileal and colonic LPL isolated from SFB mice on d20 (Figure 2) and d60 postcolonization (not shown) released amounts of IL-17, IFN-γ, IL-4, and IL-13 comparable to LPL isolated from Cv mice. A robust release of IL-10 was also observed, although secretion by ileal LPL was less than in Cv mice. Strikingly, median concentrations of cytokines released by LPL were 5- to 11-fold higher in SFB than in Cult mice and even 25-fold higher for IL-17 in the ileum (Figure 2). Flow cytometry analysis of LPL from small intestine and colon indicated that, in SFB as in control Cv mice, more than 95% of IL-17-producing cells were $CD4^+TCR\text{-}\alpha\beta^+$ lymphocytes (80%–85% of $CD3^+$ LPL). These cells, scarce or absent in GF mice, increased 30- and 100-fold, respectively, in the small intestine and colon of SFB mice at d20 (Figure 5). The majority of IFN-γ- and IL-10-producing cells were also $CD4^+$ T cells. They were present in GF mice, but their absolute numbers increased in SFB and Cv mice (Figure 5). $CD8^+TCR\text{-}\alpha\beta^+$ cells (~15% of $CD3^+$ LPL) contained rare IL-10^+ cells (0.5%, 1.5%, and 2.5% in GF, SFB, and Cv mice, respectively) and more numerous IFN-γ^+ cells (~15% in GF and SFB

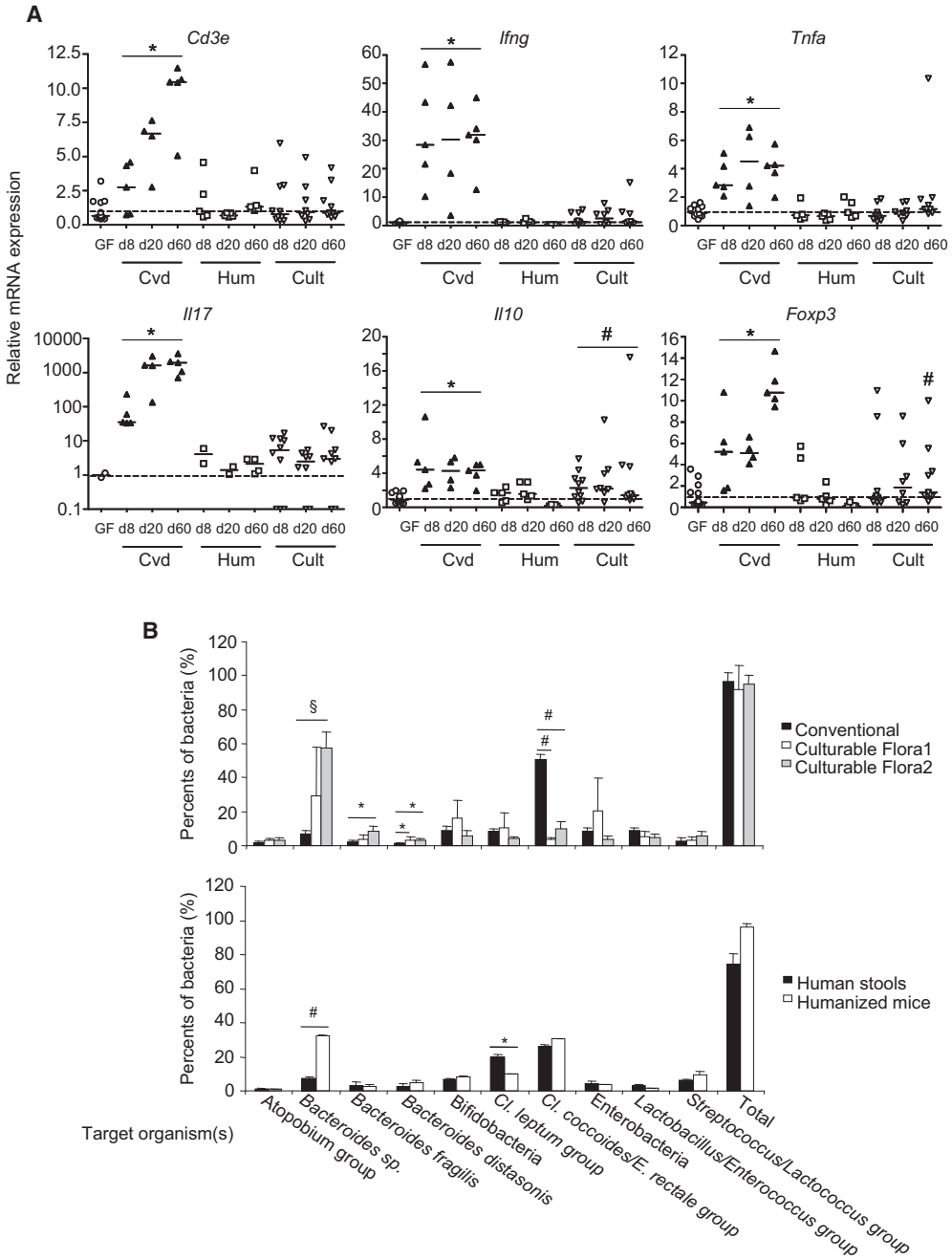


Figure 3. A Restricted Number of Host-Specific Microbial Species Induce Mouse Intestinal Adaptive T Cell Responses

(A) Ileal gene mRNA expression was analyzed by qRT-PCR on d8, d20, and d60 postcolonization in Cvd, Hum (n = 4–5/group), and Cult (n = 8–10, data pooled from two independent experiments) mice. mRNA expression is relative to GF mice (defined as 1; dotted line; n = 10). Data represent individual values and medians. *p < 0.01, #p < 0.05 by a nonparametric Kruskal-Wallis test as compared to GF.

(B) Bacterial composition in feces of Cult mice (n = 3; two independent experiments with Flora1 [open bar] and Flora2 [gray bar] are shown) and Hum mice (n = 4; open bar) on d20 was analyzed by FISH and compared with that in Cv mice (n = 4; black bar; upper panel) or original human stools (black bar; lower panel), respectively. Results in Cv mice are representative of three independent experiments. Bar graphs show mean ± SD. *p < 0.05, #p < 0.001, §p < 0.005 by a nonparametric Kruskal-Wallis test as compared to initial equilibrium in Cv feces or human stools.

mice and 25% in Cv mice). IFN-γ was also detected in 15%–25% of $CD3^{-}CD11c^{+}$ cells, but the contribution of this subset to local IFN-γ production is minor because they represent ~1% of $CD45^{+}$ LPL (not shown). Notably, a comparable proportion of $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ LPL was present in the small intestine and colon of GF mice and of mice colonized with SFB for 20 days, but their numbers increased 2- to 3-fold in both sites in the later mice (Figure 5; Figure S5).

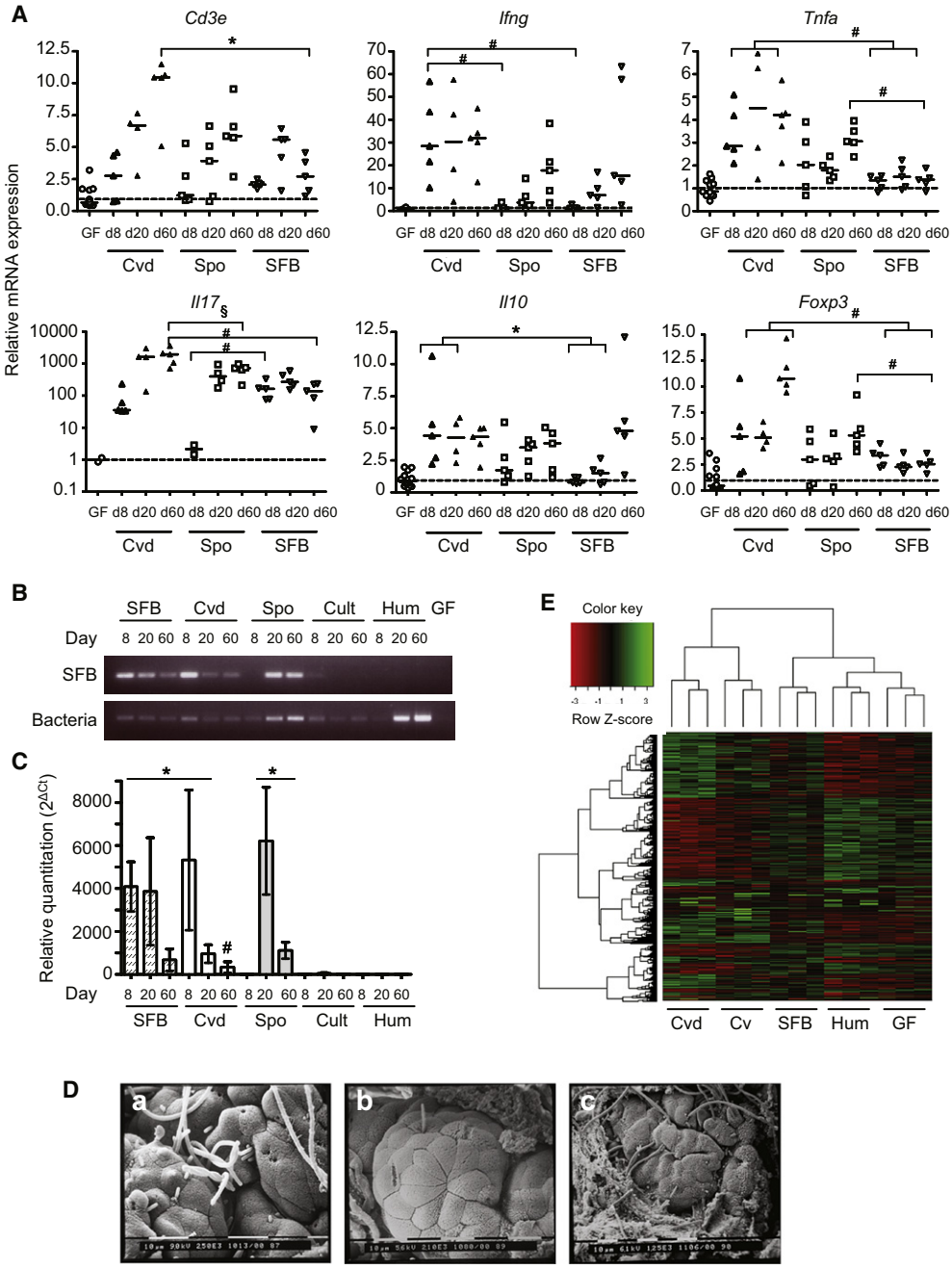


Figure 4. SFB Is Central to the Induction of Mouse Intestinal Immune Responses

(A) Ileal gene mRNA expression was analyzed in Cvd mice and in mice colonized with either the sporulated fraction of the fecal microbiota (Spo) or SFB (n = 4–5 mice/group). #$p < 0.01$, *$p < 0.02$, §$p < 0.05$ for intergroup comparison by a nonparametric Kruskal-Wallis test.

(B and C) Ileal tissues from SFB, Cvd, Spo, Cult, and Hum mice were analyzed by qRT-PCR with SFB- and total bacteria-specific 16S rRNA primers (SFB and Bacteria, respectively) at d8, d20, and d60 postcolonization and in age-matched GF mice. Results are presented as amount of target accumulated at end-point of PCR (B) and as a relative quantity assessed by the threshold cycle (Ct) method ($2^{\Delta Ct}$) compared to GF calibrator (C). Bar graphs show mean ± SEM (n = 4–5 mice/group). *$p < 0.01$, #$p < 0.05$ as compared to GF.

(D) Scanning electron microscopy of intestine in mice colonized with SFB: (a) ileum on d20, ileum (b) and cecum (c) on d60.

(E) Heatmap generated from the list of significantly expressed genes ($p < 0.05$) between all treatments after 8 days. The relative value for each gene is expressed as in Figure 1.

Collectively, these results indicated that SFB was a critical component of the normal microbiota able to efficiently drive the coordinated maturation of intestinal T cell adaptive functions. To further demonstrate that SFB was pivotal to the immunostimulatory properties of the flora, SFB presence was assessed by specific qRT-PCR in the different models of gnotobiotic

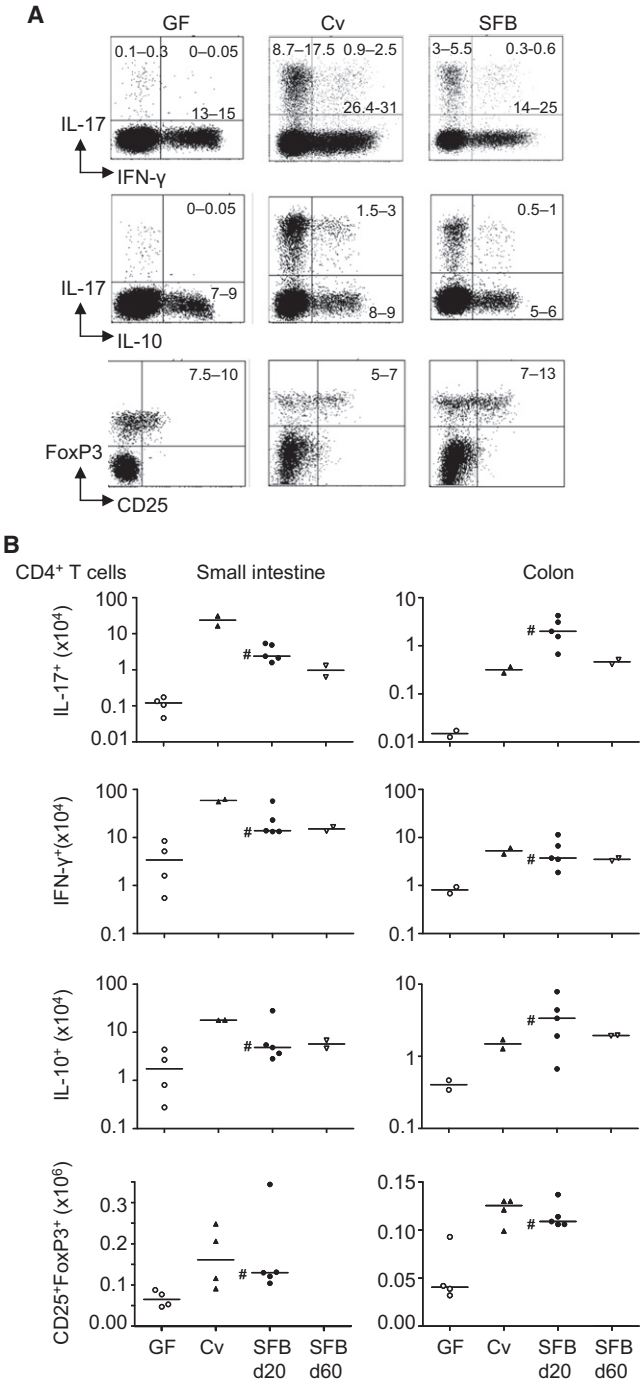


Figure 5. SFB Induces a Wide Spectrum of Intestinal CD4+ T Cell Responses

(A) Small intestinal LPL from mice GF, Cv, and colonized with SFB for 20 days were stimulated for 4 hr with PMA+ionomycin in the presence of brefeldin A, and viable CD45+ cells were examined for intracellular expression of IL-17, IL-10, IFN-γ, and FoxP3 and membrane expression of CD3, CD8, CD4, CD25, TCR-αβ, and CD11c. Plots are gated on CD4+ T cells. Numbers in the quadrants indicate ranges of positive cell percentages (n = 2–5 mice/group).

(B) Absolute numbers of cytokine- and CD25+FoxP3-positive CD4 T cells in the small intestine and colon. Individual values and medians are shown. #p < 0.05 compared with GF by a nonparametric Kruskal-Wallis test.

mice. As shown in Figures 4B and 4C, a strong signal for SFB was detected in the ileum of all gnotobiotic mice developing innate and/or adaptive T cell responses whereas no signal was observed in mice colonized with the human or the mouse culturable flora. Interestingly, in mice colonized with the sporulated flora, which show very low or no T cell response before d20, the SFB signal was undetectable on d8 and became detectable only at later time points. Altogether these results support the hypothesis of the key role of SFB in the induction of intestinal adaptive T cell responses.

SFB Is a Privileged Inducer of PP T Cell Responses

Previous studies have provided strong evidence that adaptive T cell responses to the gut microbiota are initiated in PP (Guy-Grand et al., 1974). Pioneering work by Cebra's group associated the strong induction of intestinal IgA by SFB (confirmed herein in Figure S6) with its elective capacity to stimulate germinal center B cells and CD4+CD45RB^{lo} T cells in PP (Talham et al., 1999). Scanning microscopy revealed a striking adherence of SFB to the surface of PP in mice monoassociated with SFB whereas, in Cult mice, only small numbers of bacteria were observed in the vicinity of PP, most if not all of which were non-adherent and associated with the mucus (Figure 6A). Consistent with the hypothesis that adherence to the PP might be central to promoting the initiation of T cell responses, monocolonization with SFB resulted in the strong induction of mRNA encoding *Il17*, *Il10*, and *CD40 ligand* (*Cd40l*), and a more modest increase in *Ifng* mRNA in PP (Figure 6B). These changes were comparable to those observed in Cvd mice and contrasted with the lack of detectable mRNA induction in PP of Cult mice. CD3+CD28-stimulated PP lymphocytes from Cvd, SFB, and Cult mice synthesized increased amounts of IFN-γ, IL-17, and IL-10 compared to GF mice (Figure 6C). The amount of IL-10 and IL-17 produced by PP lymphocytes was, however, approximately 10-fold higher in SFB than in Cult mice and therefore comparable to those in Cvd mice. Altogether these data stressed the elective immunostimulatory effect of SFB on PP.

DISCUSSION

The compelling role of the immune system in "tolerating" the gut microbiota has been greatly re-enforced by the increasing evidence that defects in both immune response and microbial recognition genes are central to the onset of inflammatory bowel diseases in genetically predisposed individuals (Bouma and Strober, 2003). Our study, indicating that almost 50% of the genes regulated in response to microbial colonization cluster to immune response pathways, further underscores the central role of the immune system in the dialog between the host and its microbiota. Consistent with most recent reports (Atarashi et al., 2008; Ivanov et al., 2008; Niess et al., 2008; Zaph et al., 2008), we confirm that the gut microbiota is a potent stimulus of Th17 cell differentiation. In addition, we demonstrate that intestinal colonization induces a striking range of T cell functions and simultaneously stimulates T cells of Th17 but also Th1, Th2, and regulatory cell phenotype. Previous studies have suggested a large functional redundancy in the capacity of microbial species to elicit host innate epithelial cell defenses (Artis, 2008) and secretory IgA responses (Macpherson, 2006). Our work provides

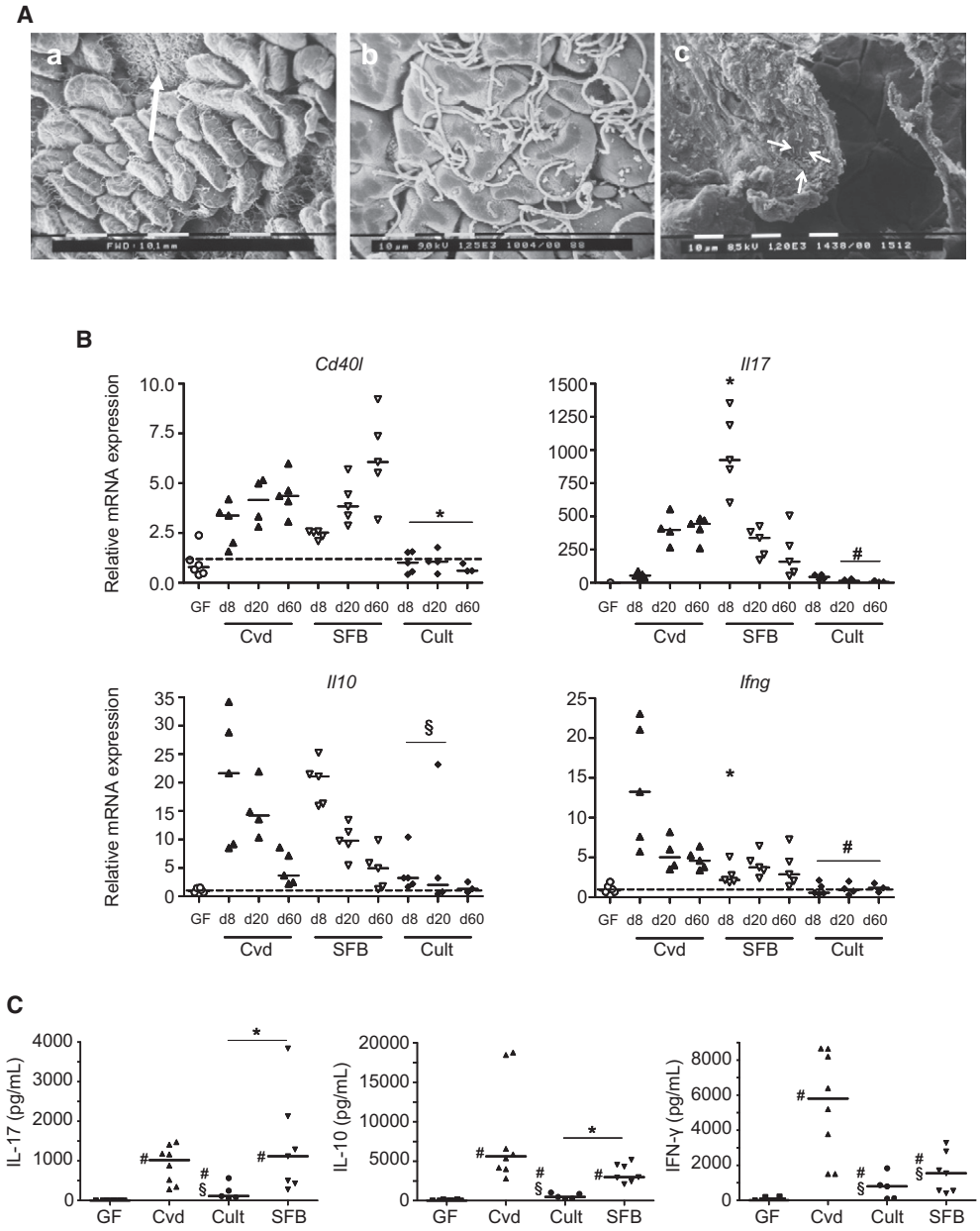


Figure 6. SFB Stimulates Peyer's Patches T Cell Responses

(A) Scanning electron microscopy of PP area in mice colonized with SFB (a and b) or Cult flora (c) for 20 days. SFB are seen adherent to PP (a; large arrow) or entering the PP epithelium (b) while bacteria from the Cult flora are seen in the mucus away from the epithelium surface (c; thin arrows).

(B) mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in PP of Cvd, SFB, and Cult mice at indicated days postcolonization. Individual values and medians are shown. Data are expressed as in Figure 3. *$p < 0.01$, #$p < 0.02$, §$p < 0.05$ by a nonparametric Kruskal-Wallis test when compared to Cvd mice.

(C) Cells isolated from PP of Cvd, SFB, and Cult mice on d20 postcolonization or age-matched GF mice were stimulated by anti-CD3+CD28 and cytokine production assessed by BioPlex. Individual values and medians are shown. #$0.001 < p < 0.05$, compared with GF. §$p < 0.05$, *$p < 0.01$ as compared with Cv or SFB, respectively.

unexpected evidence that, in immunocompetent mice, efficient maturation of innate and adaptive gut immune T cell responses depends on selected host-specific species enriched in the unculturable *Clostridia*-related fraction of the microbiota. One prototype strain is SFB, which can alone orchestrate the wide repertoire of T cell responses inducible by a total microbiota.

Analysis of mRNA expression in the whole gut tissue was performed to obtain an instant view of local immune reactions at different intestinal sites in response to the colonizing microbiota. One surprising observation was the dominant impact of the normal complete mouse microbiota on ileal mRNA responses. Whereas the moderate duodenal response may be explained

by the low local concentration of bacteria, the weak response observed in the cecum and colon is paradoxical given the much higher bacterial density. Expansion of cytokine-producing $CD4^+$ T cells was, however, observed in the colonic LP of Cv mice, indicating that T cells primed upon bacterial exposure can migrate into the colonic LP but that they remain quiescent in physiological conditions. This may be explained by the very limited access of bacteria to the colonic surface, which is protected by an inner firmly adherent and dense layer of sterile mucus not found in the ileum (Johansson et al., 2008).

Recognizing the ileum as a good indicator of the capacity of the microbiota to stimulate maturation of mucosal effector T cell responses, we analyzed this gut segment to evaluate the respective immune-potentiating role of individual bacteria and/or of complex flora. Unexpectedly, this analysis pointed out the privileged role of host-specific unculturable *Clostridia*-related species and particularly of SFB. In striking contrast to colonization with human fecal and mouse culturable microbiota, monocolonization with SFB resulted in a rapid upregulation of a broad range of ileal transcripts. Analysis of isolated LPL confirmed that SFB alone could orchestrate the differentiation of a large spectrum of both proinflammatory and regulatory $CD4^+$ T cells that distributed into the small and large intestines. The broad effect of SFB seems at odds with recent work suggesting that distinct individual bacteria have a specific impact on IL-10 or IL-17 responses, respectively (Ivanov et al., 2008; Mazmanian et al., 2008; Sokol et al., 2008). Yet, recent studies have also emphasized the plasticity of helper T cells and shown that a common RORγt precursor can differentiate into either Th17 or regulatory T cells depending on the local concentrations of IL-6 (Lochner et al., 2008; reviewed in Zhou et al., 2009), whereas conversion of Th17 into Th1 cells can be obtained in the presence of IL-12 (Lee et al., 2009). Consistent with this hypothesis, small subsets of double-positive IL-17-IL-10 and IL-17-IFN-γ cells were detected in LPL. It is therefore conceivable that a spectrum of $CD4^+$ T cell subsets can arise from undifferentiated Th cells in response to SFB. This is not contradictory with a more specific function of other bacteria. Induction of *Foxp3* and/or *Il10* mRNA was observed in a few mice colonized with culturable flora, stressing the possibility that some culturable species alone or in association with SFB may promote the induction of regulatory T cells. Finally, our data do not exclude that some other species either culturable or nonculturable share some of the immunostimulatory properties of SFB. Thus, a substantial induction of cytokine-producing cells was observed in the ileum of one Cult mouse.

Previous studies in gnotobiotic adult mice have demonstrated the potent inducing effect of SFB on the intestinal IgA response (Talham et al., 1999) as well as on the activation and recruitment of $CD8\alpha\beta^+$ TCR-$\alpha\beta^+$ IEL (Umesaki et al., 1995). Our present data unravel a unique function of SFB in the induction of intestinal $CD4^+$ T cell responses. Microarray data also suggest that SFB can elicit *RegIIIg*, a microbicidal lectin produced by enterocytes and Paneth cells that contributes to host innate protection against Gram-positive bacteria (Vaishnava et al., 2008). Altogether, these results suggest a unique role of SFB in coordinating the postnatal maturation of gut immune functions. Colonization of adult GF mice is unlikely to fully recapitulate colonization of newborn mice. Yet, SFB is detected strongly attached to the ileum of rodent species at time of weaning, coincident with the disappearance of IgA provided by maternal milk and when the postnatal maturation of the gut adaptive immune system is initiated (Klaasen et al., 1992). These observations support the notion that the immunostimulatory effects of SFB can operate during physiological colonization from birth.

The mechanisms underlying the prominent role of SFB in the induction of mucosal adaptive immune responses remain to be elucidated. Strikingly, scanning electron microscopy demonstrated that SFB, in contrast to bacteria present in the culturable flora, developed tight interactions with the luminal surface of PP. Extending previous observations (Talham et al., 1999), we showed that colonization by SFB induced a robust stimulation of PP almost comparable to that observed in Cvd mice and much stronger than that induced by the culturable flora. The elective capacity of SFB to adhere and presumably enter PP may be instrumental in promoting intestinal adaptive immune responses. Thus, a recent study in mice indicates that the capacity of invasive *Salmonella* to drive a specific, presumably T cell-dependent, IgA response relies solely on their ability to enter into PP (Martinoli et al., 2007). Along similar lines, the efficient induction of pathogen-specific T cells in response to *Salmonella* required the activation of the specialized subset of $CCR6^+$ dendritic cells present in the dome of PP (Salazar-Gonzalez et al., 2006). The host specificity in SFB attachment (Klaasen et al., 1992) may thus explain the lack of mRNA cytokine induction in response to a whole human flora. Altogether, these data support the hypothesis of a specific receptor(s) or adherence factor(s), the identification of which may have to await sequencing of this unculturable bacterium. The additional contribution of innate immune receptors is, however, highlighted by the transcriptional upregulation of genes encoding innate cytokines and of *RegIII*γ, induced in Paneth cells via MyD88-dependent signals (Vaishnava et al., 2008). Moreover, the gene pathway analysis performed on the ileal tissues points out the activation of TLR2 and TLR1 signaling. The specificity of SFB-induced immune responses remains elusive. In preliminary experiments, LPL did not proliferate or produce cytokines in response to sonicates of SFB purified from the cecal content (data not shown). Such extracts may not be appropriate to assess T cell responses. Yet, a striking contrast between the high amounts of total IgA induced by SFB and their very low specificity ($\sim$1%) has been reported, suggesting a prominent polyclonal effect of SFB (Talham et al., 1999).

Another unsolved question concerns the selective pressures that have led to the persistence of SFB in the intestine of all studied species so far. Avoidance of proinflammatory responses is a strategy expected to be beneficial both for the host and for their commensal bacteria. Yet some bacteria may utilize the host inflammatory responses to eliminate competitors and promote microniche colonization (Stecher et al., 2007). SFB may operate in this way within the gut ecosystem. Clearly, the degree of inflammation induced by SFB in an immunocompetent host is too low to result in intestinal damage but may provide an important advantage to protect the host. In this context, it is noticeable that individuals with either T cell or IFN-γ deficiencies are at risk of developing severe local or systemic infections (Bustamante et al., 2008). Production of moderate amounts of IFN-γ and IL-17 may help optimizing local protective bactericidal

mechanisms and reducing infection risk in immunocompetent hosts. Conversely, RegIIIγ and the strong IgA response induced by SFB may provide feedback mechanisms that limit the population size of SFB and avoid excessive local proinflammatory responses (Fagarasan et al., 2002; Suzuki et al., 2004). Interestingly, no colitis was observed in SCID mice reconstituted with $CD45RB^{hi}$ $CD4^{+}$ T cells and colonized with either SFB alone or a specific pathogen-free flora, but inflammation was triggered upon cocolonization (Stepankova et al., 2007). SFB might thus become pathogenic in genetically predisposed hosts depending on the local bacterial environment and perhaps participate in inflammatory bowel diseases, notably Crohn's disease.

In conclusion, the maturation of intestinal T cell responses in an immunocompetent host appears the prerogative of a restricted number of commensal species able to develop host-specific interactions. A prototype strain is SFB, which strongly adheres to the ileal mucosa and to PP. That only restricted members of the normal flora can stimulate mucosal T cell responses supports the notion that changes in the infant flora may influence the development of host immune responses and thereby the susceptibility to inflammatory and autoimmune diseases.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

All procedures were carried out in accordance with European guidelines. Cv and GF C3H/HeN mice were bred at the INRA facilities in Jouy-en-Josas. GF and gnotobiotic mice were maintained in plastic isolators and fed ad libitum on a commercial diet (R03-40; UAR) sterilized by γ-irradiation (40 kGy).

Colonization Experiments

GF female 8- to 9-week-old mice were gavaged twice at a 24 hr interval with 0.5 ml of: fresh anaerobic cultures of *Escherichia coli* MG1655, *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29148), *Bacteroides vulgatus* L16 (UEPSD collection), or ASF-derived *Clostridium* strains 502, 500, and 356 (Taconic), fecal homogenate from SFB monoassociated mice (Klaasen et al., 1991), a 10^{-2} dilution of fresh feces from Cv mice (Cvd) or from a healthy human donor (Hum), and a 10^{-7} dilution of a fresh mouse fecal homogenate cultured for 4 days at 37°C on brain heart infusion agar plates (BHI; Difco) (Cult). The sporulated fraction (Spo) was prepared by heating the 10^{-2} dilution of fresh Cv mouse feces at 70°C for 10 min. All samples were prepared in an anaerobic chamber. Gnotobiotic mice were sacrificed on d8, d20, and d60 postcolonization in parallel to age-matched Cv and GF controls.

Colonization was monitored by microscopic examination of the feces and/or bacterial counts after culture on nonselective BHI medium. FISH analyses were performed with a series of bacterial probes on paraformaldehyde-fixed fecal suspensions as described (Lan et al., 2007). For SFB monitoring, DNA was extracted from frozen ileal biopsies and 16S rRNA amplified by qRT-PCR via specific primer pairs for SFB or total bacteria on an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied-Biosystems) according to a protocol adapted from Suzuki et al. (2004). As RT-PCR efficiency, determined on serial 10-fold dilutions of DNA samples, was close to 100%, the amount of SFB was quantified with a comparative threshold cycle (Ct) method ($2^{\Delta Ct}$) with a GF calibrator.

Microarray Hybridizations and Data Analysis

Ileal tissue was lysed in Trizol (Invitrogen) and total RNA was extracted and cleanup with the RNeasy kit and RNase-free DNase I (QIAGEN) digestion based on the manufacturer's protocol. RNA integrity was determined by Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Five micrograms of total RNA was reverse transcribed to cDNA and then transcribed into biotin-labeled cRNA with the One-Cycle Target Labeling Kit (Affymetrix). Hybridization was made to the NuGO Mouse Array (NuGO_Mm1a520177) on a GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix). Chips were scanned with an Affymetrix GeneChip Scanner 3000 and Image quality analysis performed with Gene Chip Operating Software.

Microarray analysis was performed with the software packages R (http://www.r-project.org) and Bioconductor (http://www.bioconductor.org). The data were normalized with gcRMA and subsequently adjusted for multiple testing by the Benjamini and Hochberg false discovery method ($p < 0.05$). Heatmaps were generated with the R-package *gplots* with gene subsets created from the list of significant genes. For in-depth functional analysis of the microarray data, all differentially expressed genes ($p < 0.05$) were imported into MetaCore analytical software (GeneGo) to generate pathway maps based on p values calculated with hypergeometric distribution.

Quantitation of Gene Expression with Real-Time PCR

RNA was purified from intestinal tissues and PPs as described above. qRT-PCR was performed with either TaqMan gene expression assays with TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems) or mouse-specific primers with SYBR-Green PCR master mix (Applied Biosystems) for *Ifng*, *Foxp3*, *Il12p40*, *Nos2*, *Cxcl10*, and *Cxcl1* (sequences available on demand). cDNA samples were assayed in duplicate and gene expression levels for each sample were normalized relative to TATA-box Binding Protein or to Transferrin Receptor with ΔCt calculation.

Analysis of Cytokine Production by Lamina Propria Lymphocytes

After excision of PP, mouse duodeno-jejunum, ileum, and colon were washed in PBS and cut into 0.5 cm pieces incubated four times in 30 mL of PBS-3 mM EDTA (Sigma) for 10 min at 37°C and digested in 30 mL of RPMI 1640 added with 20% SVF, 100 U/mL of collagenase (Sigma), and 50 U/mL of DNase I (Sigma) for 40 min at 37°C. LPL were purified on a 40%–80% Percoll gradient run for 15 min at 2000 × g and cultured for 72 hr in 24-well plates (1.10^{6} cells/well) coated overnight with anti-CD3 and anti-CD28 (5 μg/mL; BD Biosciences). Cytokines were measured in the supernatants with BioPlex assay (BioRad) according to manufacturer's instructions. Flow cytometry analysis of surface antigens coupled or not with intracellular staining of FoxP3, IL-17, IFN-γ, and IL-10 producing LPL after stimulation with 100 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate and 1 μg/mL ionomycin (both from Sigma) was performed as described (Lochner et al., 2008). Absolute numbers of $CD4^{+}$ T cells were determined with TruCount tubes according to manufacturer's instructions (BD Biosciences). The list of antibodies is given in Supplemental Data.

Scanning Electron Microscopy

Segments from terminal ileum and mid-colon were fixed in 4% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, dehydrated, and processed as described (Brandi et al., 1996).

Statistics

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used for comparing data; differences were considered significant for $p < 0.05$.

ACCESSION NUMBERS

Microarray data have been deposited in the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus with the accession number GSE18056.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include Supplemental Experimental Procedures, six figures, and two tables and can be found with this article online at http://www.cell.com/immunity/supplemental/S1074-7613(09)00404-X.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge funding from INSERM, Université Paris Descartes, INRA, Fondation Princesse Grace, Institut Danone-Fondation pour la Recherche Médicale (INSERM U793), and RERAD (Rowett Institute). M.D.P.

has a fellowship from La Région Ile de France. E.L. is part of a PhD programme supported by the Marie-Curie network Cross-talk.

Received: January 16, 2009
Revised: August 1, 2009
Accepted: August 25, 2009
Published online: October 15, 2009

REFERENCES

Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. Nat. Rev. Immunol. *8*, 411–420.

Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K. (2008). ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. Nature *455*, 808–812.

Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science *307*, 1915–1920.

Bouma, G., and Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat. Rev. Immunol. *3*, 521–533.

Brandi, G., Pisi, A., Biasco, G., Miglioli, M., Biavati, B., and Barbara, L. (1996). Bacteria in biopsies of human hypochlorhydric stomach: A scanning electron microscopy study. Ultrastruct. Pathol. *20*, 203–209.

Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Jouanguy, E., Picard, C., Puel, A., Abel, L., and Casanova, J.-L. (2008). Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. Curr. Opin. Immunol. *20*, 39–48.

Fagarasan, S., Muramatsu, M., Suzuki, K., Nagaoka, H., Hiai, H., and Honjo, T. (2002). Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. Science *298*, 1424–1427.

Giraud, A., Arous, S., De Paepe, M., Gaboriau-Routhiau, V., Bambou, J.C., Rakotobe, S., Lindner, A.B., Taddei, F., and Cerf-Bensussan, N. (2008). Dissecting the genetic components of adaptation of *Escherichia coli* to the mouse gut. PLoS Genet *4*, 52–61.

Guy-Grand, D., Griscelli, C., and Vassalli, P. (1974). The gut-associated-lymphoid system: Nature and properties of the large dividing cells. Eur. J. Immunol. *4*, 435–443.

Hooper, L.V., Xu, J., Falk, P.G., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. (1999). A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *96*, 9833–9838.

Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., and Gordon, J.I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science *291*, 881–884.

Ivanov, I.I., Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. Cell Host Microbe *4*, 337–349.

Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *105*, 15064–15069.

Kirjavainen, P.V., Arvola, T., Salminen, S.J., and Isolauri, E. (2002). Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? Gut *51*, 51–55.

Klaasen, H., Koopman, J., Van den Brink, M., Van Wezel, H., and Beynen, A. (1991). Mono-association of mice with non-cultivable, intestinal, segmented, filamentous bacteria. Arch. Microbiol. *156*, 148–151.

Klaasen, H., Koopman, J., Poelma, F., and Beynen, A. (1992). Intestinal, segmented, filamentous bacteria. FEMS Microbiol. Rev. *8*, 165–180.

Klaasen, H.L., Van der Heijden, P.J., Stok, W., Poelma, F.G., Koopman, J.P., Van den Brink, M.E., Bakker, M.H., Eling, W.M., and Beynen, A.C. (1993). Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. Infect. Immun. *61*, 303–306.

Lan, A., Bruneau, A., Philippe, C., Rochet, V., Rouault, A., Herve, C., Roland, N., Rabot, S., and Jan, G. (2007). Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. Br. J. Nutr. *97*, 714–724.

Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., and Weaver, C.T. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. Immunity *30*, 92–107.

Ley, R.E., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell *124*, 837–848.

Lochner, M., Peduto, L., Cherrier, M., Sawa, S., Langa, F., Varona, R., Riethmacher, D., Si-Tahar, M., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2008). In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. J. Exp. Med. *205*, 1381–1393.

Macpherson, A.J. (2006). IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *308*, 117–136.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat. Rev. Immunol. *4*, 478–485.

Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. Science *303*, 1662–1665.

Martinoli, C., Chiavelli, A., and Rescigno, M. (2007). Entry route of *Salmonella typhimurium* directs the type of induced immune response. Immunity *27*, 975–984.

Mazmanian, S.K., Round, J.L., and Kasper, D.L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature *453*, 620–625.

Niess, J.H., Leithauser, F., Adler, G., and Reimann, J. (2008). Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. J. Immunol. *180*, 559–568.

Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L., and Gordon, J.I. (2007). IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. Cell Host Microbe *2*, 328–339.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat. Rev. Immunol. *9*, 313–323.

Salazar-Gonzalez, R.M., Niess, J.H., Zammit, D.J., Ravindran, R., Srinivasan, A., Maxwell, J.R., Stoklasek, T., Yadav, R., Williams, I.R., Gu, X., et al. (2006). CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. Immunity *24*, 623–632.

Snel, J., Heinen, P.P., Blok, H.J., Carman, R.J., Duncan, A.J., Allen, P.C., and Collins, M.D. (1995). Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "*Candidatus Arthromitus*". Int. J. Syst. Bacteriol. *45*, 780–782.

Snel, J., Hermsen, C.C., Smits, H.J., Bos, N.A., Eling, W.M.C., Cebra, J.J., and Heidt, P.J. (1998). Interactions between gut-associated lymphoid tissue and colonization levels of indigenous, segmented, filamentous bacteria in the small intestine of mice. Can. J. Microbiol. *44*, 1177–1182.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *105*, 16731–16736.

Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A.W., Westendorf, A.M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A.J., Buer, J., Parkhill, J., et al. (2007). *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. PLoS Biol. *5*, 2177–2189.

Stepankova, R., Powrie, F., Kofronova, O., Kozakova, H., Hudcovic, T., Hrncir, T., Uhlig, H., Read, S., Rehakova, Z., Benada, O., et al. (2007). Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. Inflamm. Bowel Dis. *13*, 1202–1211.

Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., and Fagarasan, S. (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *101*, 1981–1986.

Talham, G.L., Jiang, H.-Q., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (1999). Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. Infect. Immun. *67*, 1992–2000.

Umesaki, Y., Okada, Y., Matsumoto, S., Imaoka, A., and Setoyama, H. (1995). Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and

fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. Microbiol. Immunol. *39*, 555–562.

Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., and Hooper, L.V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *105*, 20858–20863.

Zaph, C., Du, Y., Saenz, S.A., Nair, M.G., Perrigoue, J.G., Taylor, B.C., Troy, A.E., Kobuley, D.E., Kastelein, R.A., Cua, D.J., et al. (2008). Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. J. Exp. Med. *205*, 2191–2198.

Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. Immunity *30*, 646–655.

Dissecting the multiple pathways of SFB-induced adaptive immune responses in the intestine of gnotobiotic mice

Emelyne Lécuyer[1,2] Sabine Rakotobe[1,3] Hélène Lengliné-Garnier[1,4] Corinne Lebreton[1,2] Catherine Juste[3] Nadine Cerf-Bensussan[1,2*] Valérie Gaboriau-Routhiau[1,3*]

[1] INSERM, U989, Institut IMAGINE, Paris, France

[2] Université Paris Descartes-Sorbone Paris Centre, Paris, France

[3] INRA Micalis UMR1319, Jouy-en-Josas, France

[4] AP-HP, Department of Pediatric Gastroenterology, Hôpital Necker, Paris, France

[*] Equal contributions

Correspondence to:

Nadine Cerf-Bensussan. INSERM U989. Faculté de Médecine Paris Descartes - Bâtiment Leriche - Porte 9 - 96 rue DIDOT CS 61431 75993 PARIS CEDEX 14 - FRANCE.
e-mail: nadine.cerf-bensussan @inserm.fr

Valérie Gaboriau-Routhiau. INSERM U989. Faculté de Médecine Paris Descartes - Bâtiment Leriche - Porte 9 - 96 rue DIDOT CS 61431 75993 PARIS CEDEX 14 - FRANCE.
e-mail: valerie.gaboriau-routhiau @inserm.fr

Summary

Background and aims: We have shown that the post-natal development of the gut adaptive immune responses depends on a restricted number of bacteria, the prototype of which is segmented filamentous bacteria (SFB). Two hallmarks of SFB are: i) a host-specific adherence to the ileal mucosa and notably to the epithelium covering the Peyer's patches (PP), a major site of induction of intestinal adaptive immune responses; ii) a strong induction of innate signals. Herein, we have analyzed how these characteristics may influence the site(s) of initiation, the pathways, nature and specificity of intestinal adaptive responses

Methods: Gnotobiotic mice were colonized either with SFB or with a commensal strain of *Escherichia coli* K12, chosen as a prototype for the bulk of non-adherent bacteria. IgA and T cell responses were compared by flow cytometry, Elispot, RT-PCR and Bioplex. Mice were treated with lymphotoxin β receptor-Ig before and around birth to prevent the development of PP and isolated lymphoid follicles (ILF) or also during colonization to prevent the formation of tertiary lymphoid follicles.

Results: While SFB induced strong innate, T and IgA responses, *E. coli* K12 only induced a conspicuous expansion of IgA plasma cells in lamina propria (LP). SFB but not *E. coli* induced the expansion of germinal centers and the transcription of CD40L in PP, while *E. coli* exclusively induced transcripts encoding APRIL. Strikingly, IgA response to *E. coli* was abolished in mice lacking PP. In contrast, in mice lacking PP and ILF, colonization by SFB induced a reduced but significant IgA response as well as TH17 response. These responses were associated with an expansion of germinal centre cells and increased transcription of CD40L and of APRIL in LP, and abolished when the mice were treated by during colonization, indicating their initiation in tertiary lymphoid tissue. Interestingly, the proportion of IgA plasma cells specific of the colonising bacterium was higher for *E. coli* (25%) than for SFB (5%) pointing to an adjuvant effect of SFB on other on-going antibody responses.

Conclusion: Our results demonstrate that IgA responses to the microbiota are exclusively initiated in lymphoid structures within the gut wall but are elicited by different pathways depending on bacteria. While *E. coli* K12 only initiates IgA response within pre-existing PP, SFB can induce the post-natal development of gut lymphoid follicles, which can either substitute or complement the role of PP and perhaps account for the adjuvant effect of SFB. More work is needed to fully delineate the mechanisms of IgA response elicited by SFB and *E. coli* and notably compare their dependence or not on T cell help.

Introduction

Recent studies have shown how mammals and the complex community of 10^{14} bacteria that inhabit their distal intestines have established mutualistic relationships that are largely based on the metabolic advantages derived by both partners from the association. Yet, the considerable amount of bacteria in intimate contact with the intestinal mucosa is a major potential threat for their hosts who have evolved a complex network of innate and adaptive immune mechanisms which cooperate and form a highly regulated protective barrier (Hooper and Macpherson, 2010) (Maynard et al., 2012). Development of this gut immune system is initiated before birth by a genetic programme, which notably conducts the formation of mesenteric lymph nodes (MLN) and of Peyer's patches (PP). However, its full development occurs only after birth and is largely driven by the microbiota, which stimulates innate defences, induces the formation of isolated lymphoid follicles (ILF) and activates naive T and B cells into effector T and IgA plasma cells, which populate the gut lamina propria (LP) (reviewed in (Hooper and Macpherson, 2010)).

Mounting evidence indicates that the 500-1000 bacterial species inhabiting the intestine differ in their capacity to stimulate the post-natal maturation of the gut immune system (Gaboriau-Routhiau et al., 2009) (Chung et al., 2012). Recent studies have highlighted the importance of host-specific species and more particularly the outstanding role of segmented filamentous bacteria (SFB). Thus, mouse monocolonization by this non culturable clostridium-related species largely recapitulated the coordinated maturation of a large spectrum of innate and adaptive T and IgA immune responses induced by a complete mouse microbiota (Talham et al., 1999) (Umesaki et al., 1999) (Gaboriau-Routhiau et al., 2009) (Ivanov et al., 2009), while colonization with a complex microbiota lacking SFB only elicited an IgA response variably associated with a modest induction of regulatory T cell responses (Gaboriau-Routhiau et al., 2009). A striking feature of SFB is a host-specific attachment to

the ileal mucosa and notably to the epithelium covering the PP (Chase and Erlandsen, 1976) (Tannock et al., 1984). Since the seminal studies by Craig and Cebra, PP have generally been considered a major site for initiating intestinal adaptive responses and notably IgA production (Craig and Cebra, 1971). Yet, alternative sites have been suggested including MLN, where bacteria can be transported by dendritic cells (Macpherson and Uhr, 2004), ILF (reviewed in (Knoop and Newberry, 2012)) or even LP, which was suggested to be a site for T-independent IgM to IgA switch (Tsuji et al., 2008) (He et al., 2007). Yet these issues remain controversial (Bergqvist et al., 2010) (Barone et al., 2011) and it is also unclear whether sites of intestinal adaptive responses might differ between bacteria.

Herein, we have compared innate, IgA and T cell responses to SFB to those induced by the commensal strain of *Escherichia coli* MG1655 chosen as a prototype non-adherent strain. We have further examined whether and how gut associated lymphoid tissue contributes to adaptive responses to either bacterium using gnotobiotic mice treated at different periods of their life by a chimeric lymphotoxin-β receptor-immunoglobulin (LTβR-Ig), which interferes with the development of gut lymphoid structures (Rennert et al., 1997). We show that, in contrast to *E. coli* which exclusively stimulates a PP-dependent IgA response, SFB not only induces a potent IgA and T cell responses in PP, but also stimulates the formation of lymphoid follicles which can substitute or complement the role of PP for IgA and T helper 17 (Th17) specific responses. Moreover, we provide evidence that IgA responses to the microbiota can only be initiated within gut lymphoid structures where both CD40-CD40 ligand (CD40L)- and a proliferation-inducing ligand (APRIL)-dependent dependent pathways can be elicited.

Results

Induction of LP IgA-secreting plasma cells in monocolonized mice is diversely associated with detectable bacterium-specific T cell response

We have previously shown that a significant increase in the fecal concentrations of total IgA is observed in response to colonization by complex microbiota as well as by single bacteria while intestinal T cell responses, and notably Th17 response, are a prerogative of a restricted number of bacteria, the prototype of which is SFB (Gaboriau-Routhiau et al., 2009). Confirming and extending these results, we observed that monocolonization by either *E. coli* K12 or SFB induced a conspicuous increase in the number of LP IgA secreting cells (SC) on day 20 (d20) postcolonization, which was not significantly different between the two bacteria (Figure 1A). In contrast, polyclonal anti-CD3/CD28 stimulation induced 110-fold more IL-17 secretion by LP cells from SFB- than from *E. coli*-monocolonized mice on d20. Moreover, in mice monocolonized by SFB, IL-17 was also induced in response to SFB lysate but not to irrelevant bacteria (Figure 1B). This response was not observed in LP T cells from GF mice or from mice monocolonized by *E. coli*, further pleading for a specific response (Figure 1B and not shown). SFB-specific stimulation was not detected for IFNγ, IL-10, IL-4, IL-13 (not shown). In contrast, no significant cytokine production (IL-17, IFNγ, IL-10) was observed in response to *E. coli* lysate in mice monoassociated with *E. coli* (Figure 1B and Figure S1). Altogether, these results indicate that, depending on the colonizing bacterium, intestinal IgA responses may or not be coupled with a specific helper T cell response in intestinal LP.

IgA and intestinal T cell responses to SFB display variable requirement for MyD88 and TRIF signals

In contrast to *E. coli*, SFB induce a strong innate response attested by the up-regulation of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase 2 (NOS2 or iNOS) and IL-1β in the ileum of

C3H/HeN monocolonized mice (Figure 2A-B). The possible role of TLR in these responses as well as their respective implication in adaptive IgA and intestinal T cell response to SFB was therefore assessed in wild-type (WT) and MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ C57BL/6 mice colonized with SFB for 3 weeks. Induction of mRNA encoding iNOS and IL-1β was even stronger in ileal biopsies of MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ than of WT mice (Figure 2C-D). A comparable strong induction of IL-17 mRNA was also observed in the ileum of both strains (Figure 2E). In contrast and in keeping with recent results by Shaw *et al.* in conventionally raised mice (Shaw et al., 2012), LP cells isolated from MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice monocolonized by SFB were unable to produce IL-17 in response to stimulation by anti-CD3/CD28 or by SFB lysate (Figure 2F). The production of IL-10, IL-13, IL-4 and IFNγ induced in LP lymphocytes from SFB-monocolonized mice by anti-CD3/CD28 (but not by SFB lysate) was also significantly decreased in MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice (Figure S2), indicating that MyD88 and/or TRIF provide a signal that is indispensable for the induction of T cell response *in vitro* but which can be circumvented *in vivo* by another as yet unidentified pathway. Moreover MyD88 and TRIF were also dispensable for antibody response to SFB. Thus, despite a significantly lower number of IgA-, IgG- and IgM-SC in PP, MLN and spleen of GF MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice compared to GF WT mice, induction of IgA-SC was comparable in LP, PP and MLN of both mice after 20 days of colonization by SFB (Figure 2G and Figure S3). In addition, the small induction of IgG-SC in the PP, MLN and spleen of WT C57BL/6 mice monocolonized with SFB was also observed in MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice.

LP IgA responses are associated with the induction of germinal centres in PP of SFB but not of *E. coli* monocolonized mice

IgA responses can be induced by both T-dependent and T-independent mechanisms. That intestinal IgA responses were generated independently of innate and T cell response in *E. coli*

but not in SFB monocolonized mice, suggested that the two bacteria might elicit distinct IgA-inducing pathways. T-dependent IgA responses are notably generated in PP and require the induction of GC and CD40-CD40L interactions which are dispensable for T-independent IgA responses (Bergqvist et al., 2006). Strikingly, monocolonization by SFB but not by *E. coli* was associated with a significant expansion of PP GC, best demonstrated at d20 postcolonization, by the significant increase in the percentage and number of $B220^{+}GL7^{+}$ cells among isolated PP lymphocytes (Figure 3A-B) and by a 4-fold increase in *Cd40l* mRNA compared to GF mice (Figure 3C). A significant rise in the numbers of post-switch $B220^{+}IgA^{+}$ and $B220^{-}IgA^{+}$ B cells was also detected in PP on d20 in mice monocolonized by SFB but not by *E. coli* (Figure 3D-E). Altogether, these data support the hypothesis that SFB but not *E. coli* elicited a T cell-dependent IgA pathway in PP.

LP IgA responses to *E. coli* but not to SFB are abolished in mice lacking PP

That SFB but not *E. coli* could strongly stimulate the generation of GC in PP led us to compare the role of PP in the IgA responses to either bacterium. The development of PP was inhibited by treating pregnant GF mice with LTβR-Ig fusion protein (Rennert et al., 1996). A subset of PP-deficient neonates was further treated during the first three weeks of life to inhibit the post-natal development of cryptopatches, which give rise to isolated lymphoid follicles (ILF). Indeed, ILF develop upon exposure to the microbiota and can be a site of initiation of IgA response to the microbiota (Bouskra et al., 2008) (Tsuji et al., 2008). The PP-deficient (PP^{-}) and PP and ILF-deficient (PI^{-}) offsprings were then monocolonized at 8 weeks of age by either SFB or *E. coli*, and LP IgA responses were assessed by ELISPOT on d8 and d20 postcolonization. No macroscopically visible PP could be detected in treated mice, confirming the efficacy of the antenatal treatment (Figure S4). Consistent with an important role of PP in SFB-induced IgA responses, the number of IgA-SC was markedly decreased in

PP$^-$ and in PI$^-$ mice monocolonized by SFB compared to untreated mice. Yet, a substantial number of LP IgA-SC was still detected on d20 (Figure 4A). Moreover, an increase in LP IgM-SC was observed in the latter mice, which was even more prominent in mice lacking both PP and ILF (Figure 4B). In contrast, IgA-SC were almost undetectable in the LP of PP$^-$ and PI$^-$ mice monocolonized by *E. coli*, demonstrating that PP are indispensable for intestinal IgA responses to *E. coli* (Figure 4A). In keeping with previous studies indicating that intestinal IgA responses can be induced independently of T cell help and GC formation when B cells are stimulated by either APRIL or B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) (He et al., 2007) (Tsuji et al., 2008), we observed that monocolonization by *E. coli*, stimulated the expression of *April* (but not of *Baff*) mRNA in PP on d8 postcolonization compared to GF mice (Figure 4C and not shown). Altogether these results confirmed that SFB and *E. coli* elicited distinct IgA pathways in PP. They also demonstrated that SFB but not *E. coli* can initiate IgA response outside PP and cryptopatch-derived ILF.

PP-independent IgA and specific Th17 responses to SFB depend on the induction of tertiary lymphoid tissue

Previous studies have suggested that IgM to IgA class switch may be induced in LP independently of lymphoid follicles in response to TLR-dependent induction of APRIL production by dendritic and/or epithelial cells (He et al., 2007). Consistent with a role of APRIL in IgA induction by SFB outside PP and ILF, *April* mRNA was induced 3-fold in the ileum of control mice (not treated by LTβR-Ig), as well as of mice lacking PP or PP and ILF, compared to GF mice (Figure 5A). Indicating that TLR signaling was dispensable for APRIL induction by SFB, ileal expression of *April* mRNA was not impaired but rather increased in MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice compared to WT C57BL/6 mice (Figure S5). Interestingly, not only *April* but also *Cd40l* and transmembrane activator and CALM interactor (*Taci*) mRNA were

induced in the ileum of SFB-monocolonized mice and this induction was even stronger in mice lacking PP and ILF (Figure 5B-C), suggesting that SFB might induce the *de novo* formation of tertiary lymphoid tissues (tLT) containing TACI-expressing B cells and GC. Consistent with this hypothesis, the percentage and number of $B220^{+}GL7^{+}$ GC cells were significantly increased in LP lymphocytes of mice lacking PP and ILF 20 days after colonization by SFB compared to untreated GF mice (Figure 5D-E). In order to define whether IgA induction by SFB in mice lacking PP and ILF depended on tertiary follicles, GF mice treated with LTβR-Ig before birth and in the neonatal period were also treated two days before and during the 3 weeks of colonization with SFB ($PI^{-}Lt$ group). In the latter mice, no $B220^{+}GL7^{+}$ GC cells could be isolated from LP on d20 postcolonization, confirming that the treatment prevented the development of tertiary lymphoid follicles (Figure 5D-E). Indicating that tLT is necessary to initiate IgA response to SFB in mice lacking PP and ILF, the number of IgA-SC in $PI^{-}Lt$ mice was drastically reduced compared to non treated mice and much lower than that in PP^{-} and PI^{-} mice ($p=0.07$ and $p<0.02$, respectively) (Figure 4A-B). Notably, IL-17 T cell responses to SFB lysate and anti-CD3/CD28 stimulation were preserved in mice lacking PP and ILF but abolished in mice lacking tLT (Figure 5F). Altogether, these results indicated that adaptive immune responses to SFB can only be initiated in organized intestinal lymphoid tissue.

Induction of IgA plasma cells in MLN and spleen during colonization requires the presence of PP and ILF

In order to further examine whether organized lymphoid tissue localized in the intestinal wall is or not indispensable for IgA responses to *E.coli* and SFB, humoral responses were assessed in MLN and spleen of mice treated or not with LTβR-Ig. A very modest induction of IgA-SC was observed in MLN and spleen on d20 after monocolonization by *E. coli* compared to GF

mice, which was abolished in mice lacking PP or PP and ILF (Figure 6A). In untreated mice monocolonized by SFB, IgA-SC numbers were much less numerous in MLN and spleen than in LP. Yet, on d20 postcolonization, IgA-SC increased 10-fold in MLN and 30-fold in spleen compared to GF mice (Figure 6B-C). This induction was reduced in mice lacking PP or PP and ILF and completely abolished in mice lacking tLT after –long term-treatment with LTβR-Ig (Figure 6B-C). Similarly, hardly any IgA-SC could be detected in MLN and spleen of mice monocolonized with *E. coli* in absence of PP or PP and ILF, confirming that IgA responses to the two bacteria are exclusively induced in lymphoid structures present in the gut wall. In contrast and pleading against any major impairment of MLN function in mice receiving LTβR-Ig, the total number of MLN Ig-SC was significantly higher in PI- and PI-Lt mice than in untreated mice colonized with SFB due to a marked increase in the numbers of IgM-SC, and even more of IgG-SC (Figure 6B). Interestingly, in PP^- and PI^- mice colonized with SFB, there was a 4- to 5-fold increase in the total number of GC $B220^+$ $GL7^+$ cells (Figure 6D-E) and a concomitant induction of mRNA encoding activation induced cytidine deaminase (AICDA) in MLN cells compared to untreated mice (Figure S6). Therefore, when IgA cannot be initiated in the intestinal lymphoid tissue, an enhanced and even significantly higher compensatory immunoglobulin response might be induced by SFB in MLN ($p<0.03$ in PI^- and PI^-Lt mice compared to untreated mice), but only IgM to IgG class switch recombination (CSR) can occur (Figure 6B). Interestingly, analysis of cytokine production by MLN lymphocytes in response to polyclonal anti-CD3/CD28 stimulation showed strong enhancement of IL-17 production when mice lacked PP and ILF compared to untreated mice while this production was abolished in mice long term-treated with LTβR-Ig (Figure S7). In contrast, production of IL-10, IL-4, IL-13 and Il-5, but not of IFNγ, by MLN cells tend to increase in absence of tLT (Figure S7). PP and lymphoid follicles in the gut wall may thus be

necessary to induce not only IgA but also IL-17 responses but dispensable for the induction of IL-10 and TH2 responses.

A variable fraction of PP and LP IgA secreting cells react against the colonizing bacterium but they do not display cross reactivity

As the extent of specificity and cross reactivity of IgA elicited by the microbiota remains debated and may vary depending on the pathway of IgA induction, these parameters were compared in mice monocolonized with *E. coli* and SFB. Reactivity of Ig-SC isolated from the different compartments was tested against the bacterium used for colonization and against irrelevant bacterial lysates. Analysis by ELISPOT of Ig-SC was preferred to ELISA in secretions as IgA present in the intestinal lumen and in the feces can be bound to bacteria masking the site of antigenic recognition (van der Waaij et al., 1996). In LP and PP, approximately 5% of IgA-SC from SFB monocolonized mice reacted with SFB lysate, while as many as 25% of IgA-SC from *E. coli* monocolonized mice reacted with *E. coli* lysate on d20 postcolonization, these figures remaining stable over time (Figure 7A and Figure S8). Some specific IgA-SC were also detected in the LP of mice monocolonized by SFB and lacking PP and ILF, which also constituted around 5% of the total IgA-SC (not shown). Finally, a small number of specific Ig-SC just above the threshold of detection was observed in MLN, which secreted IgA in untreated mice and IgG in mice treated by LTβR-Ig and monocolonized by SFB. In marked contrast with the presence of IgA-SC directed against the colonizing bacterium, either SFB or *E. coli*, no IgA-SC reacting with irrelevant bacterial lysates could be detected by ELISPOT, pleading against significant cross-reactivity (Figure S8). Altogether these data indicated that specific IgA responses to the microbiota can be induced independently of GC formation. Interestingly, preliminary data showed moderate numbers of somatic hypermutations in $CD45^{+}CD3^{-}CD138^{+}CD43^{+}$ LP plasma cells sorted

from mice monocolonized by *E. coli* or by SFB on d40 and d60 postcolonization, which were not significantly different between the two bacteria (Figure 7B).

Discussion

We have previously shown that post-natal maturation of gut adaptive immune responses depends on a restricted number of intestinal bacteria, the prototype of which is SFB. Herein, we show that, in contrast to a commensal strain of *E. coli* which exclusively stimulates a PP-dependent IgA response, SFB not only induces potent IgA and T cell responses in PP, but also stimulates the formation of lymphoid follicles which can substitute or complement the role of PP for IgA and Th17 specific responses. Moreover, we provide evidence that IgA responses to the microbiota can be initiated by several pathways but only within gut lymphoid structures.

A central role for PP as initiation sites for gut IgA responses was initially suggested by the seminal work of Craig and Cebra, who showed that the adoptive transfer of PP lymphocytes could reconstitute IgA-SC in the LP of irradiated rabbits (Craig and Cebra, 1971). More recently, observation that gut IgA responses can develop in mice lacking PP after *in utero* treatment with LTβR-Ig led to question the role of PP. Several alternative sites have been suggested including MLN (Yamamoto et al., 2000), cryptopatch-derived ILF (Tsuji et al., 2008) and LP (Fagarasan et al., 2001) (Xu et al., 2007) (He et al., 2007). Thus, both in mice and in humans, it has been proposed that class switch recombination (CSR) might take place in non-organized lymphoid tissue in IgM-expressing B cells activated by iNOS, BAFF and APRIL produced by dendritic cells and/or epithelial cells in response to microbiota-derived TLR signals (reviewed in (Cerutti, 2008) (Fagarasan et al., 2010)). In mice, it was further suggested that IgM^+ B cells undergoing CSR in LP might be B1 cells originating from the peritoneal cavity (Macpherson et al., 2000). Yet, whether CSR can take place in LP remains highly controversial (Barone et al., 2011) (Bergqvist et al., 2006) (Bergqvist et al., 2010), notably because no α-circular transcripts could be detected in LP lymphocytes isolated from intestinal samples lacking organized lymphoid tissues. Herein, almost no IgM^+ B cells

could be detected in LP lymphocytes. Moreover, LP IgA-SC did not increase in SFB-monocolonized mice treated by LTbR-Ig to inhibit the development of not only PP and ILF but also of tTL, supporting the conclusion that IgA responses to the tested bacteria can only be initiated in intestinal organized lymphoid tissue. A role of MLN in initiating IgA response was suggested in an early study also using LTbR-Ig to deplete PP (Yamamoto et al., 2000). Yet, the treatment was not sufficient to eliminate all intestinal lymphoid tissue. In the present study, MLN of mice deprived of PP and ILF and tTL displayed enhanced numbers of GL7+ GC cells and of IgG-SC but not of IgA-SC, together indicating that LTβR-Ig treatment does not impair the function of MLN and pleading against a significant contribution of MLN to IgA responses to the microbiota.

Previous studies have suggested that IgA responses to the microbiota can be induced by both a T-dependent pathway requiring CD40-CD40L interactions in GC and a T-independent pathway ascribed to the production of APRIL and BAFF by dendritic cells and/or epithelial cells. Our results support the hypothesis that the two pathways coexist in PP but also provide unexpected evidence that they are differentially activated by distinct members of the microbiota. Together with the strong induction of cytokine-producing T cells in the LP and PP (Gaboriau-Routhiau et al., 2009), monocolonization by SFB induced transcripts for CD40L in PP and IgA response was associated with a strong expansion of GC cells. These data suggest that IgA response to SFB is largely T-dependent, a result further supported by preliminary data in mice monocolonized with SFB and depleted for $CD25^+$ T cells, showing a reduced number of IgA-SC in their LP (data not shown). IgA response induced by *E. coli* was entirely dependent on PP and developed without detectable formation of GC, in keeping with recent data suggesting that CSR, in contrast to somatic hypermutations, does not need GC (Bergqvist et al., 2010). Yet, even moderate, somatic hypermutations can be detected in mice colonized with *E. coli*. Moreover, in contrast with SFB, *E. coli* induced *April* but not *Cd40l*

transcripts in PP, and IgA-SC developed without activation of cytokine-producing T cells, suggesting a T-independent pathway for IgA response to *E. coli*. However, such hypothesis need to be further demonstrated in mice depleted in $CD4^+$ T cells and in mice treated with TACI-Ig fusion protein to block APRIL pathway.

SFB play a crucial role in the activation of intestinal T cell responses and notably induce a marked accumulation of Th17 cells in the small intestine (Gaboriau-Routhiau et al., 2009) (Ivanov et al., 2009). The specificity of this cytokine response to SFB is however not clearly defined. The observation that a large part of IL-17 secreted *in vitro* by LP lymphocytes in response to polyclonal T cell stimulation is also induced by stimulation with SFB lysate, suggest that IL-17 response induced upon colonization may be, at least partly, SFB-specific. These data contrasted with previous ones in transgenic mice expressing a T cell receptor unable to react with microbial antigens, which suggested that gut Th17 responses can develop independently of antigen-specific recognition via the T cell receptor (Lochner et al., 2011). This discrepancy may however result from a homeostatic over expansion of few activated T cells present in the $RAG^{-/-}$ transgenic models. Interestingly, IL-17 response and notably IL-17 response specific to SFB was abolished in SFB-monocolonized mice after long-term treatment with LTβR-Ig. Although SFB signals and pathways involved are yet not known, these results support the hypothesis that tertiary lymphoid follicles may be central in initiation of this specific IL-17 response.

The role of innate immune signaling pathways in induction of adaptive immune responses remains elusive. In one hand, the absence of IgA both in the feces and in the serum of MyD88-/- mice supported that innate signaling pathways are necessary for IgA response to the microbiota (Tezuka et al., 2007). Contrasting with these results, similar profiles of Ig-SC in PP, LP and MLN of wild-type and $MyD88^{-/-}xTRIF^{-/-}$ mice monocolonised with SFB suggest no need for TLR-mediated pathways in IgA response to SFB. The strong expression

of *Inos* and *April* mRNA in ileal biopsies of MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice monocolonized with SFB further supported this hypothesis and suggested that redundant pathways may sustain humoral responses to SFB. Because of specific attachment of SFB to epithelial cells, these bacteria may elicit still unidentified pathway in epithelial cells that result in the secretion of B-cell activating factors necessary to stimulate IgA CSR. However, this remains to be demonstrated. Monocolonization with *E. coli* was associated with the induction of *April* mRNA in PP, which contrasted with the non detectable expression of innate immune markers in the LP. Yet, this does not preclude TLR-independent pathway in PP and underlines that it will be necessary to demonstrate whether *E. coli* can induce, or not, APRIL expression in PP of MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ monocolonized mice.

On the other hand, previous studies have suggested that differentiation of Th17 cells and secretion of IL-17 are also independent of TLR-signaling pathways (Ivanov et al., 2009) (Ivanov et al., 2008) (Atarashi et al., 2008). *In vivo* analysis of *Il17* mRNA expression in ileal biopsies of WT and MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice monocolonized with SFB are in keeping with these results. Strikingly, IL-17 secretion by isolated LP lymphocytes from MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice in response to anti-CD3/CD28 or SFB stimulation was abolished, suggesting that innate pathways way in fact be critical for IL-17 response. Such hypothesis was recently supported by data showing that MyD88-dependent IL-1β production by macrophages is necessary for intestinal T cell-dependent IL-17 response (Shaw et al., 2012). Notably, increased expression of *Il1b* transcripts in ileal biopsies from MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ mice colonized with SFB was not observed in isolated lymphoid cells from the LP (data not shown), suggesting that IL-1β induction in epithelial cells may be key for IL-17 response to SFB. However, the TLR-independent signal derived from SFB that promote IL-1β response in epithelial cells remains to be identified.

It is generally admitted that, in contrast with IgA generated in GC via T cell-dependent mechanism, IgA induced independently of T cell help and GC expansion show limited somatic hypermutations, are of low affinity and can be cross-reactive with different bacteria (Bergqvist et al., 2010), reviewed in (Fagarasan et al., 2010) (Slack et al., 2012). Analysis of sorted $CD138^{+}CD43^{+}$ LP plasma cells from SFB-monocolonized mice showed a moderate number of somatic hypermutations in IgA sequences on d40 postcolonization, which tends to increase on d60. This may illustrate the dynamic changes in IgA repertoire diversity associated with aging (Lindner et al., 2012). Surprisingly, no significant difference in frequency of somatic hypermutations was observed between *E. coli*- and SFB-colonized mice, even though the proportion of LP IgA-SC reacting specifically with lysate of the colonizing bacterium was much higher with *E. coli* (25%) than with SFB (5%). This may however be reminiscent of the observation that human intestinal IgA are somatically mutated independently of their reactivity to self or non-self antigens (Benckert et al., 2011). No cross-reactivity could be detected by ELISPOT against irrelevant bacteria in either model. It is however not excluded that ELISPOT is not sensitive enough to detect cross-reactivity with several bacterial species, which is the feature of a very small percentage of IgA clones derived from human intestine LP and reactive with intestinal microbes (Benckert et al., 2011).

Inconsistent relationship was observed between the total numbers of IgA-SC in the LP of *E. coli*- and SFB-colonized mice and the concentrations of total IgA in fecal samples. Despite comparable numbers of total IgA-SC in the two models, notably after 60 days of colonization, much less IgA are detected in feces of mice colonized with *E. coli* (Gaboriau-Routhiau et al., 2009). Yet, as previously suggested in the lung (Liu et al., 2009), a recent study has shown that antigen-specific IL-17 response promotes pIgR expression from epithelial cells and IgA secretion, which contribute to intestinal homeostasis (Cao et al., 2012). In addition, pIgR expression may be further up-regulated by proinflammatory

cytokines and innate TLR-dependent signals (Ackermann and Denning, 2004) (Resendiz-Albor et al., 2010) (Schneeman et al., 2005). Because of their privileged role on stimulation of intestinal T cell responses and notably of IL-17 response (Gaboriau-Routhiau et al., 2009), (Ivanov et al., 2009), SFB may thus combine adaptive immune responses to promote IgA secretion into the gut and intestinal homeostasis.

In conclusion, we have shown that organized lymphoid tissues in the gut and especially PP are the major sites for initiation of IgA response to the microbiota. SFB have however also evolved the ability to stimulate the formation of tertiary lymphoid structures, which may be key to maintain finely tuned adaptive immune responses and optimal tradeoff with their host. Elucidating how SFB adhere to the intestinal epithelium might be crucial to further delineate SFB-dependent immunostimulatory pathways.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

All procedures were carried out in accordance with European guidelines. Cv, GF C3H/HeN and C57BL/6 mice were bred at the INRA facilities in Jouy-en-Josas. GF and gnotobiotic mice were maintained in plastic isolators and fed *ad libitum* on a commercial diet (R03-40; UAR) sterilized by γ-irradiation (40 kGy). GF C57BL/6 mice *Jh*$^{-/-}$ and *Myd88*$^{-/-}$*Trif*$^{-/-}$ were kindly provided by K. McCoy laboratory, Bern Switzerland.

Treatment protocols

Axenic timed pregnant C3H/HeN mice were injected i.v. with 150 µg fusion protein of LTβR-Ig (Biogenidec) on gestational days 16 and 18 with as described previously (Rennert et al., 1996) (Rennert et al., 1997). In some experiments, axenic 1-wk-old C3H/HeN pups were injected i.p. with 10 µg fusion protein LTβR-Ig once weekly until 3-wk-old. In some experiments post-natally injected pups were also treated i.p. with 100 µg fusion protein LTβR-Ig once weekly until sacrifice starting from 1-wk- before SFB colonization (7-wk-old).

Colonization experiments

GF female 8-9-week-old mice were gavaged twice at a 24-hr interval with 0.5 mL of : fresh anaerobic cultures of *Escherichia coli* MG1655, fecal homogenate from SFB monoassociated mice (Klaasen et al., 1991). Gnotobiotic mice were sacrificed on d8, 20 and 60 postcolonization in parallel to age-matched Cv and GF controls.

Colonization was monitored by microscopic examination of the feces and/or bacterial counts after culture on non-selective BHI medium. For SFB monitoring, DNA was extracted from frozen ileal biopsies and 16S rRNA amplified by qRT-PCR using specific primer pairs for SFB or total bacteria on an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Life Technologies)

according to a protocol adapted from (Suzuki et al., 2004). As RT-PCR efficiency, determined on serial 10-fold dilutions of DNA samples, was close to 100%, the amount of SFB was quantified using a comparative threshold cycle (Ct) method ($2^{\Delta Ct}$) with a GF calibrator.

Single cell preparation from spleen, mesenteric lymph nodes (MLN), Peyer patches (PP) and lamina propria (LP)

Excised spleen and mesenteric lymph nodes were placed in separated petri-dish with 3mL RPMI. Organs are cut into small pieces and gently passed through a 40 µm cell strainer using a plunger. Red blood cells were removed using ACK solution and the lysate was filtered through a 40µm filter then centrifugated at 100 xg. The pellet is resuspended in Cerrotini medium (DMEM-Glutamax – 0.001 % Hepes- 0.00001 % Folic acid- 0.0001 % L-Arginine – 0.0004 L-Asparagine) added with 8% SVF.

Excised Peyer patches are cut into small pieces and digested in 3 mL of RPMI 1640 added with 10% SVF, 100 U/mL of collagenase (Sigma) and 50 U/mL of DNase I (Sigma) for 10 min. The lysate is filtered through a 40 µm cell mesh and washed at 300 xg. PP' cells are resuspended in Cerrotini medium added with 8% SVF.

After excision of PP, small intestine was washed in PBS cut into 0.5 cm pieces incubated 4-times in 30 mL of PBS-3 mM EDTA (Sigma) for 10 min at 37°C, and digested in 30 mL of RPMI 1640 added with 20% SVF, 100 U/mL of collagenase (Sigma) and 50 U/mL of DNase I (Sigma) for 40 min at 37°C. LPL were purified on a 40-80% Percoll gradient run for 15 min at 2,000 x*g*,)

Quantitation of gene expression using real-time PCR

Total RNA from ileal tissue and PPs, lyzed in RNAplus using a ribolyser FastPrep® (MP Biomedicals), or from isolated cells (MLN, PP and LPL harvested in RLTplus (Qiagen)) was

extracted and cleanup with the RNeasy kit (Qiagen) based on the manufacturer's protocols. The integrity of RNA is assessed by agarose gel analysis and by quantification of 260 nm/280 nm ratio included from 1.7 to 2. Five microgram of total RNA was reverse transcribed to cDNA and qRT-PCR was performed using either TaqMan gene expression assays with TaqMan Universal PCR master mix (Life Technologies) or mouse specific primers with SYBR-Green PCR master mix (Life Technologies) for *Inos, Il1b, Ip10, Il17, April, Cd40l, Taci, Aicda* (sequences available on demand). cDNA samples were assayed in duplicate and gene expression levels for each sample were normalized relative to TATA-box Binding Protein or to Transferrin Receptor using ΔCt calculation.

Analysis of cytokine production by lamina propria lymphocytes

LPL were cultured for 72 hr in 96-well plates (1.10^6 cells/ml) coated overnight with anti-CD3 and anti-CD28 (5 µg/mL; BD Biosciences). Cytokines were measured in the supernatants using BioPlex assay (BioRad) according to manufacturer’s instructions.

Bacterial lysate

Escherichia coli MG1655 or *Clostridium* or *Bacteroides vulgatus* overnight culture in 500 ml LB medium were performed. Each culture was centrifuged at 5000 x g and washed twice in sterile PBS. Bacterial isolates were resuspended in 2 ml PBS and dry at -20°C before sonication.

To prepare SFB isolate, content from distal ileum plus cecal contents of three to four SFB-monoassociated C57BL/6 $Jh^{-/-}$ mice were harvested. These were suspended with sterile PBS containing 0.03% NaDC on ice. Nycodenz gradient was performed to separate SFB from fecal matrix through ultracentrifugation in a swinging SW-28 rotor (Beckman, 13,233 xg for 90

min, 4°C). After several washing in PBS the resulting SFB isolate was resuspended in 2 ml PBS and frozen at -20°C before sonication.

Each bacterial isolate was sonicated on ice with a sonicator cell disrupter (Thermofisher Scientific). Six cycles of pulse on 2.5" / pulse off 1" were carried out. A Bradford protein assay was performed to determine protein concentration of each bacterial lysate.

ELISPOT Assay

To assess the numbers of Immunoglobulin-Secreting Cells (Ig-SCs), an enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay was performed as described previously (Dogan et al., 2009). To determine total Ig-SCs, multiscreen HTS 96-well plates (Millipore) were coated overnight at 4°C with 10 µg/ml of goat anti-mouse Ig(H+L) (Southern Biotechnology). 40 µg/ml of bacterial sonicate were used as the coating antigen to determine the level of bacterial-specific Ig-SCs. Plates were then blocked 2h to 4h with RPMI 1640 containing 5% FCS at 37°C. Fourfold cell dilutions of isolated lymphocytes from PPs, lamina propria (LP), mesenteric lymph nodes (MLN) or Spleen (Spl) were incubated overnight. HRP-conjugated anti-mouse IgA (Sigma) or IgM or IgG (Southern Biotechnology) Abs were added and finally reacted with 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma) dissolved in hydrogen peroxide-containing buffer. The reaction was stopped and Ig-SCs were counted with the aid of a stereomicroscope (AID EliSpot Reader System). Analyses were performed with AID EliSpot 5.0 software.

Analysis of mutations in the JH4 intronic sequence of the Igh locus.

The JH4 intronic sequence flanking a rearranged VH gene segment was amplified by multiplex endpoint PCR of DNA. Three PCR were done for each sample with ten thousand $CD45^+$ $CD3^-$ $B220^-$ $CD138^+$ $CD43^+$ freeze-dried sorted cells. The PCR primers used are FR3 primers amplifying most VH gene families (V1, V5, V3, V7 and V9 at a ratio of 6:3:1:1:1) :

- V1 : GAGGACTCTGCRGTCTATTWCTG
- V3 : GAGGACACACCCACATATTACTG
- V5 : GAGGACACRGCCATGTATTACTG
- V7 : GAGGACAGTGCCACTTATTACTG
- V9 : ATGAGGACATGGCTACATATTTC

and jH4 (5'-CACCAGACCTCTCTAGACAGC -3'), a primer downstream of JH4, using a denaturation step of 2 minutes at 98°C and 40 cycles of 15 s at 98 °C, 30 s at 64 °C and 30 s at 72 °C, with Phusion® DNA polymerase (New England Biolabs). PCR products were cloned with the Zero Blunt cloning kit (Invitrogen) and sequences were determined with an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer using jH4 primer. Mutations were identified within 440 base pairs of the JH4 intron and analysed with the help of CodonCodeAligner software.

Flow cytometry analysis

The following mAbs were purchased from BD Biosciences: FITC-conjugated anti-GL7 (clone GL7); APC-H7-conjugated anti-CD19 (clone 1D3); Alexa-fluor conjugated B220 (clone RA3-6B/2) and biotinylated anti-CD138 (clone 231.2) . The following were purchased from eBiosciences: eFluor-450-conjugated anti-CD45 (clone 30-F11); PECy7-conjugated anti-CD3 (clone 145-2C11); PE-conjugated anti-FoxP3 (clone PJK-16s) and rat IgG2a isotype control. PE-Cy5-conjugated streptavidin was from BD Biosciences. PE-conjugated anti-IgA (goat) is purchased from Southern Biotec . Labelled cells were analysed using a CANTO II apparatus and Diva software (BD Biosciences).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. The nonparametric Mann-Withney tests were used for comparing data; differences were considered significant for $p<0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge funding from INSERM, Université Paris Descartes, INRA, Fondation pour le Recherche Médicale (FRM) (grant), Fondation Princesse Grace, Institut Danone-Fondation pour la Recherche Médicale (INSERM U793). E. Lécuyer is part of a PhD programme supported by the Marie-Curie network Cross-talk. We thank C. McCoy and A. Macpherson for providing GF C57BL/6 mice *Jh*$^{-/-}$ and *Myd88*$^{-/-}$*Trif*$^{-/-}$ mice, J. Browning for giving LTβR-Ig and R. Fritzen for analysis of mutations. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Ackermann, L.W., and Denning, G.M. (2004). Nuclear factor-kappaB contributes to interleukin-4- and interferon-dependent polymeric immunoglobulin receptor expression in human intestinal epithelial cells. Immunology *111*, 75-85.

Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K. (2008). ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. Nature *455*, 808-812.

Barone, F., Vossenkamper, A., Boursier, L., Su, W., Watson, A., John, S., Dunn-Walters, D.K., Fields, P., Wijetilleka, S., Edgeworth, J.D., and Spencer, J. (2011). IgA-producing plasma cells originate from germinal centers that are induced by B-cell receptor engagement in humans. Gastroenterology *140*, 947-956.

Benckert, J., Schmolka, N., Kreschel, C., Zoller, M.J., Sturm, A., Wiedenmann, B., and Wardemann, H. (2011). The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. The Journal of clinical investigation *121*, 1946-1955.

Bergqvist, P., Gardby, E., Stensson, A., Bemark, M., and Lycke, N.Y. (2006). Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. J Immunol *177*, 7772-7783.

Bergqvist, P., Stensson, A., Lycke, N.Y., and Bemark, M. (2010). T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. J Immunol *184*, 3545-3553.

Bouskra, D., Brezillon, C., Berard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., and Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. Nature *456*, 507-510.

Cao, A.T., Yao, S., Gong, B., Elson, C.O., and Cong, Y. (2012). Th17 cells upregulate polymeric Ig receptor and intestinal IgA and contribute to intestinal homeostasis. J Immunol *189*, 4666-4673.

Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. Nat Rev Immunol *8*, 421-434.

Chase, D.G., and Erlandsen, S.L. (1976). Evidence for a complex life cycle and endospore formation in the attached, filamentous, segmented bacterium from murine ileum. Journal of bacteriology *127*, 572-583.

Chung, H., Pamp, S.J., Hill, J.A., Surana, N.K., Edelman, S.M., Troy, E.B., Reading, N.C., Villablanca, E.J., Wang, S., Mora, J.R., *et al.* (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. Cell *149*, 1578-1593.

Craig, S.W., and Cebra, J.J. (1971). Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. J Exp Med *134*, 188-200.

Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Megret, J., Storck, S., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. Nat Immunol *10*, 1292-1299.

Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O., and Suzuki, K. (2010). Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. Annu Rev Immunol *28*, 243-273.

Fagarasan, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Ikuta, K., and Honjo, T. (2001). In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. Nature *413*, 639-643.

Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., *et al.* (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. Immunity *31*, 677-689.

He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., *et al.* (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. Immunity *26*, 812-826.

Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol *10*, 159-169.

Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell *139*, 485-498.

Ivanov, II, Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. Cell host & microbe *4*, 337-349.

Klaasen, H., Koopman, J., Van den Brink, M., Van Wezel, H., and Beynen, A. (1991). Mono-association of mice with non-cultivable, intestinal, segmented, filamentous bacteria. Arch Microbiol *156*, 148-151.

Knoop, K.A., and Newberry, R.D. (2012). Isolated Lymphoid Follicles are Dynamic Reservoirs for the Induction of Intestinal IgA. Front Immunol *3*, 84.

Lindner, C., Wahl, B., Fohse, L., Suerbaum, S., Macpherson, A.J., Prinz, I., and Pabst, O. (2012). Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine. J Exp Med *209*, 365-377.

Liu, P., Jaffar, J., Zhou, Y., Yang, Y., Hellstrom, I., and Hellstrom, K.E. (2009). Inhibition of TGFbeta1 makes nonimmunogenic tumor cells effective for therapeutic vaccination. J Immunother *32*, 232-239.

Lochner, M., Berard, M., Sawa, S., Hauer, S., Gaboriau-Routhiau, V., Fernandez, T.D., Snel, J., Bousso, P., Cerf-Bensussan, N., and Eberl, G. (2011). Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells. J Immunol *186*, 1531-1537.

Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. Science *288*, 2222-2226.

Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. Science *303*, 1662-1665.

Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. Nature *489*, 231-241.

Rennert, P.D., Browning, J.L., and Hochman, P.S. (1997). Selective disruption of lymphotoxin ligands reveals a novel set of mucosal lymph nodes and unique effects on lymph node cellular organization. International immunology *9*, 1627-1639.

Rennert, P.D., Browning, J.L., Mebius, R., Mackay, F., and Hochman, P.S. (1996). Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. J Exp Med *184*, 1999-2006.

Resendiz-Albor, A.A., Reina-Garfias, H., Rojas-Hernandez, S., Jarillo-Luna, A., Rivera-Aguilar, V., Miliar-Garcia, A., and Campos-Rodriguez, R. (2010). Regionalization of pIgR expression in the mucosa of mouse small intestine. Immunology letters *128*, 59-67.

Schneeman, T.A., Bruno, M.E., Schjerven, H., Johansen, F.E., Chady, L., and Kaetzel, C.S. (2005). Regulation of the polymeric Ig receptor by signaling through TLRs 3 and 4: linking innate and adaptive immune responses. J Immunol *175*, 376-384.

Shaw, M.H., Kamada, N., Kim, Y.G., and Nunez, G. (2012). Microbiota-induced IL-1beta, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. J Exp Med *209*, 251-258.

Slack, E., Balmer, M.L., Fritz, J.H., and Hapfelmeier, S. (2012). Functional flexibility of intestinal IgA - broadening the fine line. Front Immunol *3*, 100.

Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., and Fagarasan, S. (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. Proc Natl Acad Sci USA *101*, 1981-1986.

Talham, G.L., Jiang, H.Q., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (1999). Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. Infection and immunity *67*, 1992-2000.

Tannock, G.W., Miller, J.R., and Savage, D.C. (1984). Host specificity of filamentous, segmented microorganisms adherent to the small bowel epithelium in mice and rats. Applied and environmental microbiology *47*, 441-442.

Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. Nature *448*, 929-933.

Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, II, Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. Immunity *29*, 261-271.

Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., Imaoka, A., and Itoh, K. (1999). Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. Infection and immunity *67*, 3504-3511.

van der Waaij, L.A., Limburg, P.C., Mesander, G., and van der Waaij, D. (1996). In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. Gut *38*, 348-354.

Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., and Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. Nat Immunol *8*, 294-303.

Yamamoto, M., Rennert, P., McGhee, J.R., Kweon, M.N., Yamamoto, S., Dohi, T., Otake, S., Bluethmann, H., Fujihashi, K., and Kiyono, H. (2000). Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. J Immunol *164*, 5184-5191.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Intestinal IgA response to microbiota can be uncoupled with a bacteria-specific helper T cell response

(A) Numbers of total IgA secreting cells (SC) estimated by ELISPOT in the lamina propria (LP) of C3H/HeN germfree (GF), conventional (Cv) and mice colonized with SFB or *E. coli* K12 for 8, 20 and 60 days. * and #, $p<0.05$ compared respectively to GF and Cv by a nonparametric Mann-Whitney test.

(B) LP lymphocytes were isolated from GF and Cv mice and from mice colonized for 20 days with SFB or *E. coli*, and stimulated for 72 hr by anti-CD3/CD28 (white symbols), SFB lysate (red symbols), *E. coli* lysate (green symbols), *Bacteroides vulgatus* or *Clostridium* lysates (blue symbols), or left unstimulated (grey symbols). IL-17 was measured in culture supernatants by BioPlex. All data represent individual values and medians.

Figure 2. Variable impact of innate receptor pathways on intestinal IgA and T cell responses to SFB

Ileal gene mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in C3H/HeN GF, Cv and mice colonized with SFB or *E. coli* for 8, 20 and 60 days (A-B), and in C57BL/6 mice wild-type (WT) or MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ deficient (MyDTrif), either GF or colonized with SFB for 20 days (C-D-E). mRNA expression is relative to appropriate GF mice (defined as 1; dotted line). Data represent individual values and medians. *$p<0.05$, #$p<0.01$ compared to SFB-colonized mice by a nonparametric Mann-Whitney test.

(F) IL-17 was measured by BioPlex in culture supernatants of LP lymphocytes isolated from GF and SFB-colonized WT and MyDTrif mice. Cultures were performed during 72 hr with stimulation by anti-CD3/CD28 (black symbols), SFB lysate (red symbols) or irrelevant bacterial lysates (white symbols). Data represent individual values and medians.

(G) Numbers of total Ig-SC, of either IgA, IgG or IgM subclasses, estimated by ELISPOT in the LP of indicated mice. Bars represent mean ± SD.

Figure 3. SFB induce strong GC formation in PP

Lymphocytes isolated from PP of C3H/HeN mice GF, CV, and colonized with SFB or *E. coli* for indicated time were analyzed for B220 and GL7 expression by flow cytometry. (A) Representative dot plots gated on $CD45^+$ $CD3^-$ lymphocytes are shown. Numbers indicate the mean percentages of double positive cells ± SD. (B) Absolute numbers of $B220^+$ $GL7^+$ cells. Data represent individual values and median.

(C) mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in PP of C3H/HeN GF, Cv and mice colonized with SFB or *E. coli* for indicated time. Data are expressed as in Figure 2. Individual values and median are shown.

(D-E) Isolated lymphocytes from PP were analyzed for B220 and IgA expression by flow cytometry, and absolute numbers of cells were determined. Data represent individual values and median.

#p<0.05, *p<0.008 compared to SFB-colonized mice by a nonparametric Mann-Whitney test.

Figure 4. SFB induce PP-independent pathway for intestinal IgA response

(A) Numbers of total IgA-SC estimated by ELISPOT in the LP of C3H/HeN mice colonized with SFB or *E. coli* K12 for 8 and 20 days. Mice were left untreated (NT) or treated with LTβR-Ig before birth only (PP^-), before birth and in the neonatal period (PI^-) or for long-term period, i.e. before and after birth plus during colonization period (PI^-Lt). Individual values and median are shown. *p<0.05, #p<0.01 compared to PI^- SFB-colonized mice by a nonparametric Mann-Whitney test.

(B) Numbers of total IgA-, IgG- and IgM-SC in the LP of indicated mice on d20 postcolonization. Results from GF untreated mice are shown. Bars represent mean for each subclass ± SD. *p<0.01 compared to SFB-colonized mice by a nonparametric Mann-Whitney test.

(C) mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in PP of untreated GF, Cv and mice colonized with SFB or *E. coli* for indicated time. Data are expressed as in Figure 2. Individual values and median are shown. §p<0.02 compared to *E. coli*-colonized mice by a nonparametric Mann-Whitney test.

Figure 5. SFB induce tertiary lymphoid tissue that sustain IgA and Th17 responses

Mice treated or not with LTβR-Ig (see Figure 4 for details) and colonized with SFB or *E. coli* for 20 days were analyzed for (A-B-C) ileal gene mRNA expression by qRT-PCR (data expressed as in Figure 2), and (D-E) B220 and GL7 expression on isolated LP lymphocytes by flow cytometry. GF and Cv untreated controls are shown. Data are represented as in Figure 3. *p<0.05, #p<0.005 compared to SFB-colonized mice, and §p<0.005, **p<0.05 compared to GF mice by a nonparametric Mann-Whitney test.

(F) IL-17 was measured by BioPlex in culture supernatants of LP lymphocytes isolated from SFB-colonized mice, treated or untreated, and stimulated for 72 hr by anti-CD3/CD28 (CD3/28; black symbols), SFB lysate (SFB; red symbols), irrelevant bacterial lysates (IrL; white symbols), or left non stimulated (NS; grey symbols). Data represent individual values and medians.

Figure 6. Organized lymphoid tissues control IgA responses to microbiota in MLN and spleen (A) Numbers of total IgA-SC were estimated by ELISPOT in the MLN of mice colonized with SFB or *E. coli* and treated or not with LTβR-Ig as described in Figure 4. Data

represent individual values and median. *p<0.02, #p<0.0001 compared to SFB-colonized mice by a nonparametric Mann-Whitney test.

Numbers of total IgA-, IgG- and IgM-SC in the MLN (B) and spleen (C) of indicated mice on d20 postcolonization. Bars represent mean for each subclass ± SD. *p<0.05 compared to non-treated SFB-colonized mice.

(D-E) Percentages and absolute numbers of $B220^+$ $GL7^+$ lymphocytes isolated from MLN of indicated mice (See figure 4 for details), and analyzed by flow cytometry. *p<0.01, #p<0.02 compared to non-treated SFB-colonized mice by a nonparametric Mann-Whitney test.

Figure 7. Reactivity of IgA-SC to bacteria seems independent on numbers of SHM

(A) Numbers of total (white bars) and bacteria-specific IgA-SC estimated by ELISPOT in the LP of GF, Cv and SFB- or *E. coli*-monocolonized mice at indicated time postcolonization. Reactivity of IgA-SC was tested against *E. coli* lysate (grey bars), SFB lysate (black bars) or *B. vulgatus* and *Clostridium* lysates (hatched bars). Bars represent mean ± SD. Numbers indicate the percentages of specific reactivity. * and #, p<0.05 compared respectively to GF and Cv by a nonparametric Mann-Whitney test.

(B) Numbers of somatic hypermutations were determined by sequencing of DNA extracted from small intestine LP of mice colonized with SFB or *E. coli* for 40 and 60 days. Bars indicate the average number of mutations among whole sequences tested (open bars) and among mutated sequences (hatched bars). n = 2 mice/group.

Figure S1: Cytokine secretion in response to polyclonal or specific stimulation

LP lymphocytes were isolated from small intestine of GF mice or mice colonized with *E. coli* for 20 days, and stimulated for 3 days by anti-CD3/CD28, *E. coli* lysate (specific) or

irrelevant bacterial lysate (non-specific), or left non stimulated (NS). Cytokines were measured in culture supernatants by BioPlex. Bars represent mean ± SD.

Figure S2: Impact of innate MyD88/TRIF pathway on cytokine secretion by intestinal T cells

LP lymphocytes were isolated from small intestine of C57BL/6 mice wild-type (WT) or MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ deficient (MyDTrif), either GF or colonized with SFB for 20 days, and stimulated for 3 days by anti-CD3/CD28 (black symbols), SFB lysate (red symbols) or irrelevant bacterial lysates (white symbols). Cytokines were measured in culture supernatants by BioPlex. Data represent individual values and medians.

Figure S3: Impact of innate MyD88/TRIF pathway on humoral responses

Numbers of total IgA-, IgG and IgM-SC in Peyer's patches (PP), mesenteric lymph nodes (MLN) and spleen of C57BL/6 mice wild-type (WT) or MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ deficient (MyDTrif), either GF or colonized with SFB for 20 days. Bars represent mean ± SD for each Ig subclass.

Figure S4. Picture of whole small intestine from SFB mice colonized for 20 days, treated or not before birth with LTβR-Ig

Arrows indicate PP in untreated mice.

Figure S5. TLR signaling was dispensable for APRIL induction by SFB

mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in ileal biopsies of C57BL/6 mice wild-type (WT) or MyD88$^{-/-}$xTRIF$^{-/-}$ deficient (MyDTrif), either GF or colonized with SFB for 20 days.

mRNA expression is relative to appropriate GF mice (defined as 1; dotted line). Data represent individual values and medians.

Figure S6. Expression of *Aicda* mRNA in ileal biopsies of gnotobiotic mice, in presence or absence of organized lymphoid tissue

mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in LP of C3H/HeN mice colonized with SFB or *E. coli* K12 for 20 days. Mice were left untreated (NT) or treated with LTβR-Ig before birth only (PP^-), before birth and in the neonatal period (PI^-) or for long-term period, i.e. before and after birth plus during colonization period (PI^-Lt). mRNA expression is relative to untreated GF mice (defined as 1; dotted line). Individual values and median are shown.

Figure S7. Impact of absence of organized lymphoid tissue on cytokine secretion by intestinal lymphoid cells

LP lymphocytes (LPL) were isolated from small intestine of mice, treated or not with LTβR-Ig, and colonized with SFB for 20 days. LPL were stimulated for 3 days by anti-CD3/CD28, and cytokines were measured in culture supernatants by BioPlex. Data represent individual values and median.

Figure S8. Analysis of IgA-SC by ELISPOT

LP lymphocytes from GF, Cv and monocolonized mice were plated on plates coated with anti-IgA or bacterial lysate to count spots representative of total and bacteria-specific IgA-SC, respectively. Cross-reactivity with irrelevant bacterial lysate can also be estimated. (nt: not tested)

Figure 1

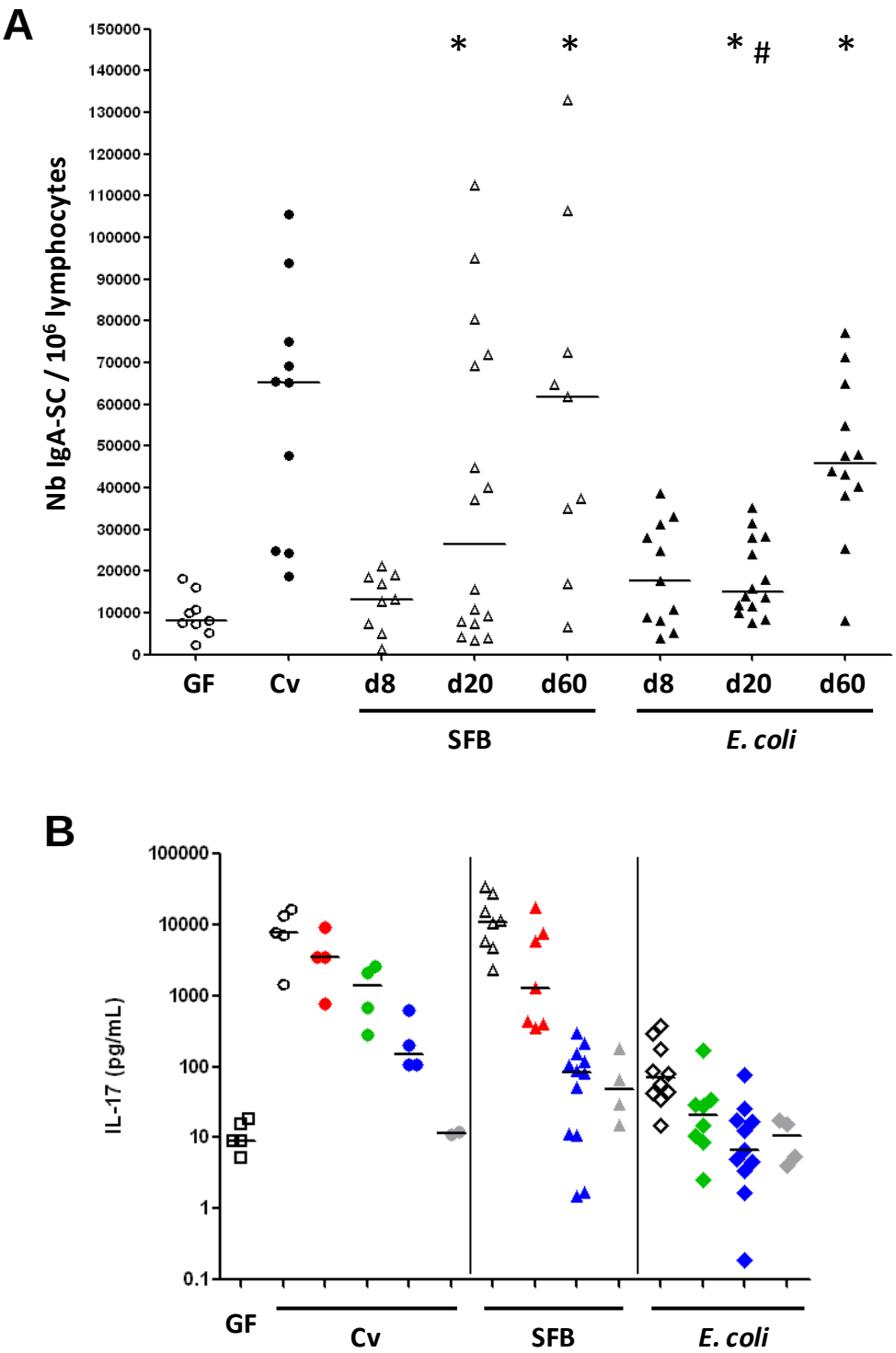

A
Nb IgA-SC / 10^6 lymphocytes
150000
140000
130000
120000
110000
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
*
*
*
#
*
GF
Cv
d8
d20
d60
d8
d20
d60
SFB
E. coli
B
IL-17 (pg/mL)
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
GF
Cv
SFB
E. coli

Figure 2

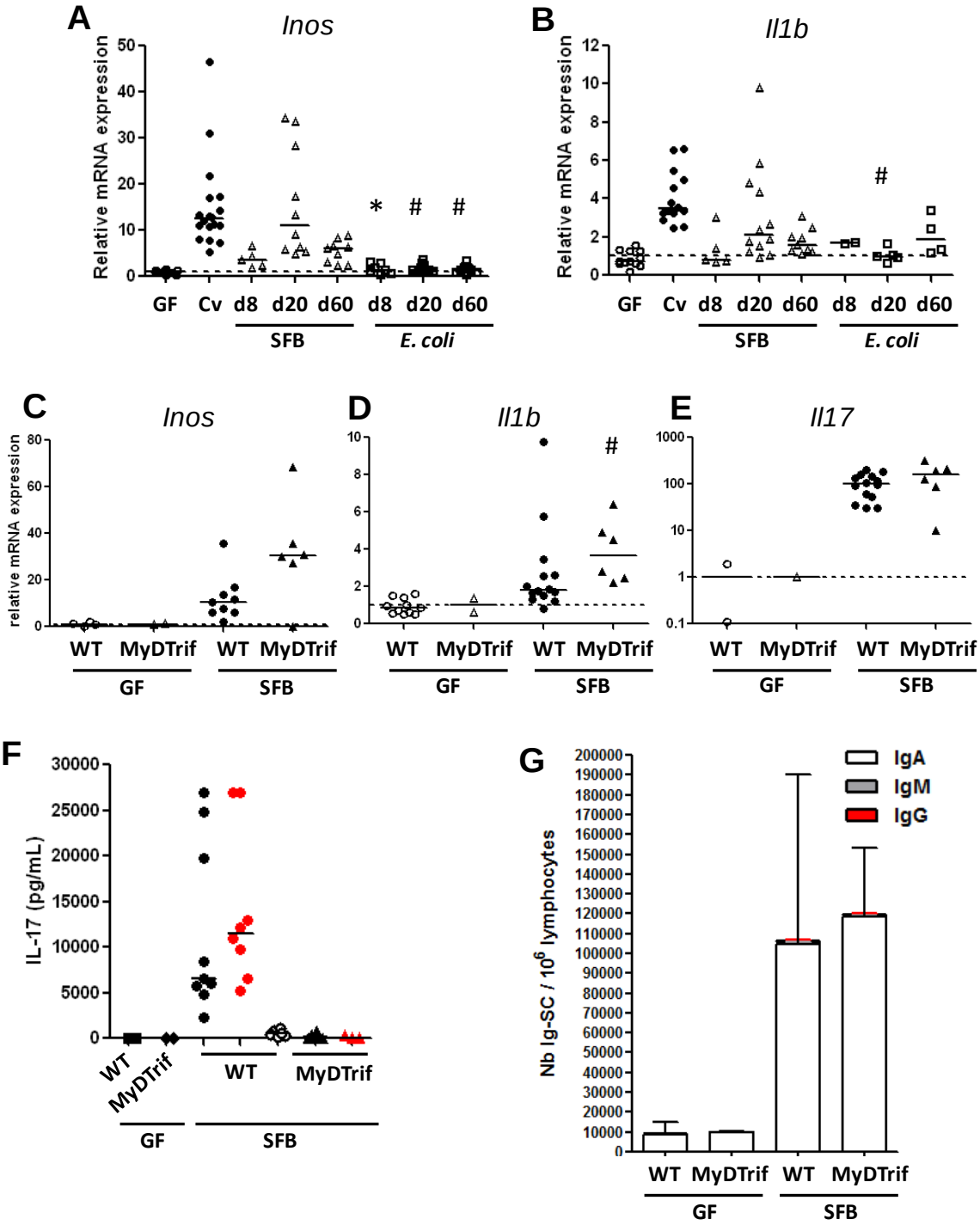

A
Inos
Relative mRNA expression
GF Cv d8 d20 d60 d8 d20 d60
SFB
E. coli
B
Il1b
Relative mRNA expression
GF Cv d8 d20 d60 d8 d20 d60
SFB
E. coli
C
Inos
relative mRNA expression
WT MyDTrif WT MyDTrif
GF
SFB
D
Il1b
WT MyDTrif WT MyDTrif
GF
SFB
E
Il17
WT MyDTrif WT MyDTrif
GF
SFB
F
IL-17 (pg/mL)
WT
MyDTrif
WT
MyDTrif
GF
SFB
G
IgA
IgM
IgG
Nb Ig-SC / 10^6 lymphocytes
WT MyDTrif WT MyDTrif
GF
SFB

Figure 3

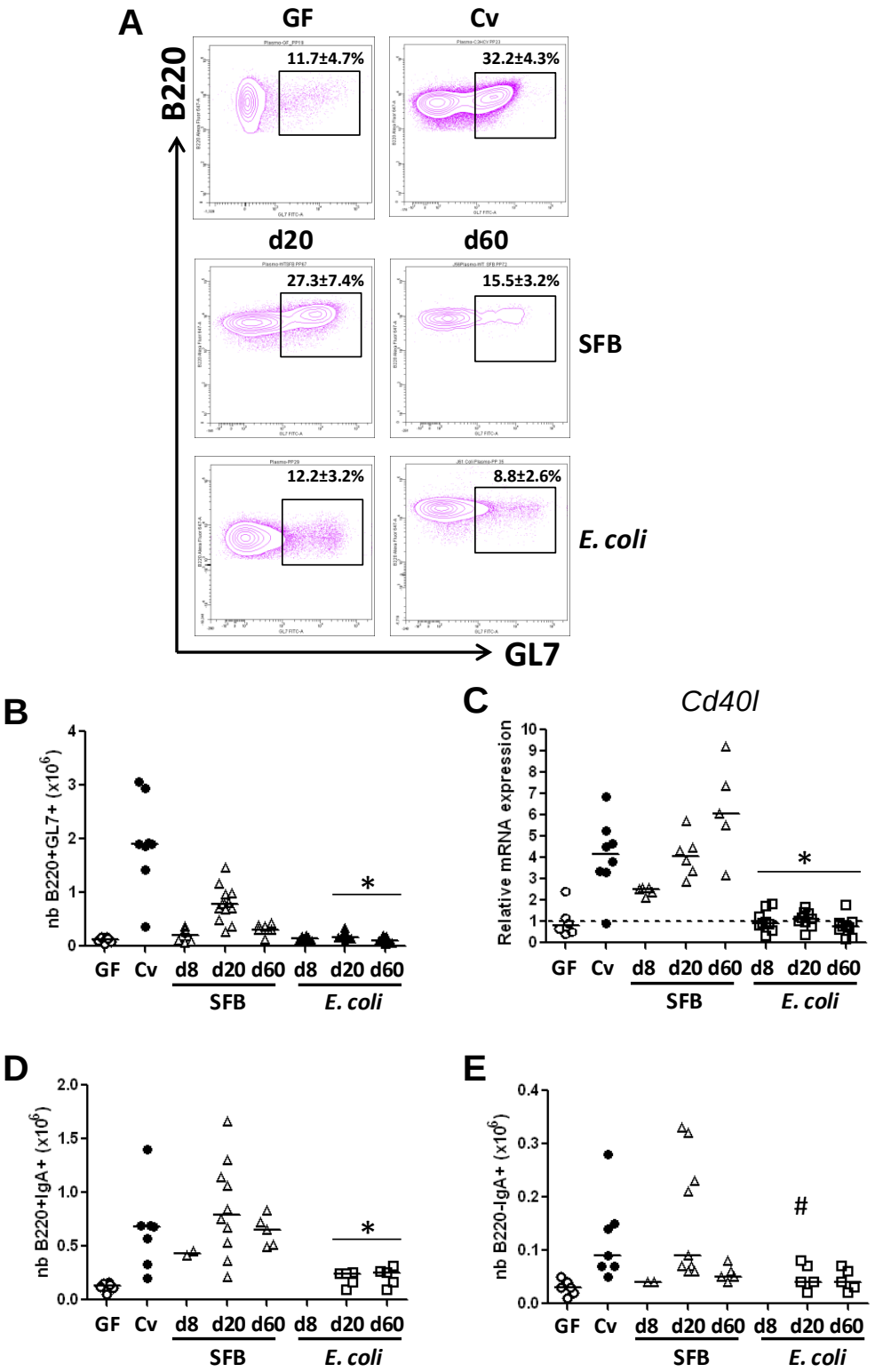

A
GF
Cv
B220
11.7±4.7%
32.2±4.3%
d20
d60
27.3±7.4%
15.5±3.2%
SFB
12.2±3.2%
8.8±2.6%
E. coli
GL7
B
nb B220+GL7+ (x10^6)
GF Cv d8 d20 d60 d8 d20 d60
SFB
E. coli
C
Cd40l
Relative mRNA expression
D
nb B220+IgA+ (x10^6)
E
nb B220-IgA+ (x10^6)

Figure 4

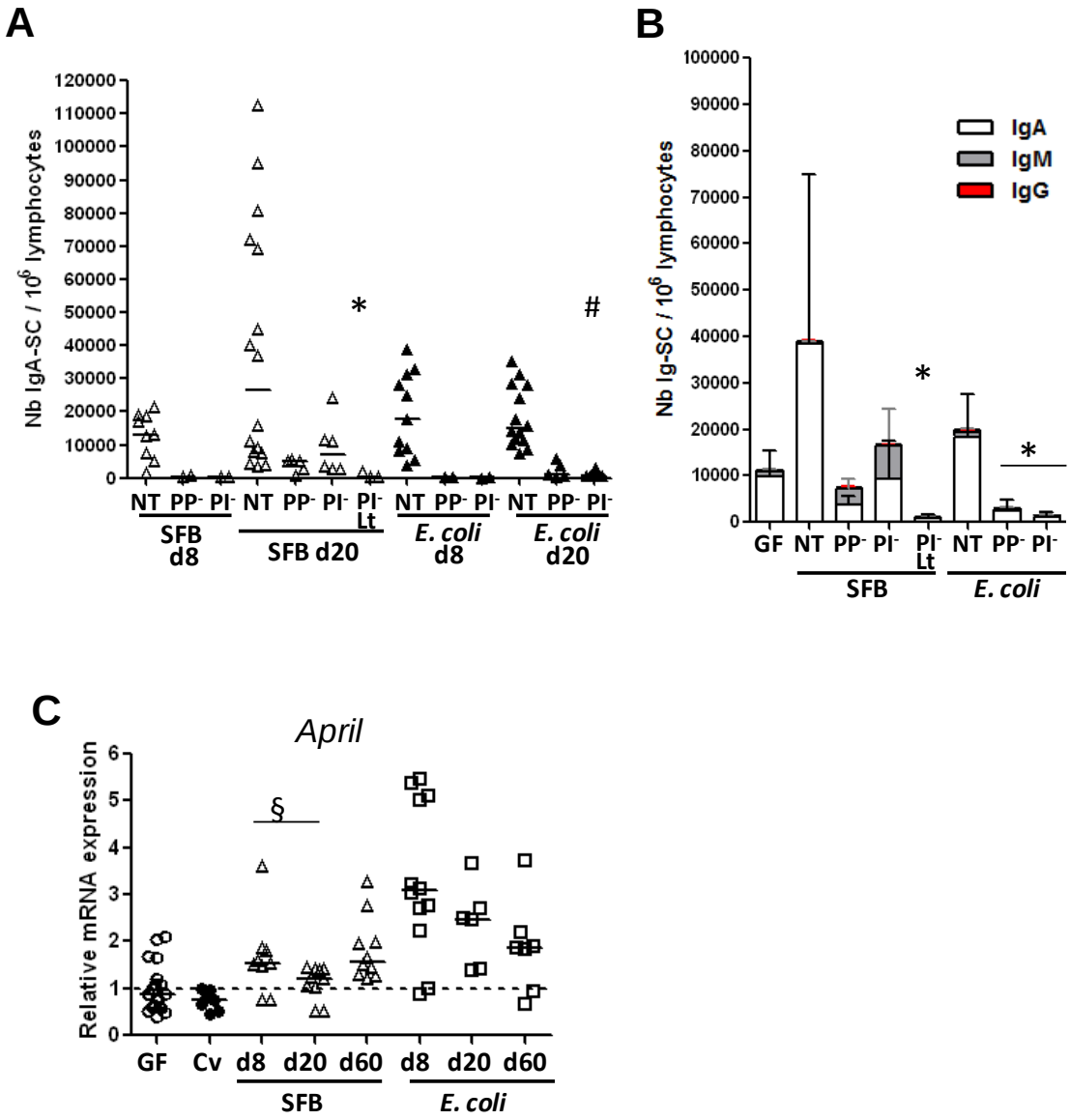

A
Nb IgA-SC / 10^6 lymphocytes
120000
110000
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
*
#
NT PP- PI-
SFB d8
NT PP- PI- PI- Lt
SFB d20
NT PP- PI-
E. coli d8
NT PP- PI-
E. coli d20
B
Nb Ig-SC / 10^6 lymphocytes
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
IgA
IgM
IgG
*
*
GF
NT PP- PI- PI- Lt
SFB
NT PP- PI-
E. coli
C
April
Relative mRNA expression
6
5
4
3
2
1
0
§
GF Cv d8 d20 d60
SFB
d8 d20 d60
E. coli

Figure 5

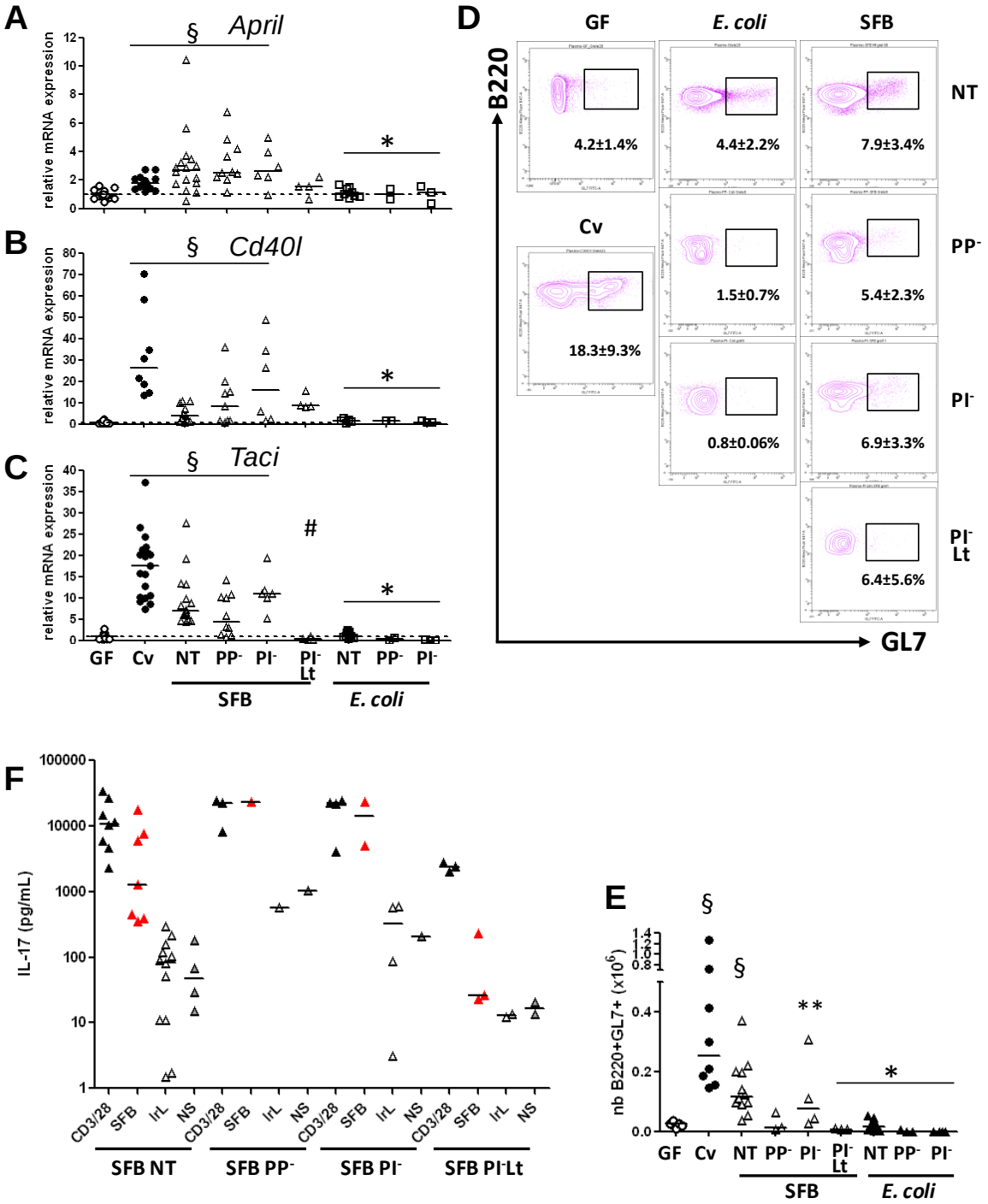

A
April
relative mRNA expression
B
Cd40l
C
Taci
GF
Cv
NT
PP-
PI-
PI- Lt
SFB
E. coli
D
B220
GL7
4.2±1.4%
4.4±2.2%
7.9±3.4%
18.3±9.3%
1.5±0.7%
5.4±2.3%
0.8±0.06%
6.9±3.3%
6.4±5.6%
E
nb B220+GL7+ (x10^6)
F
IL-17 (pg/mL)
CD3/28
SFB
IrL
NS
SFB NT
SFB PP-
SFB PI-
SFB PI-Lt

Figure 6

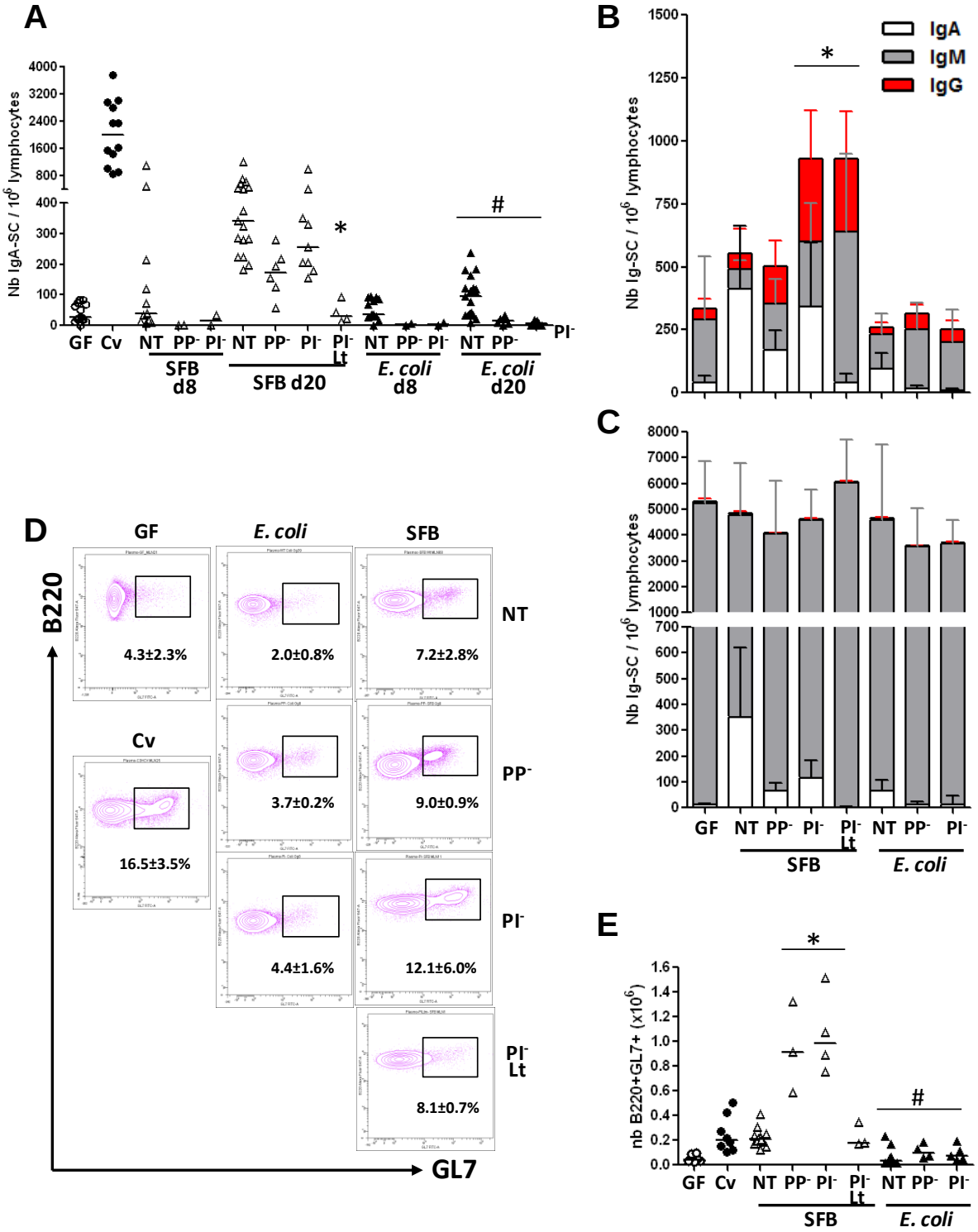

A
Nb IgA-SC / 10^6 lymphocytes
GF Cv NT PP- PI- NT PP- PI- PI- Lt NT PP- PI- NT PP- PI-
SFB d8
SFB d20
E. coli d8
E. coli d20
B
IgA
IgM
IgG
Nb Ig-SC / 10^6 lymphocytes
C
Nb Ig-SC / 10^6 lymphocytes
GF NT PP- PI- PI- Lt NT PP- PI-
SFB
E. coli
D
GF
E. coli
SFB
B220
GL7
NT
PP-
PI-
PI- Lt
Cv
4.3±2.3%
2.0±0.8%
7.2±2.8%
16.5±3.5%
3.7±0.2%
9.0±0.9%
4.4±1.6%
12.1±6.0%
8.1±0.7%
E
nb B220+GL7+ (x10^6)
GF Cv NT PP- PI- PI- Lt NT PP- PI-
SFB
E. coli

Figure 7

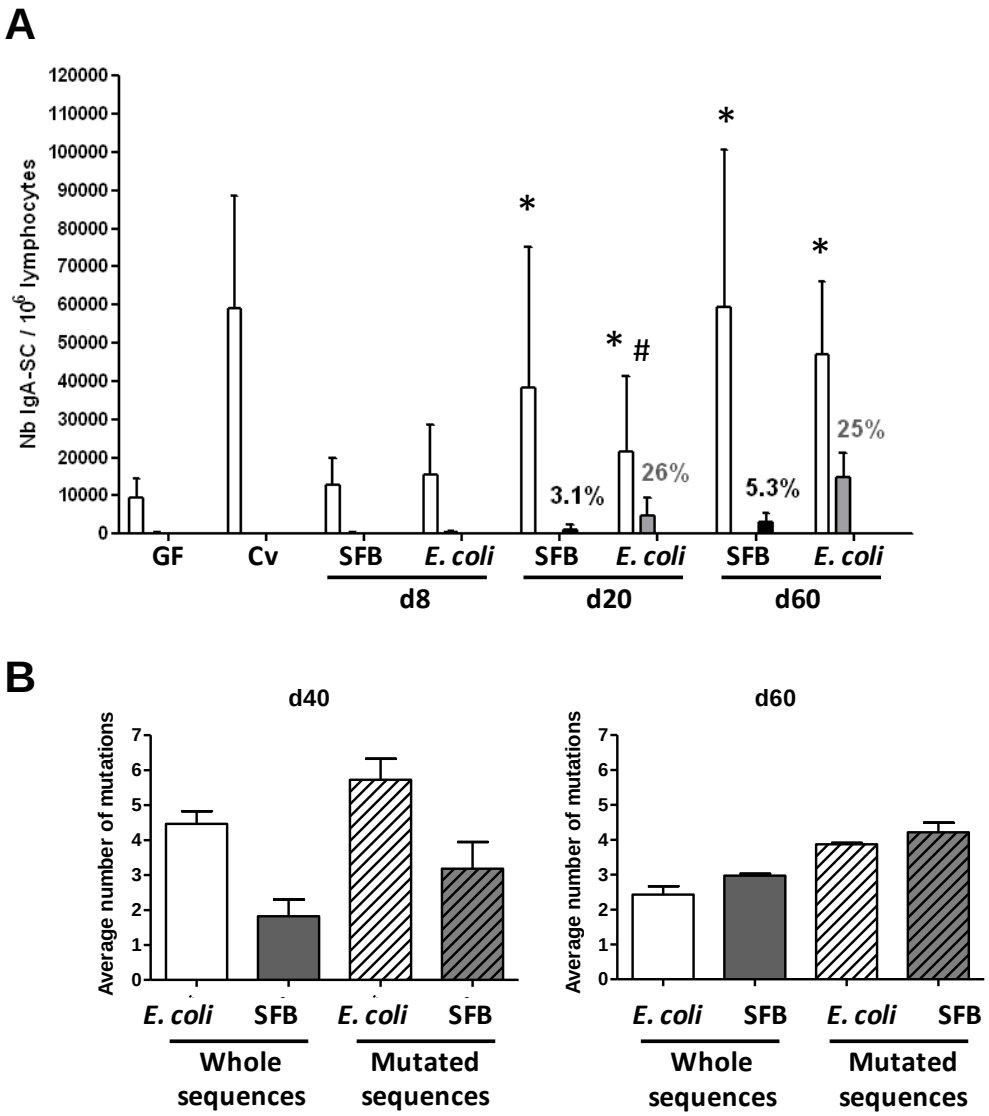

A
Nb IgA-SC / 10^6 lymphocytes
120000
110000
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
*
*
#
*
*
3.1%
26%
5.3%
25%
GF
Cv
SFB
E. coli
SFB
E. coli
SFB
E. coli
d8
d20
d60
B
d40
d60
Average number of mutations
7
6
5
4
3
2
1
0
E. coli
SFB
E. coli
SFB
Whole sequences
Mutated sequences

Figure S1

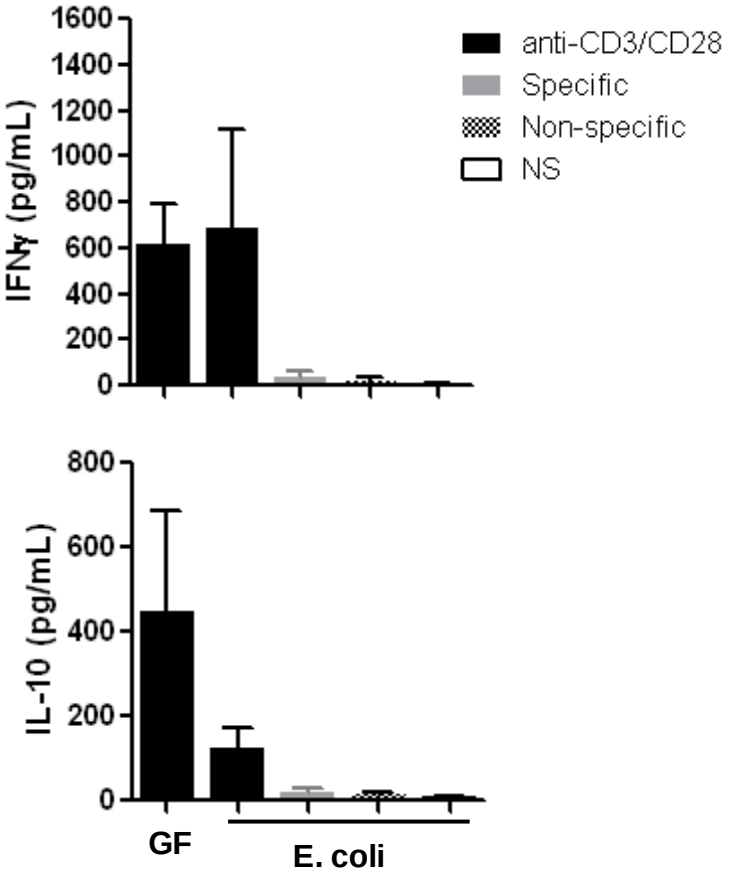

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IFNγ (pg/mL)
anti-CD3/CD28
Specific
Non-specific
NS
800
600
400
200
0
IL-10 (pg/mL)
GF
E. coli

Figure S2

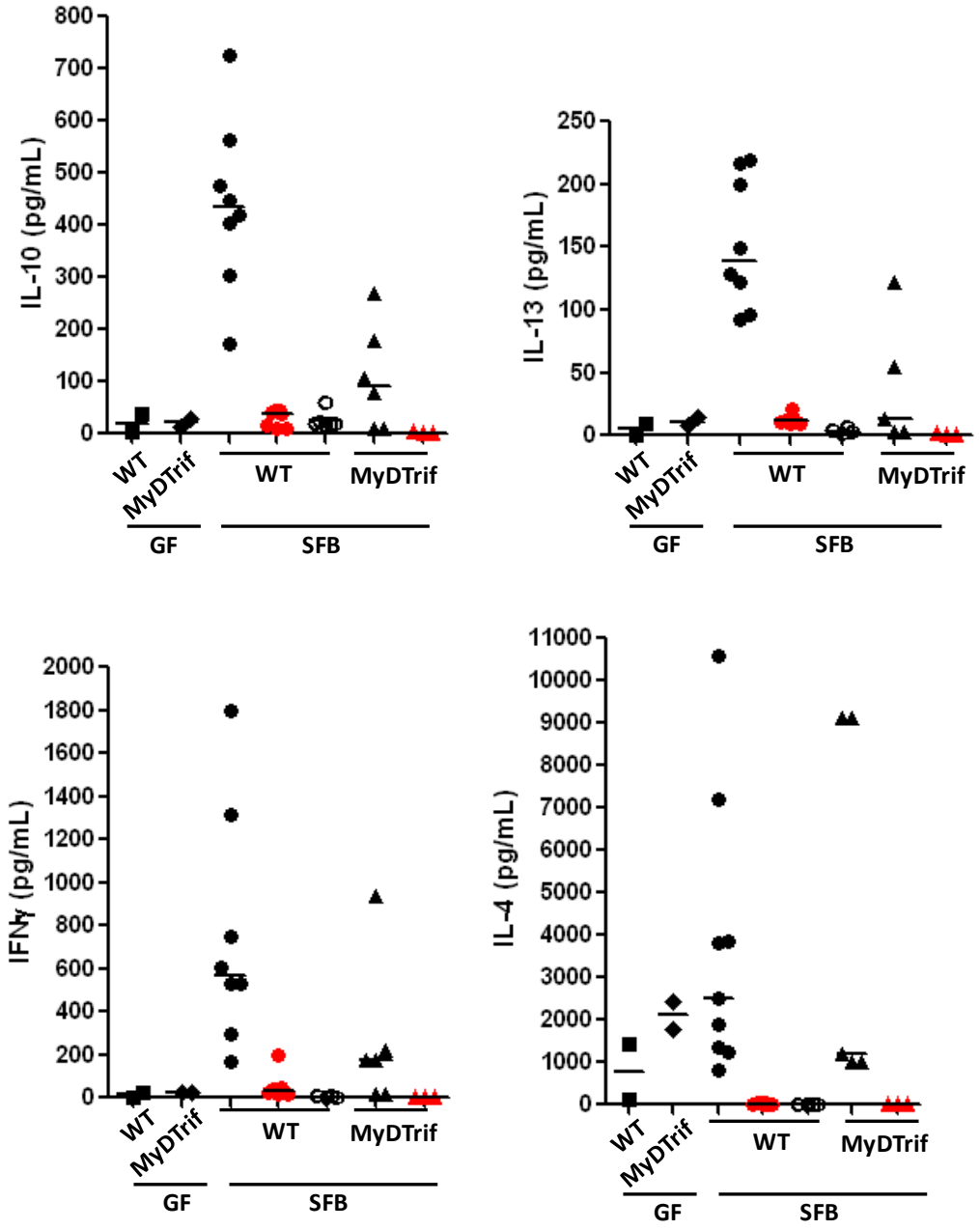

IL-10 (pg/mL)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
WT
MyDTrif
WT
MyDTrif
GF
SFB
IL-13 (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
WT
MyDTrif
WT
MyDTrif
GF
SFB
IFNγ (pg/mL)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
WT
MyDTrif
WT
MyDTrif
GF
SFB
IL-4 (pg/mL)
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
WT
MyDTrif
WT
MyDTrif
GF
SFB

Figure S3

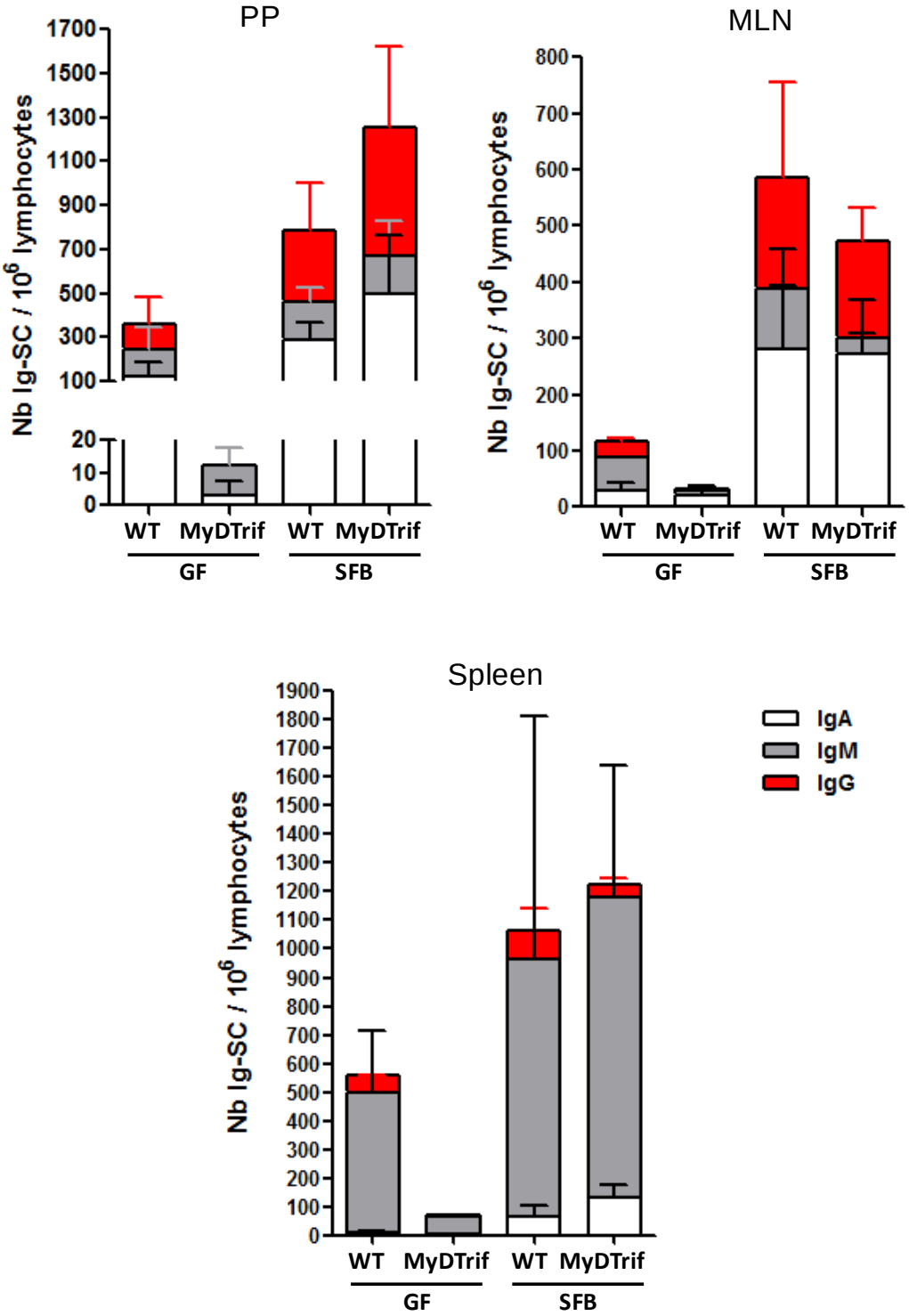

PP
MLN
Spleen
Nb Ig-SC / 10^6 lymphocytes
WT
MyDTrif
GF
SFB
IgA
IgM
IgG

Figure S4

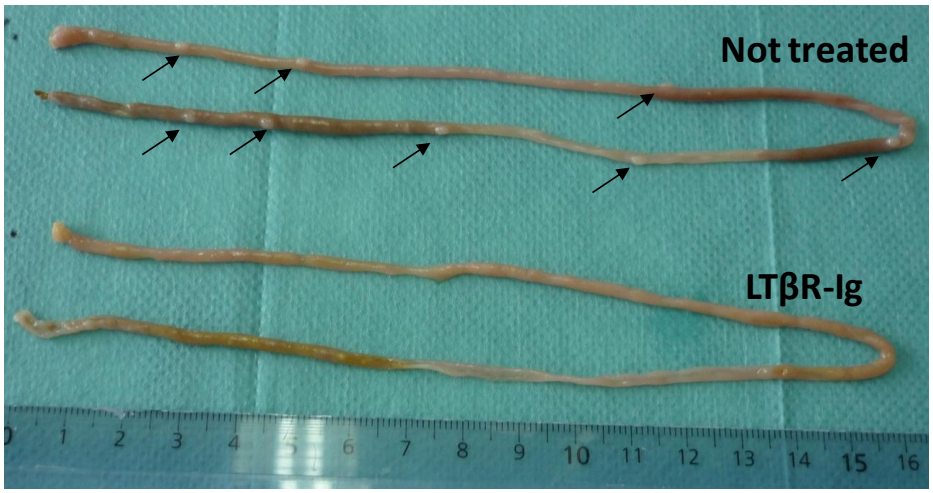


Figure S5

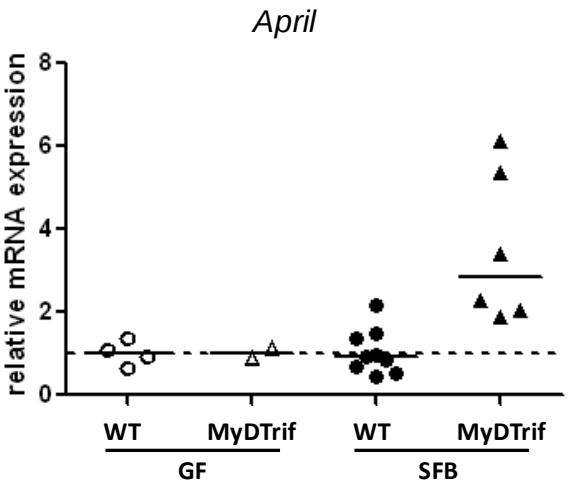


Figure S6

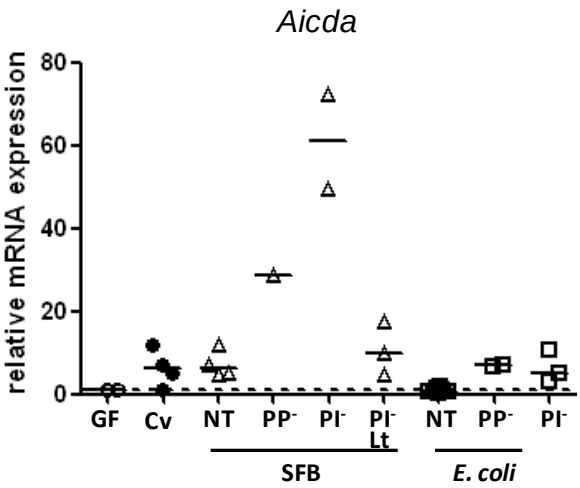


Figure S7

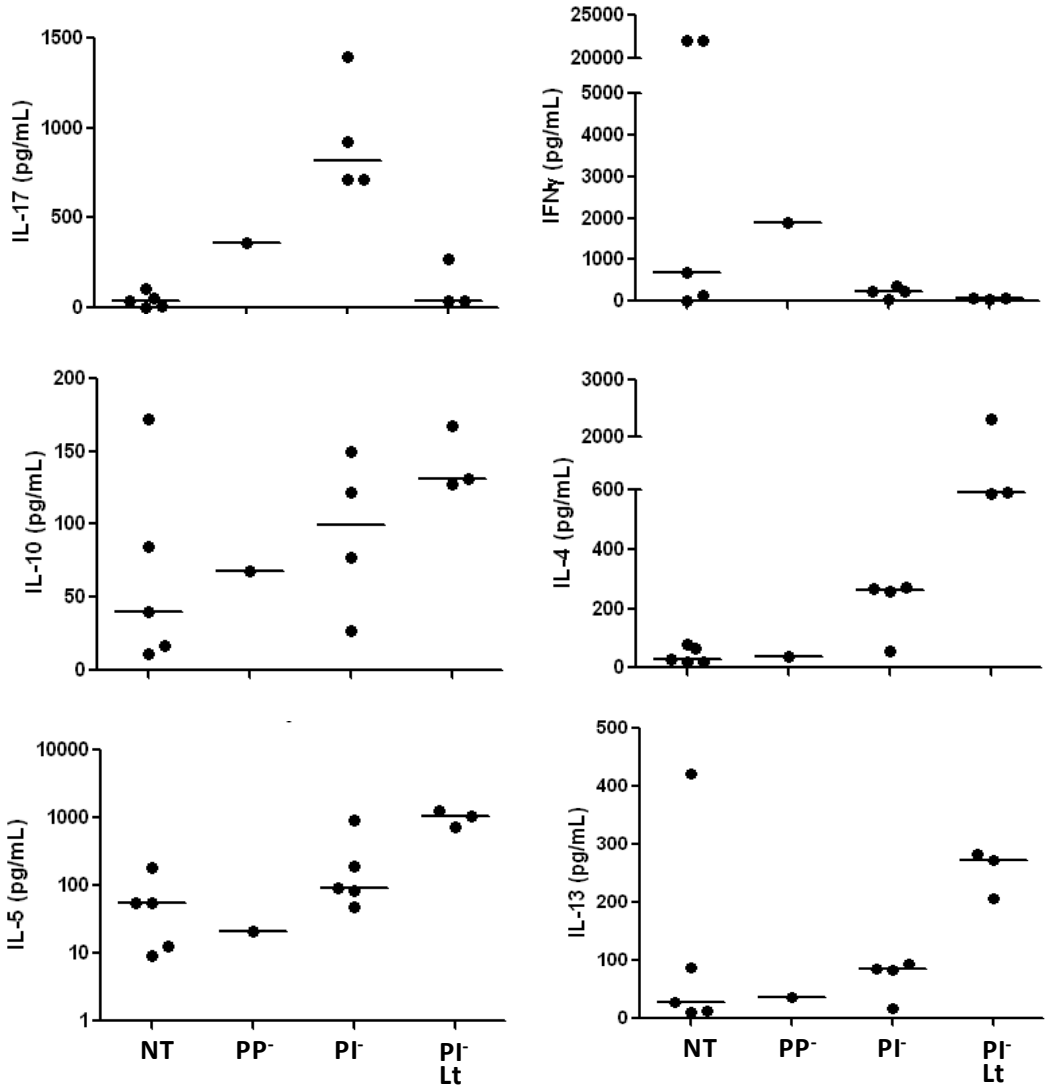
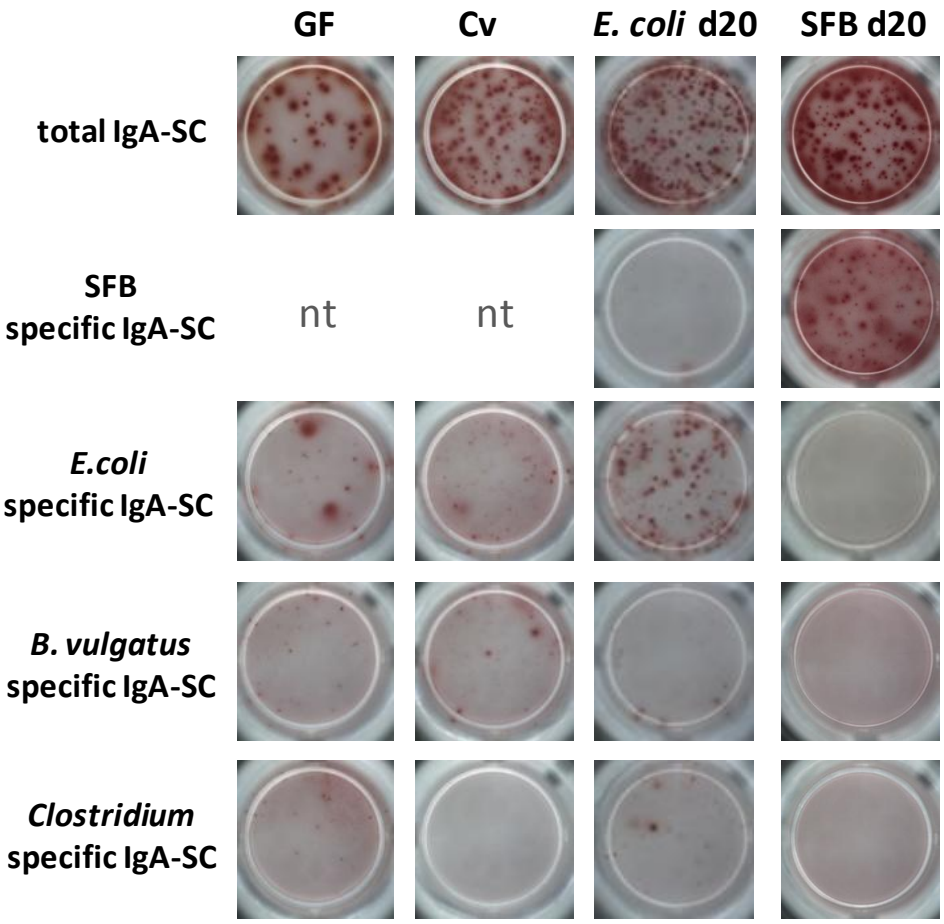

IL-17 (pg/mL)
IFNγ (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
IL-4 (pg/mL)
IL-5 (pg/mL)
IL-13 (pg/mL)
NT
PP-
PI-
PI-
Lt

Figure S8


GF
Cv
E. coli d20
SFB d20
total IgA-SC
SFB specific IgA-SC
nt
nt
E.coli specific IgA-SC
B. vulgatus specific IgA-SC
Clostridium specific IgA-SC

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Etude des mécanismes T-dépendants dans l'induction des réponses IgA intestinales en souris monocolonisées par SFB : rôle des lymphocytes T CD4$^+$ CD25$^+$

Plusieurs arguments sont en faveur de mécanismes T-dépendants à l'origine de l'initiation des réponses IgA intestinales dans les plaques de Peyer chez les souris monocolonisées par SFB. En effet, on détecte par cytométrie en flux dans ces structures une augmentation du pourcentage et du nombre des cellules B220$^+$ GL7$^+$ caractéristiques de centres germinatifs actifs. On observe en outre une augmentation des transcrits de CD40L dans ce compartiment, en faveur d'une possible interaction entre CD40 et CD40L, exprimés respectivement sur les lymphocytes B et sur les lymphocytes T activés. Ces interactions décrites dans les plaques de Peyer, induiraient la réaction des centres germinatifs et l'induction de l'enzyme AID nécessaire à la commutation de classe T-dépendante IgM-IgG ou IgM-IgA (Cerutti 2008) (Tsuji *et al*. 2008). Par ailleurs, il a récemment été décrit que les lymphocytes T régulateurs (Treg) CD25$^+$ FoxP3$^+$, notamment en se différenciant en cellules T_{FH} dans les plaques de Peyer, seraient capables d'initier les interactions CD40L-CD40 et ainsi d'induire la commutation de classe IgM-IgA (Cong *et al.*, 2009) (Tsuji *et al.*, 2009).

Dans le but de confirmer l'hypothèse de mécanismes T-dépendants à l'origine des réponses IgA intestinales induites par la SFB, nous avons décidé de mener une première série d'expériences chez des souris déficientes en cellules T CD25$^+$, suite à l'administration d'anticorps déplétant anti-CD25 selon le schéma expérimental suivant :

Figure 1 : Schéma expérimental de déplétion des lymphocytes T CD4$^+$ CD25$^+$ dans les souris monocolonisées par SFB. Les souris âgées de 8 semaines reçoivent soit l'anticorps bloquant anti-CD25, soit l'isotype contrôle.

Un marquage de surface des lymphocytes isolés du chorion, des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques, suivi de l'analyse par cytométrie en flux des populations T CD4$^+$ nous a permis de vérifier la déplétion en cellules T CD4$^+$ CD25$^+$ dans notre modèle qui a reçu l'anti-CD25. Les réponses IgA ont été analysées par ELISPOT dans les plaques de Peyer, le chorion et les ganglions mésentériques à J20 post-colonisation des souris axéniques avec la SFB.

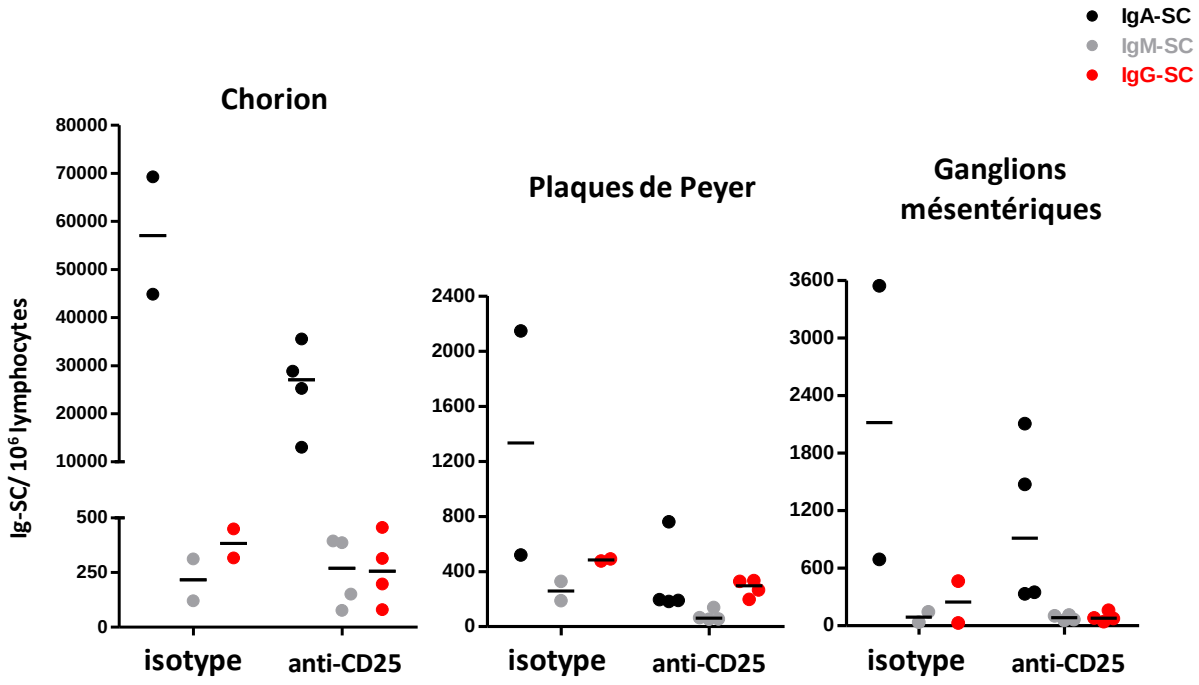


Figure 2 : Impact de la déplétion en lymphocytes T CD4$^+$ CD25$^+$ sur les réponses humorales. Nombre de plasmocytes sécréteurs (Ig-SC) dans le chorion, les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques des souris à 20 jours de monocolonisation avec la SFB. Les souris ont reçu soit l'anticorps déplétant (anti-CD25), soit l'isotype contrôle (isotype).

Les résultats montrent que les souris traitées avec l'anticorps déplétant la population de lymphocytes T CD4$^+$ CD25$^+$ présentent une diminution du nombre des IgA-SC dans le chorion, les plaques de Peyer, et de façon plus modérée dans les ganglions mésentériques. Dans les plaques de Peyer, on observe également une diminution des IgM-SC et des IgG-SC. Ces données préliminaires suggèrent qu'une partie des mécanismes qui initient les réponses IgA intestinales pourrait être Treg-dépendant impliquant les populations T CD4$^+$ CD25$^+$. Bien que les réponses IgA, IgM et IgG soient plus particulièrement diminuées dans les plaques de Peyer, on ne peut pas établir pour le moment si les mécanismes Treg-dépendants sont générés dans ce compartiment ou bien dans les structures lymphoïdes tertiaires. Néanmoins, ces données renforcent notre hypothèse quant à l'existence de mécanismes T-

dépendants induits par la colonisation avec SFB. Des résultats complémentaires seront nécessaires pour établir le(s) site(s) où sont initiés ces mécanismes. D'autre part, l'origine des populations T_{FH} étant controversée (Nurieva *et al.*, 2008), nous chercherons à tester le rôle global des populations T $CD4^+$ dans les mécanismes d'induction des IgA, chez des souris traitées avec un anticorps anti-$CD4^+$. Ces expériences seront réalisées en parallèle entre nos deux modèles gnotoxéniques colonisés par SFB ou *E. coli* de façon à confirmer l'importance de mécanismes T-dépendants avec SFB et non avec *E. coli*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de ma thèse a tout d'abord été de compléter les travaux initiés au laboratoire, cherchant à définir la nature des réponses immunes induites par les bactéries lors de la colonisation intestinale et à identifier les bactéries particulièrement promotrices de ces réponses. Ces recherches, basées sur l'utilisation de souris gnotoxéniques et l'analyse combinée des réponses immunes par des approches transcriptomique et protéique, nous ont permis d'identifier les fortes propriétés stimulatrices d'une bactérie, la SFB. Cette bactérie est capable de stimuler le large spectre des réponses immunes adaptatives T $CD4^+$ (Th1, Th2, Th17, Treg) induit par un microbiote murin conventionnel ; une propriété qui semble restreinte à un petit nombre de bactérie dont la SFB est le prototype. Ces données complétaient les travaux anciens d'autres groupes montrant la forte capacité de la SFB à stimuler les réponses IgA intestinales et périphériques, détectées dans la rate de souris monoassociées. Ces travaux avaient en outre suggéré la faible spécificité des IgA produites dans l'intestin de ces souris.

Contrairement à ce que nous avons observé avec les réponses T $CD4^+$, l'analyse des réponses SIgA fécales dans nos différents modèles de souris gnotoxéniques a permis de constater que toutes les bactéries testées, seules ou en association, sont capables d'induire ces réponses IgA. La particularité de la SFB d'adhérer à l'épithélium intestinal, notamment à celui des plaques de Peyer, pose la question du rôle de l'adhésion dans les propriétés immunostimulantes de la SFB.

Le second objectif de ma thèse a donc été d'appréhender pourquoi et comment la SFB stimule si efficacement la maturation post-natale du système immunitaire intestinal, en caractérisant les voies d'induction des réponses immunes activées par la SFB, et notamment le rôle des plaques de Peyer. Nos résultats indiquent que les réponses IgA induites par le microbiote le sont majoritairement dans les plaques de Peyer, confirmant des travaux d'autres groupes quant au rôle majeur de ces structures dans l'initiation des réponses IgA intestinales. Néanmoins, une partie des réponses IgA induites par la SFB sont initiées dans des structures lymphoïdes tertiaires qui semblent en outre nécessaires à l'induction d'une réponse IL-17 spécifique de la SFB. L'ensemble de ces résultats soutient l'hypothèse que les fortes propriétés immunostimulantes de la SFB pourraient être liées à sa capacité à induire de multiples sites et voies d'induction des réponses immunes.

Modèle murin gnotoxénique

Nous avons fait le choix d'étudier l'impact du dialogue hôte-microbiote sur le développement du système immunitaire en utilisant des souris gnotobiotiques, c'est-à-dire des souris axéniques, maintenues en isolateur, colonisées par des bactéries individuelles ou des microbiotes plus ou moins complexes, à un temps déterminé de leur vie. Ce modèle d'étude contraignant est le seul permettant d'élever des animaux en environnement microbien contrôlé et d'analyser l'impact sur l'hôte de bactéries ou de groupes bactériens donnés. En effet, le traitement d'animaux conventionnels aux antibiotiques ne permet pas une élimination durable du microbiote complexe, ni même une élimination ciblée d'un type bactérien particulier.

Notre modèle d'étude de souris axéniques colonisées à l'âge adulte a été validé par la comparaison des profils de transcrits et des cytokines produites entre des souris conventionnelles et des souris « conventionnalisées », colonisées par un microbiote murin total à huit semaines de vie. En effet, l'analyse des réponses immunes innées et adaptatives par les différentes techniques utilisées (Transcriptomique, PCR en temps réel, ELISA) montre des profils de réponses comparables entre les deux groupes d'animaux.

Par ailleurs, la colonisation par des bactéries individuelles offre la possibilité d'étudier la spécificité des réponses immunes induites et les mécanismes d'induction particuliers à chaque bactérie.

Site d'initiation des réponses immunes induites par le microbiote - Rôle des PP

Contrairement à la majorité des bactéries commensales qui restent dans le mucus, à distance des cellules épithéliales intestinales, la SFB a la particularité d'adhérer à la muqueuse, et notamment aux plaques de Peyer, de façon hôte-spécifique. Une première hypothèse pour expliquer le rôle immunostimulant de la SFB a donc été son adhésion aux plaques de Peyer, décrites comme les sites majeurs d'induction des réponses adaptatives intestinales (Craig and Cebra, 1971). Nous avons testé cette hypothèse chez des souris déficientes en plaques de Peyer et en follicules lymphoïdes isolés (FLI), sites alternatifs potentiels des réponses humorales intestinales (Tsuji *et al*., 2008), suite au traitement avec la protéine chimère LTβR-Ig. A l'instar des résultats obtenus avec *E. coli* et SFB, il apparaît que les plaques de Peyer sont bien le site majeur d'induction des réponses IgA intestinales induites par le microbiote. Cependant, alors que ces structures sont indispensables pour *E. coli*, SFB semble capable de stimuler une voie alternative dépendante de la formation de tissus lymphoïdes tertiaires (tLT).

L'hypothèse de cette voie alternative est suggérée par la mise en évidence de centres germinatifs dans le chorion des souris dépourvues de plaques de Peyer et FLI, colonisées par SFB, et par la disparition de la réponse IgA chez les souris traitées de façon prolongée avec la protéine chimérique LTβR-Ig. Ce traitement à long terme pourrait avoir des répercussions importantes sur le développement normal des réponses immunes intestinales, en limitant ou en empêchant le recrutement de cellules B naïves dans la LP et/ou en modifiant le réseau local de cellules dendritiques (Kang *et al*., 2002) (De Trez, 2012). Cependant, un argument en défaveur de cet effet « délétère » est suggéré par le fait qu'une réponse anticorps, en particulier IgG, est détectable dans les ganglions mésentériques de ces souris. Cette observation pose d'ailleurs deux questions : 1) comment est induite cette réponse dans les ganglions mésentériques ? En l'absence de tLT, et donc de réponse IgA et de réponse IL-17 spécifique, l'adhésion de la SFB à l'épithélium est-elle encore augmentée ? La SFB peut-elle alors être plus facilement prise en charge par les cellules dendritiques du chorion qui, en migrant vers les ganglions mésentériques, induisent cette réponse IgG ? 2) quel est le rôle de cette réponse IgG ? Est-elle à l'origine d'une réponse IgG systémique ? L'analyse des sérums de nos animaux devrait nous permettre de répondre facilement à cette dernière question.

Mécanismes d'induction des réponses IgA

Bien que les plaques de Peyer semblent clé dans l'induction des réponses IgA à la flore, les résultats obtenus avec *E. coli* et SFB suggèrent que leurs mécanismes d'induction diffèrent selon les bactéries. Deux mécanismes d'induction des IgA sont décrits dans la littérature : un mécanisme T-dépendant, associé à la formation de centres germinatifs et à l'interaction CD40/CD40L, et un mécanisme T-indépendant qui dépendrait de la production d'APRIL par les cellules épithéliales et/ou les cellules dendritiques, et son interaction avec son récepteur TACI exprimé à la surface des cellules B (Fagarasan *et al*., 2010). Nos résultats suggèrent que les réponses IgA induites par la SFB seraient plutôt T-dépendantes, même si l'augmentation de l'expression des messagers codant pour APRIL dans le chorion des souris déficientes en plaques de Peyer et FLI laisse penser qu'un mécanisme T-indépendant pourrait aussi être mis en place dans les tLT. De plus, des essais préliminaires chez des souris monocolonisées par SFB, déplétées en cellules T $CD4^+$ $CD25^+$, montrent une baisse de moitié du nombre de cellules sécrétrices d'IgA présentes dans le LP, confirmant par ailleurs les données de la littérature suggérant que les cellules T régulatrices sont impliquées dans le développement de la réponse IgA (Cong *et al*., 2009) (Tsuji *et al*., 2009). Au contraire, le peu

de centres germinatifs induits par *E. coli* dans les plaques de Peyer, l'absence d'expression de CD40L mais une forte expression d'APRIL plaident plutôt en faveur de mécanismes T-indépendants induits par cette bactérie. Une possible commutation de classe IgA dans les plaques de Peyer en l'absence de CD40 et donc de mécanismes T-dépendants, est à rapprocher des données récentes de Bergqvist *et al*. (2010) suggérant que seule la maturation d'affinité des IgA dans les plaques de Peyer, par le biais des hypermutations somatiques, nécessite la formation de centres germinatifs et la présence de cellules exprimant fortement GL7. Néanmoins, afin de conclure définitivement sur l'implication des voies T-dépendante ou T-indépendante dans nos modèles gnotoxéniques, il semble indispensable de conforter nos données dans des modèles de souris déplétées en cellules T, par le biais d'injections d'anticorps anti-CD4 durant les trois semaines de colonisation. De plus, l'importance de la voie APRIL sera testée chez des souris traitées avec la protéine antagoniste chimère TACI-Ig. En raison des interactions possibles BAFF/TACI, l'utilisation d'une telle protéine pourrait aussi, au moins en partie, altérer une voie de signalisation BAFF-dépendante, décrite plus particulièrement comme assurant un rôle dans la prolifération et le maintien des cellules B dans les follicules que dans la commutation de classe (Fagarasan *et al*., 2010). Cependant, nos données de PCR quantitative sur les plaques de Peyer et le chorion des souris ne montrent pas de modification de l'expression de cette protéine en fonction du microbiote, suggérant qu'elle est peu impliquée dans l'induction des réponses IgA.

Spécificité / affinité des réponses IgA

La probable utilisation de mécanismes différents pour l'induction des réponses IgA par les bactéries, notamment SFB et *E. coli*, pose la question d'une répercussion possible sur la spécificité et l'affinité de ces réponses IgA. En effet, les données de la littérature associent les mécanismes T-indépendants à des réponses IgA de faible affinité, avec peu d'hypermutations somatiques, mais de forte réactivité croisée (Fagarasan *et al*., 2010) (Slack *et al*., 2012).

Pour aborder l'étude de la spécificité des réponses IgA, nous avons choisi de travailler sur les cellules sécrétrices d'IgA isolées du chorion afin d'éviter le biais apporté par la fixation des IgA sécrétoires sur les bactéries présentes dans la lumière intestinale (van der Waaij *et al*., 1996). De plus, la spécificité est évaluée par ELISPOT, par la réactivité de ces cellules à des lysats bactériens correspondants, ou non, à la bactérie colonisatrice. Nos résultats montrent des nombres comparables de cellules sécrétrices d'IgA induites par SFB et *E. coli*, notamment après des temps longs de colonisation. Par contre, l'analyse de la spécificité des

IgA envers *E. coli* est, de façon inattendue, relativement élevée (25%) en comparaison de celle détectée envers SFB (5%). En effet, des résultats de la littérature suggèrent que les réponses IgA spécifiques de différentes bactéries du microbiote sont très faibles (< 1%) et ne dépassent généralement pas 5% des réponses IgA totales (Bos *et al*., 2001; Shroff *et al*., 1995) (Talham *et al*., 1999). Cette forte spécificité a été décrite chez des souris monoassociées avec *Morganella morganii*, une bactérie capable de transloquer fortement dans les ganglions mésentériques, voire dans la rate (Shroff et al., 1995). Cependant, nos données préliminaires de translocation de la souche *E. coli* MG1655 montrent une translocation limitée aux ganglions mésentériques, et à un niveau bien plus faible que celui décrit pour *M. morganii* (~100 bactéries vs ~ 5000), suggérant l'absence de relation entre translocation et spécificité de la réponse IgA.

De façon remarquable, nos données d'ELISPOT montrent aussi que les IgA qui répondent spécifiquement au lysat bactérien (même si elles représentent une faible proportion des IgA totales produites, en particulier avec SFB) ne répondent pas aux autres lysats bactériens testés, suggérant une faible réactivité croisée pour ces IgA spécifiques. Ces données d'ELISPOT corroborent celles obtenues chez l'homme, montrant un faible pourcentage de réactivité croisée avec différentes souches bactériennes pour des IgA obtenues à partir de clones intestinaux (Benckert 2011). Globalement, l'existence d'IgA spécifiques mais de faible réactivité croisée, suggère une forte affinité des IgA spécifiques induits par le microbiote et notamment par nos deux bactéries. Une telle hypothèse semble pourtant inattendue pour *E. coli* si l'on considère que l'induction des IgA par cette bactérie pourrait dépendre de mécanismes T-indépendants. Une réponse à cette hypothèse pourrait être apportée par l'analyse de la présence d'hypermutations somatiques, associées à la maturation d'affinité des Ig. Des premiers essais ont été réalisés sur des plasmocytes $CD138^{+}CD43^{+}$ isolés du chorion de nos souris gnotobiotiques. Les résultats préliminaires indiquent peu de différence entre le nombre moyen de séquences hypermutées et le nombre moyen de mutations par séquence obtenus avec SFB et *E. coli*. Bien qu'elles doivent être confirmées, ces données n'apportent pas d'argument en faveur ni d'une plus faible affinité des IgA induites par *E. coli*, ni de mécanismes T-indépendants. Cependant, des études comparables chez des souris axéniques seront indispensables pour déterminer le niveau de base de ces hypermutations somatiques. De plus, elles ne semblent pas pouvoir expliquer les différences de spécificité observées entre SFB et *E. coli* par ELISPOT. Des essais à des temps plus précoces de colonisation pourraient peut-être permettre d'établir un lien entre ces observations.

L'induction par SFB d'une forte réponse IgA intestinale de faible spécificité, suggère un rôle potentiel de SFB comme adjuvant des réponses immunes. Cette hypothèse a été abordée de deux façons différentes dans la littérature. D'une part, dans des expériences de « sur-colonisation », où des souris monoassociées avec SFB sont colonisées avec *M. morganii* (Talham *et al*., 1999). Cette étude ne montre pas d'impact de SFB sur le niveau des réponses IgA totales et spécifiques à *M. morganii*. D'autre part, dans un modèle d'immunisation à un antigène alimentaire, l'ovalbumine (OVA) (Snel *et al*., 1997). Dans ce cas, les réponses IgA intestinales totales et spécifiques anti-OVA chez des souris colonisées avec SFB ne sont pas différentes de celles obtenues chez des souris colonisées avec *Clostridium innocuum*. Globalement, ces résultats suggèrent l'absence de rôle adjuvant de SFB. Cependant, ces expériences sont discutables, tant par le fait que la « sur-colonisation » avec *M. morganii* a été effectuée après 4 mois de colonisation avec SFB, une durée pendant laquelle le niveau de colonisation par SFB tend à diminuer (même chez des souris monoassociées), que par l'utilisation de l'adjuvant de Freund lors des immunisations à l'OVA, ce qui pourrait masquer un effet adjuvant plus faible de la SFB. Il serait intéressant de tester à nouveau l'hypothèse du rôle adjuvant de la SFB chez des souris co-colonisées avec SFB et *E. coli*, en déterminant si cette association peut potentialiser la réponse IgA à *E. coli* mais aussi induire des réponses T spécifiques à cette bactérie. En effet, nous avons observé l'induction d'une réponse IL-17 lors de la stimulation de lymphocytes isolés du chorion de souris conventionnelles (contenant de la SFB dans leur microbiote) par du lysat d'*E. coli*, mais pas pour des lymphocytes issus de souris monocolonisées avec *E. coli*.

Spécificité de la réponse Th17

Nous avons montré que SFB est un fort inducteur des réponses T $CD4^+$ intestinales, aussi bien pro- que potentiellement anti-inflammatoires. Cependant, l'analyse de la spécificité de ces réponses à SFB (évaluée par le dosage des cytokines sécrétées par les lymphocytes isolés du chorion de souris monocolonisées par SFB et restimulés *in vitro* par du lysat de SFB ou des lysats d'autres bactéries) montre que seule une réponse IL-17 est induite spécifiquement par du lysat SFB. Aucune réactivité spécifique à du lysat d'*E. coli* n'est détectable chez des souris colonisées par *E. coli*. Ceci suggère que la forte réponse IL-17 induite dans le chorion des souris monoassociées avec SFB est une réponse spécifique. Cette donnée est quelque peu contradictoire avec celles de Lochner et al (2011) obtenues chez des souris transgéniques exprimant un récepteur T (TCR) non spécifique d'antigènes bactériens, suggérant que la

réponse Th17 intestinale serait largement indépendante d'une reconnaissance spécifique par le TCR. Cette différence pourrait cependant provenir du fait qu'un petit nombre de cellules T activées pourrait se multiplier abondamment dans ces modèles transgéniques. Néanmoins, afin de démontrer formellement la spécificité de la réponse IL-17 à SFB, nous devrons tenter de bloquer la reconnaissance du TCR par des anticorps anti-CMH II dans nos tests de stimulation *ex vivo* en présence des lysats bactériens. En effet, bien que nos données et celles d'Ivanov *et al*. (2009) suggèrent que la réponse IL-17 intestinale est dépendante des cellules T, on ne peut exclure que d'autres types cellulaires présents dans le chorion, en particulier les cellules lymphoïdes innées, puissent réagir de façon non spécifique au lysat de SFB. Par ailleurs, l'analyse du répertoire Vβ des lymphocytes isolés du chorion pourrait permettre de mieux caractériser les réponses T induites par SFB, notamment la réponse Th17, et peut-être révéler un possible effet « superantigène » de cette bactérie.

Réponse IL-17 spécifique et néogenèse de structures lymphoïdes

La réponse IL-17 spécifique est détectée dans le chorion des souris mono-associées avec la SFB. Cette réponse est également détectée chez les souris traitées *in utero* avec la protéine chimère LTβR-Ig (souris sans plaques de Peyer) et chez les souris traitées *in utero* et en période post-natale (souris sans plaques de Peyer et sans FLI). Au contraire, cette réponse est abolie chez les souris traitées à long terme avec la LTβR-Ig, suggérant ainsi que la réponse IL-17 spécifique dépend des structures lymphoïdes dont le développement a été inhibé avec le traitement à long terme, soit en l'occurrence les follicules lymphoïdes tertiaires. Afin de conforter cette hypothèse, il nous faudra vérifier l'absence de sécrétion d'IL-17 dans les surnageants de culture de cellules isolées des plaques de Peyer de souris colonisées par SFB, non traitées par la LTβR-Ig, après re-stimulation par du lysat de SFB. Une question en outre non résolue est celle de l'existence des structures lymphoïdes tertiaires chez les souris non traitées, colonisées par SFB. En effet, aucun élément pour le moment ne nous permet de dire si l'induction des structures lymphoïdes tertiaires par la SFB est « physiologique », ou bien s'il s'agit d'un phénomène compensatoire induit par la SFB en l'absence de plaques de Peyer. Par ailleurs, ces résultats soulèvent d'autres interrogations quant au rôle de cette forte réponse IL-17 spécifique associée au développement de centres germinatifs dans le compartiment intestinal des souris monocolonisées par SFB. Le modèle de souris dépourvues de plaques de Peyer pourrait-il révéler un effet potentiellement délétère de la SFB *via* la néogenèse de tissu lymphoïde tertiaire (tLT)? En effet, la néogenèse de tissu lymphoïde est observée lors

d'infection ou d'inflammation chronique dans de nombreux modèles animaux, mais également chez l'homme (Aloisi and Pujol-Borrell, 2006) (Lochner *et al*., 2011b) (Peters *et al*., 2011) (Rangel-Moreno *et al*., 2011). De plus, un travail récent dans un modèle d'auto-immunité chez des souris BXD2, montre que le développement de centres germinatifs sous l'influence d'IL-17 favorise la synthèse d'auto-anticorps et le développement de la pathologie (Hsu *et al*., 2008). Ainsi, chez un hôte génétiquement prédisposé la SFB pourrait-elle, *via* l'induction de structures lymphoïdes productrices d'IL-17, exercer un effet pathogène comme cela a été observé dans des modèles animaux d'inflammation et d'auto-immunité (Stepankova *et al*., 2007) (Lee *et al*., 2011) (Wu *et al*., 2010) ?

Contrôle des réponses pro-inflammatoires

En dépit de son fort attachement à la muqueuse intestinale, la SFB n'induit pas de lésion de l'épithélium chez des individus immunocompétents, suggérant que les réponses pro-inflammatoires induites par SFB sont contrebalancées par les réponses anti-inflammatoires. En effet, nous avons montré que la colonisation par SFB est associée à une augmentation du nombre de cellules T $CD25^{+}FoxP3^{+}$ et à l'induction de cellules T productrices d'IL-10, potentiellement régulatrices. De plus, en contrôlant la prolifération de la SFB (Suzuki *et al*., 2004), les IgA induites par SFB contribuent certainement à maintenir cet état d'homéostasie entre l'hôte et la SFB. De façon intéressante, on constate chez les souris déficientes en tissus lymphoïdes tertiaires suite au traitement au long cours avec la LTβR-Ig, dépourvues d'IgA et de réponse IL-17, une très forte augmentation de la sécrétion d'IL-10 et de cytokines Th2 (IL-4, IL-13, IL-5) par les lymphocytes isolés du chorion, dans des tests de stimulation in *vitro*. Ces souris ne présentent pas non plus d'altération de l'épithélium, suggérant que ces réponses suffisent à maintenir l'homéostasie intestinale. L'ensemble de ces résultats illustre l'extrême diversité des réponses immunes induites par SFB et souligne leur très forte flexibilité pour maintenir l'état d'équilibre, ou d'homéostasie, avec l'hôte.

Influence des signaux innés sur les propriétés immunostimulantes de la SFB

Nos données chez les souris dépourvues de plaques de Peyer suggèrent que l'adhésion de SFB aux plaques de Peyer n'est pas suffisante pour expliquer le rôle immunostimulant de cette bactérie, et pose la question d'un rôle complémentaire de signaux innés induits par SFB. En effet, nos données complétées par celles d'Ivanov *et al*. (2009a) montrent que la SFB est fort inductrice de réponses innées, comme l'atteste l'augmentation de l'expression des

messagers codant pour les peptides antimicrobiens RegIIIα/δ/γ, le marqueur de stress oxydatif iNOS et l'IL-1β, dans les biopsies iléales. Par ailleurs, les données récentes de séquençage du génome entier de la SFB indiquent que cette bactérie possède l'ensemble des gènes nécessaires à l'expression d'un flagelle, suggérant que la SFB pourrait potentiellement activer les TLRs, et notamment le TLR5 (Prakash *et al*., 2011) (Sczesnak *et al*., 2011). Cependant, les niveaux d'expression des messagers de l'IL-17 dans l'iléon de souris TLR5$^{-/-}$, NLRC4$^{-/-}$ ou double déficientes pour TLR5 et NLRC4, les deux récepteurs de la flagelline, sont comparables à ceux de souris sauvages (collaboration avec A. Gewirtz et F. Carvalho), suggérant qu'un effet de la SFB serait indépendant de ces récepteurs innés. L'implication plus globale des voies de signalisation des TLR dans les réponses immunes induites par SFB a alors été testée chez des souris double déficientes *Myd88*$^{-/-}$*Trif*$^{-/-}$. Nos données suggèrent que ces voies ne peuvent pas à elles seules expliquer le rôle immunostimulant de la SFB et qu'elles semblent variablement impliquées selon les réponses immunes étudiées. En effet, la voie MyD88/TRIF n'apparaît pas nécessaire à l'induction des réponses humorales, contrastant ainsi avec les données de Tezuka *et al*. (2007) suggérant que l'expression de MyD88 et la stimulation des cellules dendritiques productrices de iNOS sont nécessaires à l'induction des réponses IgA intestinales chez la souris. De plus, l'expression des messagers de iNOS et APRIL est fortement augmentée dans l'iléon des souris déficientes monocolonisées par SFB, suggérant plutôt que des voies redondantes pourraient être stimulées par SFB pour permettre la mise en place des réponses IgA. En raison de leur adhésion aux cellules épithéliales, on peut imaginer que les SFB pourraient induire des signaux dans ces cellules, conduisant par exemple à l'activation des enzymes ADH et RALDH impliquées dans la synthèse d'acide rétinoïque, et/ou à la sécrétion de facteurs comme APRIL et/ou iNOS, à l'origine du recrutement des lymphocytes B et, potentiellement, à la formation de centres germinatifs.

Concernant les réponses T induites par SFB, et notamment la réponse spécifique IL-17, le rôle de la voie MyD88/TRIF semble plus complexe. En effet, l'étude de l'expression des messagers de l'Il-17 dans les biopsies intestinales de souris sauvages ou *Myd88*$^{-/-}$*Trif*$^{-/-}$ montre des niveaux comparables d'expression, suggérant que la réponse IL-17 serait indépendante des voies de signalisation des TLRs. Ces résultats corroborent ceux décrits dans la littérature dans un certain nombre de modèles mutés pour les voies de signalisation des récepteurs de l'immunité innée (Ivanov *et al*., 2008) (Ivanov *et al*., 2009a) (Atarashi *et al*., 2008). Au contraire, l'étude de la sécrétion d'IL-17 dans les surnageants de culture de

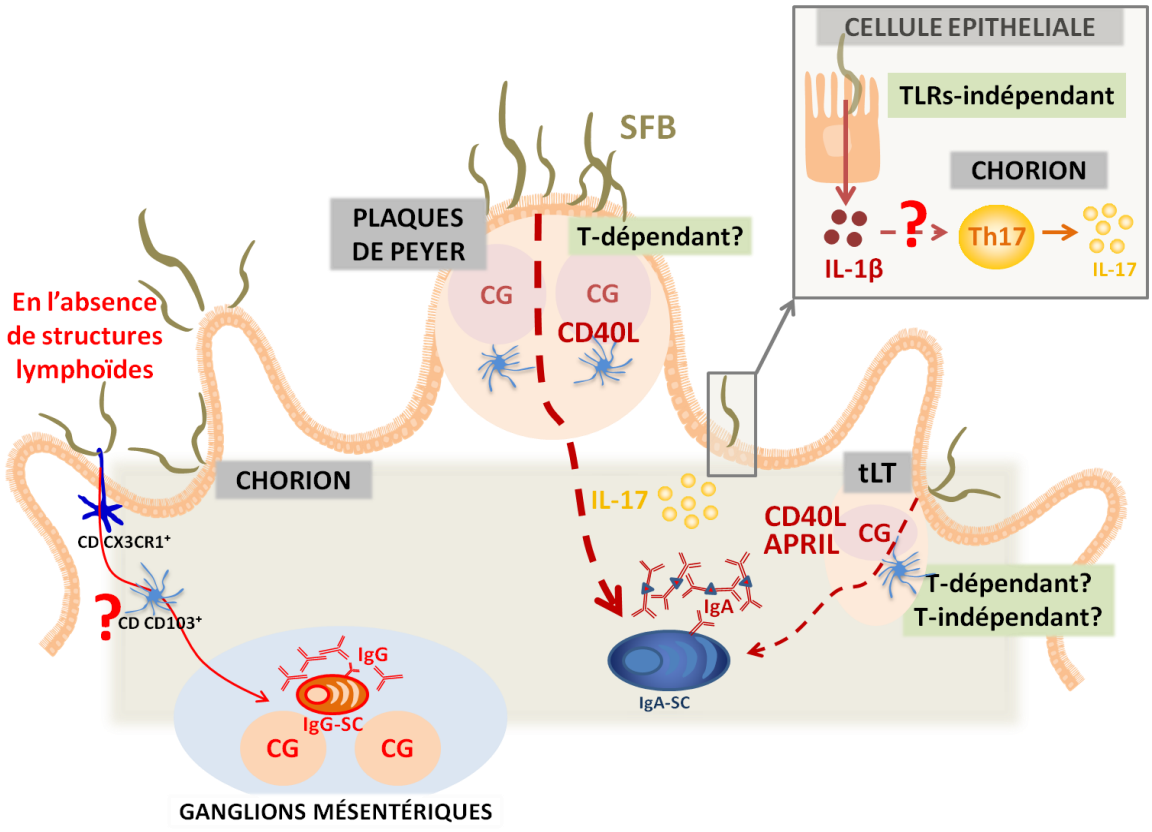
lymphocytes isolés du chorion de ces souris, stimulés *ex vivo* par des anti-CD3/CD28 ou par du lysat de SFB, suggère un rôle clé des voies TLR- et/ou IL1β-dépendantes dans la réponse IL-17. Cette hypothèse est confortée par des données récentes montrant que la production MyD88-dépendante d'IL-1β par les macrophages intestinaux est nécessaire à la réponse IL-17 (Shaw *et al*., 2012). De façon intéressante, la comparaison de l'expression des messagers de l'*Il1b* dans les biopsies intestinales entières ou dans les lymphocytes isolés du chorion de souris *Myd88*$^{-/-}$*Trif*$^{-/-}$ suggère que l'induction d'IL-1β dans les cellules épithéliales pourrait être une étape importante dans la stimulation de la réponse IL-17 par SFB. Cependant, le signal TLR-indépendant dérivé de SFB à l'origine de la réponse IL-1β dans les cellules épithéliales reste à déterminer.

Ainsi, l'ensemble de nos données suggère que les propriétés immunostimulantes de la SFB pourraient dépendre de son interaction étroite avec les cellules épithéliales, soit en délivrant des signaux indépendants des récepteurs de l'immunité innée, soit *via* un signal dépendant de l'adhésion de SFB à un récepteur spécifique sur les cellules épithéliales. Le fait que SFB soit non cultivable complique les approches utilisables pour répondre à ces questions qui sont néanmoins clé pour comprendre plus avant le fonctionnement de cette bactérie particulière. L'utilisation d'approches génomiques à partir d'ADN de SFB, notamment fondée sur l'analyse prédictive des protéines exprimées à la surface de la SFB ou sécrétées par celle-ci, et de criblage à haut débit de banques génomiques, semble prometteuse pour aborder ces questions. Elles font partie d'un projet développé en collaboration avec les équipes de H. Blottière et E. Maguin à l'INRA de Jouy-en-Josas. L'identification de clones bactériens codant pour des facteurs d'adhésions de SFB pourrait notamment permettre de tester si l'adhésion est suffisante pour stimuler les réponses immunes. Par ailleurs, l'identification de protéines de fonction immuno-stimulatrice pourrait permettre d'envisager l'utilisation de telles protéines à des fins vaccinales ou thérapeutiques.

Enfin, un autre aspect intéressant à discuter reste l'éventualité de la présence de SFB chez l'homme. En raison des fortes propriétés immunostimulantes de la SFB décrites chez la souris, mais aussi de son rôle possible comme facteur aggravant de pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes dans des modèles animaux prédisposés (Stepankova *et al*., 2007) (Lee *et al*., 2011) (Wu *et al*., 2010), il semble important de pouvoir déterminer si une « SFB humaine » serait plutôt impliquée dans la maturation du système immunitaire et dans le renforcement de la barrière intestinale ou si, au contraire, elle serait associée au

développement d'inflammation et d'auto-immunité. Décrite dans de nombreuses espèces, les preuves de l'existence de SFB chez l'homme sont pour le moment limitées (Klaasen *et al.*, 1993a). Notamment, la comparaison du génome de SFB de souris et de rat à des banques métagénomiques humaines n'a pas permis de retrouver une SFB humaine (Prakash *et al.*, 2011) (Sczesnak *et al.*, 2011). Cependant, ces banques réalisées à partir d'échantillons fécaux d'adultes ne sont peut-être pas les plus adéquates. En effet, au vu des enseignements chez la souris, des recherches dans des échantillons provenant de jeunes enfants sembleraient mieux appropriées. D'ailleurs, l'analyse préliminaire d'une banque métagénomique constituée à partir d'échantillons fécaux d'enfants (Yatsunenko *et al.*, 2012) suggère l'existence de quelques séquences (« reads ») correspondant à SFB (collaboration P. Renaud et T. de Wouters). Ces données constituent un argument prometteur en faveur de l'existence d'une « SFB humaine ».

Le schéma ci-dessous résume les voies d'induction et les mécanismes hypothétiques des réponses IgA et IL-17 dans le chorion des souris monocolonisées par la SFB.



Multiples voies et mécanismes associés aux réponses IgA et IL-17 induites par la SFB
(CG : centre germinatif, PP : plaques de Peyer)

CONCLUSION

L'utilisation de modèles de souris gnotobiotiques nous a permis de mettre en évidence l'existence de différentes voies d'induction des réponses intestinales adaptatives, notamment IgA, par les bactéries du microbiote et de suggérer que des mécanismes potentiellement différents pourraient y être associés. Au-delà du rôle clé des plaques de Peyer, nous avons pu observer que la SFB est capable d'induire la néogenèse de structures lymphoïdes tertiaires à l'origine non seulement d'une réponse IgA mais aussi d'une réponse IL-17 spécifique de la SFB. Bien que ces résultats soulèvent de nouvelles questions, en particulier sur l'origine et le rôle du dialogue entre la cellule épithéliale intestinale et la SFB dans l'initiation de la réponse immune Th17, ils suggèrent que ces différentes voies pourraient permettre de garantir la mise en place de réponses immunes adaptées et ainsi contribuer à maintenir l'homéostasie entre la SFB et son hôte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nat Rev Immunol *10*, 131-144.

Alam, M., Midtvedt, T., and Uribe, A. (1994). Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. Scandinavian journal of gastroenterology *29*, 445-451.

Aloisi, F., and Pujol-Borrell, R. (2006). Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. Nat Rev Immunol *6*, 205-217.

Angert, E.R. (2005). Alternatives to binary fission in bacteria. Nature reviews. Microbiology *3*, 214-224.

Aron-Wisnewsky, J., Dore, J., and Clement, K. (2012). The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. Nat Rev Gastroenterol Hepatol.

Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., *et al.* (2012). Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. Science.

Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. Nat Rev Immunol *8*, 411-420.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., *et al.* (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. Nature *473*, 174-180.

Asquith, M.J., Boulard, O., Powrie, F., and Maloy, K.J. (2010). Pathogenic and protective roles of MyD88 in leukocytes and epithelial cells in mouse models of inflammatory bowel disease. Gastroenterology *139*, 519-529, 529 e511-512.

Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K. (2008). ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. Nature *455*, 808-812.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., *et al.* (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. Science *331*, 337-341.

Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat Immunol *1*, 113-118.

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 15718-15723.

Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science *307*, 1915-1920.

Barone, F., Patel, P., Sanderson, J.D., and Spencer, J. (2009). Gut-associated lymphoid tissue contains the molecular machinery to support T-cell-dependent and T-cell-independent class switch recombination. Mucosal Immunol *2*, 495-503.

Bassler, B.L., and Losick, R. (2006). Bacterially speaking. Cell *125*, 237-246.

Benckert, J., Schmolka, N., Kreschel, C., Zoller, M.J., Sturm, A., Wiedenmann, B., and Wardemann, H. (2011). The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. The Journal of clinical investigation *121*, 1946-1955.

Bennet, J.D., and Brinkman, M. (1989). Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. Lancet *1*, 164.

Bergqvist, P., Gardby, E., Stensson, A., Bemark, M., and Lycke, N.Y. (2006). Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. J Immunol *177*, 7772-7783.

Bergqvist, P., Stensson, A., Lycke, N.Y., and Bemark, M. (2010). T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. J Immunol *184*, 3545-3553.

Bernalier-Donadille, A. (2010). [Fermentative metabolism by the human gut microbiota]. Gastroenterologie clinique et biologique *34 Suppl 1*, S16-22.

Bezirtzoglou, E., and Stavropoulou, E. (2011). Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. Anaerobe *17*, 369-374.

Blaser, M.J., and Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? Nature reviews. Microbiology *7*, 887-894.

Bos, N.A., Jiang, H.Q., and Cebra, J.J. (2001). T cell control of the gut IgA response against commensal bacteria. Gut *48*, 762-764.

Bouskra, D., Brezillon, C., Berard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., and Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. Nature *456*, 507-510.

Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R.P., and Pamer, E.G. (2007). MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal Listeria monocytogenes infection. J Exp Med *204*, 1891-1900.

Brandtzaeg, P. (2003). Role of secretory antibodies in the defence against infections. International journal of medical microbiology : IJMM *293*, 3-15.

Brandtzaeg, P. (2010). Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. Immunol Invest *39*, 303-355.

Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., and Russell, M.W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. Mucosal Immunol *1*, 31-37.

Britton, R.A., and Young, V.B. (2012). Interaction between the intestinal microbiota and host in Clostridium difficile colonization resistance. Trends Microbiol *20*, 313-319.

Brugere, J.F., Mihajlovski, A., Missaoui, M., and Peyret, P. (2009). Tools for stools: the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics. Expert review of molecular diagnostics *9*, 353-365.

Bry, L., Falk, P.G., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. (1996). A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. Science *273*, 1380-1383.

Cebra, J.J., Periwal, S.B., Lee, G., Lee, F., and Shroff, K.E. (1998). Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. Developmental immunology *6*, 13-18.

Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? Nat Rev Immunol *10*, 735-744.

Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. Nat Rev Immunol *8*, 421-434.

Chase, D.G., and Erlandsen, S.L. (1976). Evidence for a complex life cycle and endospore formation in the attached, filamentous, segmented bacterium from murine ileum. Journal of bacteriology *127*, 572-583.

Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. Nat Rev Immunol *11*, 445-456.

Cherrier, M., Ohnmacht, C., Cording, S., and Eberl, G. (2012). Development and function of intestinal innate lymphoid cells. Current opinion in immunology *24*, 277-283.

Chervonsky, A.V. (2010). Influence of microbial environment on autoimmunity. Nat Immunol *11*, 28-35.

Chiba, K., Matsuyuki, H., Maeda, Y., and Sugahara, K. (2006). Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. Cell Mol Immunol *3*, 11-19.

Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. J Exp Med *203*, 2841-2852.

Chin, S.F., Storkson, J.M., Liu, W., Albright, K.J., and Pariza, M.W. (1994). Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. The Journal of nutrition *124*, 694-701.

Chow, J., and Mazmanian, S.K. (2010). A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. Cell host & microbe *7*, 265-276.

Chung, H., Pamp, S.J., Hill, J.A., Surana, N.K., Edelman, S.M., Troy, E.B., Reading, N.C., Villablanca, E.J., Wang, S., Mora, J.R., *et al.* (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. Cell *149*, 1578-1593.

Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y., and Weiser, J.N. (2010). Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. Nat Med *16*, 228-231.

Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., and Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell *148*, 1258-1270.

Coats, S.R., Do, C.T., Karimi-Naser, L.M., Braham, P.H., and Darveau, R.P. (2007). Antagonistic lipopolysaccharides block E. coli lipopolysaccharide function at human TLR4 via interaction with the human MD-2 lipopolysaccharide binding site. Cellular microbiology *9*, 1191-1202.

Coles, L.T., Moughan, P.J., Awati, A., Darragh, A.J., and Zou, M.L. (2010). Predicted apparent digestion of energy-yielding nutrients differs between the upper and lower digestive tracts in rats and humans. The Journal of nutrition *140*, 469-476.

Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T.R., and Elson, C.O. (2009). A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 19256-19261.

Corpet, D.E. (1989). Etude de l'écologie microbienne de l'intestin: modèles in vitro, in vivo et mathématiques. Rev. sci; tech. Off. int. Epiz. *8*, 375-389.

Crabbe, P.A., Nash, D.R., Bazin, H., Eyssen, H., and Heremans, J.F. (1970). Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology *22*, 448-457.

Craig, S.W., and Cebra, J.J. (1971). Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. J Exp Med *134*, 188-200.

Davis, C.P., and Savage, D.C. (1974). Habitat, succession, attachment, and morphology of segmented, filamentous microbes indigenous to the murine gastrointestinal tract. Infection and immunity *10*, 948-956.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 14691-14696.

de Sablet, T., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., Vareille, M., Gobert, A.P., and Martin, C. (2009). Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Infection and immunity *77*, 783-790.

De Trez, C. (2012). Lymphotoxin-beta receptor expression and its related signaling pathways govern dendritic cell homeostasis and function. Immunobiology *217*, 1250-1258.

Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. Nat Immunol *8*, 1086-1094.

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., and Relman, D.A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. PLoS biology *6*, e280.

Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? Applied and environmental microbiology *78*, 1-6.

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., and Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 11971-11975.

Eberl, G., and Littman, D.R. (2004). Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells. Science *305*, 248-251.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. Science *308*, 1635-1638.

Eyssen, H., and Parmentier, G. (1974). Biohydrogenation of sterols and fatty acids by the intestinal microflora. Am J Clin Nutr *27*, 1329-1340.

Eyssen, H., Swaelen, E., Kowszyk-Gindifer, Z., and Parmentier, G. (1965). Nucleotide requirements of Lactobacillus acidophilus variants isolated from the crops of chicks. Antonie van Leeuwenhoek *31*, 241-248.

Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O., and Suzuki, K. (2010). Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. Annu Rev Immunol *28*, 243-273.

Fagarasan, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Ikuta, K., and Honjo, T. (2001). In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. Nature *413*, 639-643.

Fagarasan, S., Muramatsu, M., Suzuki, K., Nagaoka, H., Hiai, H., and Honjo, T. (2002). Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. Science *298*, 1424-1427.

Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR *62*, 1157-1170.

Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., Aguilera, M., Khanna, S., Gil, A., Edwards, C.A., and Dore, J. (2010). Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. J Pediatr Gastroenterol Nutr *51*, 77-84.

Foliaki, S., Pearce, N., Bjorksten, B., Mallol, J., Montefort, S., and von Mutius, E. (2009). Antibiotic use in infancy and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children 6 and 7 years old: International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase III. J Allergy Clin Immunol *124*, 982-989.

Fraher, M.H., O'Toole, P.W., and Quigley, E.M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. Nat Rev Gastroenterol Hepatol *9*, 312-322.

Frantz, A.L., Rogier, E.W., Weber, C.R., Shen, L., Cohen, D.A., Fenton, L.A., Bruno, M.E., and Kaetzel, C.S. (2012). Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. Mucosal Immunol *5*, 501-512.

Freter, R. (1955). The fatal enteric cholera infection in the guinea pig, achieved by inhibition of normal enteric flora. J Infect Dis *97*, 57-65.

Fujiya, M., Musch, M.W., Nakagawa, Y., Hu, S., Alverdy, J., Kohgo, Y., Schneewind, O., Jabri, B., and Chang, E.B. (2007). The Bacillus subtilis quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. Cell host & microbe *1*, 299-308.

Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. Journal of bacteriology *176*, 269-275.

Gaboriau-Routhiau, V., Lécuyer, E., and Cerf-Bensussan, N. (2011). Role of microbiota in postnatal maturation of intestinal T-cell responses. Current opinion in gastroenterology *27*, 502-508.

Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., *et al.* (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. Immunity *31*, 677-689.

Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. Nat Rev Immunol *12*, 503-516.

Garland, C.D., Lee, A., and Dickson, M.R. (1982). Segmented filamentous bacteria in the rodent small intestine: their colonization of growing animals and possible role in host resistance to Salmonella. Microb Ecol *8*, 181-190.

Gatto, D., and Brink, R. (2010). The germinal center reaction. J Allergy Clin Immunol *126*, 898-907; quiz 908-899.

Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A., Ng, D.C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2011). Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. Immunity *34*, 794-806.

Ghoshal, U.C., Shukla, R., Ghoshal, U., Gwee, K.A., Ng, S.C., and Quigley, E.M. (2012). The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend or foe? Int J Inflam *2012*, 151085.

Gowans, J.L., and Knight, E.J. (1964). The Route of Re-Circulation of Lymphocytes in the Rat. Proc R Soc Lond B Biol Sci *159*, 257-282.

Grehan, M.J., Borody, T.J., Leis, S.M., Campbell, J., Mitchell, H., and Wettstein, A. (2010). Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora. Journal of clinical gastroenterology *44*, 551-561.

Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. Frontiers in physiology *2*, 94.

Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Malassis-Seris, M., Briottet, C., and Vassalli, P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. J Exp Med *173*, 471-481.

Guy-Grand, D., Griscelli, C., and Vassalli, P. (1974). The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. Eur J Immunol *4*, 435-443.

Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., *et al.* (2002). Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. J Immunol *168*, 57-64.

Hampton, J.C., and Rosario, B. (1966). The attachment of protozoan parasites to intestinal epithelial cells of the mouse. The Journal of parasitology *52*, 939-949.

Hapfelmeier, S., Lawson, M.A., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M.L., Endt, K., *et al.* (2010). Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. Science *328*, 1705-1709.

Harriman, G.R., Bogue, M., Rogers, P., Finegold, M., Pacheco, S., Bradley, A., Zhang, Y., and Mbawuike, I.N. (1999). Targeted deletion of the IgA constant region in mice leads to IgA deficiency with alterations in expression of other Ig isotypes. J Immunol *162*, 2521-2529.

Harris, N.L., Spoerri, I., Schopfer, J.F., Nembrini, C., Merky, P., Massacand, J., Urban, J.F., Jr., Lamarre, A., Burki, K., Odermatt, B., *et al.* (2006). Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. J Immunol *177*, 6256-6262.

Hart, A.L., Ng, S.C., Mann, E., Al-Hassi, H.O., Bernardo, D., and Knight, S.C. (2010). Homing of immune cells: role in homeostasis and intestinal inflammation. Inflammatory bowel diseases *16*, 1969-1977.

He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., *et al.* (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. Immunity *26*, 812-826.

Heczko, U., Abe, A., and Finlay, B.B. (2000). Segmented filamentous bacteria prevent colonization of enteropathogenic Escherichia coli O103 in rabbits. J Infect Dis *181*, 1027-1033.

Hehemann, J.H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek, M., and Michel, G. (2010). Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. Nature *464*, 908-912.

Heijtz, R.D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., and Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 3047-3052.

Hill, D.A., and Artis, D. (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. Annu Rev Immunol *28*, 623-667.

Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol *10*, 159-169.

Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., and Gordon, J.I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science *291*, 881-884.

Hoskins, J.D., Henk, W.G., and Abdelbaki, Y.Z. (1982). Scanning electron microscopic study of the small intestine of dogs from birth to 337 days of age. American journal of veterinary research *43*, 1715-1720.

Hsu, H.C., Yang, P., Wang, J., Wu, Q., Myers, R., Chen, J., Yi, J., Guentert, T., Tousson, A., Stanus, A.L., *et al.* (2008). Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. Nat Immunol *9*, 166-175.

Huff, K.R., Akhtar, L.N., Fox, A.L., Cannon, J.A., Smith, P.D., and Smythies, L.E. (2011). Extracellular matrix-associated cytokines regulate CD4+ effector T-cell responses in the human intestinal mucosa. Mucosal Immunol *4*, 420-427.

Hughes, D.T., and Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nature reviews. Microbiology *6*, 111-120.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., *et al.* (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature *411*, 599-603.

Hunter, P. (2012). The changing hypothesis of the gut. The intestinal microbiome is increasingly seen as vital to human health. EMBO Rep *13*, 498-500.

Husebye, E., Hellstrom, P.M., Sundler, F., Chen, J., and Midtvedt, T. (2001). Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology *280*, G368-380.

Huurre, A., Kalliomaki, M., Rautava, S., Rinne, M., Salminen, S., and Isolauri, E. (2008). Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. Neonatology *93*, 236-240.

Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009a). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell *139*, 485-498.

Ivanov, II, Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. Cell host & microbe *4*, 337-349.

Ivanov, I., Littman, D.R., Roth, E., and Liang, A. (2009b). The Good Guys. (CELL PICTURE SHOW).

Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. Immunity *21*, 527-538.

Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol *54 Pt 1*, 1-13.

Jang, M.H., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Yang, B.G., *et al.* (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. J Immunol *176*, 803-810.

Jeffery, I.B., Claesson, M.J., O'Toole, P.W., and Shanahan, F. (2012). Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? Nature reviews. Microbiology *10*, 591-592.

Jepson, M.A., Clark, M.A., Simmons, N.L., and Hirst, B.H. (1993). Actin accumulation at sites of attachment of indigenous apathogenic segmented filamentous bacteria to mouse ileal epithelial cells. Infection and immunity *61*, 4001-4004.

Jiang, H.Q., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (2001). Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups. Infection and immunity *69*, 3611-3617.

Jimenez, E., Fernandez, L., Marin, M.L., Martin, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., and Rodriguez, J.M. (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. Curr Microbiol *51*, 270-274.

Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 15064-15069.

Kanamori, Y., Ishimaru, K., Nanno, M., Maki, K., Ikuta, K., Nariuchi, H., and Ishikawa, H. (1996). Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. J Exp Med *184*, 1449-1459.

Kang, H.S., Chin, R.K., Wang, Y., Yu, P., Wang, J., Newell, K.A., and Fu, Y.X. (2002). Signaling via LTbetaR on the lamina propria stromal cells of the gut is required for IgA production. Nat Immunol *3*, 576-582.

Keller, L., and Surette, M.G. (2006). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nature reviews. Microbiology *4*, 249-258.

Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., Pettersson, S., and Conway, S. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. Nat Immunol *5*, 104-112.

Kim, M.Y., Kim, K.S., McConnell, F., and Lane, P. (2009). Lymphoid tissue inducer cells: architects of CD4 immune responses in mice and men. Clinical and experimental immunology *157*, 20-26.

King, C., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. Annu Rev Immunol *26*, 741-766.

Klaasen, H.L. (1990). Effect of preventing coprophagy on colonization by segmented filamentous bacteria in the small bowel of mice. Microb.Ecol., Health Dis *3*, 99-103.

Klaasen, H.L., Koopman, J.P., Van den Brink, M.E., Bakker, M.H., Poelma, F.G., and Beynen, A.C. (1993a). Intestinal, segmented, filamentous bacteria in a wide range of vertebrate species. Lab Anim *27*, 141-150.

Klaasen, H.L., Koopman, J.P., Van den Brink, M.E., Scholten, P.M., and Beynen, A.C. (1991a). Influence of Macronutrients on Segmented Filamentous Bacteria in the Small Intestina of Mice. Microb Ecol in Health and Disease *4*, 47-51.

Klaasen, H.L., Koopman, J.P., Van den Brink, M.E., Van Wezel, H.P., and Beynen, A.C. (1991b). Mono-association of mice with non-cultivable, intestinal, segmented, filamentous bacteria. Archives of microbiology *156*, 148-151.

Klaasen, H.L., Van der Heijden, P.J., Stok, W., Poelma, F.G., Koopman, J.P., Van den Brink, M.E., Bakker, M.H., Eling, W.M., and Beynen, A.C. (1993b). Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. Infection and immunity *61*, 303-306.

Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol *8*, 22-33.

Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., and Ley, R.E. (2012). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108 Suppl 1*, 4578-4585.

Koopman, J.P., Kennis, H.M., Mullink, J.W., Prins, R.A., Stadhouders, A.M., De Boer, H., and Hectors, M.P. (1984). 'Normalization' of germfree mice with anaerobically cultured caecal flora of 'normal' mice. Lab Anim *18*, 188-194.

Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L.S., Hansen, J.M., Li, T., Yamoah, K., Pan, Z.Q., Jones, D.P., and Neish, A.S. (2007). Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. EMBO J *26*, 4457-4466.

Kuwahara, T., Ogura, Y., Oshima, K., Kurokawa, K., Ooka, T., Hirakawa, H., Itoh, T., Nakayama-Imaohji, H., Ichimura, M., Itoh, K., *et al.* (2011). The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a non-culturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing. DNA Res *18*, 291-303.

Lambolez, F., Arcangeli, M.L., Joret, A.M., Pasqualetto, V., Cordier, C., Di Santo, J.P., Rocha, B., and Ezine, S. (2006). The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs. Nat Immunol *7*, 76-82.

Langhendries, J.P. (2006). [Early bacterial colonisation of the intestine: why it matters?]. Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie *13*, 1526-1534.

Lee, J.J., Ozcan, E., Rauter, I., and Geha, R.S. (2008). Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency. Current opinion in allergy and clinical immunology *8*, 520-526.

Lee, Y.K., Menezes, J.S., Umesaki, Y., and Mazmanian, S.K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108 Suppl 1*, 4615-4622.

Leidy, J. (1881). Parasites of the Termites (Philadelphia: Collins).

Lelouard, H., Fallet, M., de Bovis, B., Meresse, S., and Gorvel, J.P. (2012). Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. Gastroenterology *142*, 592-601 e593.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell *86*, 973-983.

Lepage, P., Hasler, R., Spehlmann, M.E., Rehman, A., Zvirbliene, A., Begun, A., Ott, S., Kupcinskas, L., Dore, J., Raedler, A., and Schreiber, S. (2011). Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. Gastroenterology *141*, 227-236.

Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., and Gordon, J.I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. Science *320*, 1647-1651.

Lindner, C., Wahl, B., Fohse, L., Suerbaum, S., Macpherson, A.J., Prinz, I., and Pabst, O. (2012). Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine. J Exp Med *209*, 365-377.

Lochner, M., Berard, M., Sawa, S., Hauer, S., Gaboriau-Routhiau, V., Fernandez, T.D., Snel, J., Bousso, P., Cerf-Bensussan, N., and Eberl, G. (2011a). Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells. J Immunol *186*, 1531-1537.

Lochner, M., Ohnmacht, C., Presley, L., Bruhns, P., Si-Tahar, M., Sawa, S., and Eberl, G. (2011b). Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORgamma t and LTi cells. J Exp Med *208*, 125-134.

Lorenz, R.G., Chaplin, D.D., McDonald, K.G., McDonough, J.S., and Newberry, R.D. (2003). Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. J Immunol *170*, 5475-5482.

Lotz, M., Gutle, D., Walther, S., Menard, S., Bogdan, C., and Hornef, M.W. (2006). Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. J Exp Med *203*, 973-984.

Lotz, M., Menard, S., and Hornef, M. (2007). Innate immune recognition on the intestinal mucosa. International journal of medical microbiology : IJMM *297*, 379-392.

Lugering, A., Ross, M., Sieker, M., Heidemann, J., Williams, I.R., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2010). CCR6 identifies lymphoid tissue inducer cells within cryptopatches. Clinical and experimental immunology *160*, 440-449.

MacDonald, T.T. (1999). Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites. Curr Top Microbiol Immunol *236*, 113-135.

Macpherson, A.J. (2006). IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. Curr Top Microbiol Immunol *308*, 117-136.

Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. Science *288*, 2222-2226.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat Rev Immunol *4*, 478-485.

Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. Microbes Infect *3*, 1021-1035.

Macpherson, A.J., Martinic, M.M., and Harris, N. (2002). The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine. Cellular and molecular life sciences : CMLS *59*, 2088-2096.

Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004a). Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. Ann N Y Acad Sci *1029*, 36-43.

Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004b). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. Science *303*, 1662-1665.

Mantis, N.J., Cheung, M.C., Chintalacharuvu, K.R., Rey, J., Corthesy, B., and Neutra, M.R. (2002). Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. J Immunol *169*, 1844-1851.

Mantis, N.J., Rol, N., and Corthesy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal Immunol *4*, 603-611.

Martinoli, C., Chiavelli, A., and Rescigno, M. (2007). Entry route of Salmonella typhimurium directs the type of induced immune response. Immunity *27*, 975-984.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. Science *296*, 301-305.

Maynard, C.L., and Weaver, C.T. (2009). Intestinal effector T cells in health and disease. Immunity *31*, 389-400.

McCann, K.S. (2000). The diversity-stability debate. Nature *405*, 228-233.

McDonald, K.G., McDonough, J.S., Dieckgraefe, B.K., and Newberry, R.D. (2010). Dendritic cells produce CXCL13 and participate in the development of murine small intestine lymphoid tissues. Am J Pathol *176*, 2367-2377.

McDonald, K.G., McDonough, J.S., and Newberry, R.D. (2005). Adaptive immune responses are dispensable for isolated lymphoid follicle formation: antigen-naive, lymphotoxin-sufficient B lymphocytes drive the formation of mature isolated lymphoid follicles. J Immunol *174*, 5720-5728.

Mebius, R.E. (2003). Organogenesis of lymphoid tissues. Nat Rev Immunol *3*, 292-303.

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

Meng, D., Newburg, D.S., Young, C., Baker, A., Tonkonogy, S.L., Sartor, R.B., Walker, W.A., and Nanthakumar, N.N. (2007). Bacterial symbionts induce a FUT2-dependent fucosylated niche on colonic epithelium via ERK and JNK signaling. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology *293*, G780-787.

Meresse, B., Malamut, G., and Cerf-Bensussan, N. (2012). Celiac disease: an immunological jigsaw. Immunity *36*, 907-919.

Meyerholz, D.K., Stabel, T.J., and Cheville, N.F. (2002). Segmented filamentous bacteria interact with intraepithelial mononuclear cells. Infection and immunity *70*, 3277-3280.

Michelsen, K.S., and Arditi, M. (2007). Toll-like receptors and innate immunity in gut homeostasis and pathology. Curr Opin Hematol *14*, 48-54.

Momozawa, Y., Deffontaine, V., Louis, E., and Medrano, J.F. (2011). Characterization of bacteria in biopsies of colon and stools by high throughput sequencing of the V2 region of bacterial 16S rRNA gene in human. PLoS One *6*, e16952.

Mora, J.R. (2008). Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. Inflammatory bowel diseases *14*, 275-289.

Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., *et al.* (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. Science *314*, 1157-1160.

Moran, A.P., Gupta, A., and Joshi, L. (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. Gut *60*, 1412-1425.

Moreau, M.C., Ducluzeau, R., Guy-Grand, D., and Muller, M.C. (1978). Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. Infection and immunity *21*, 532-539.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell *102*, 553-563.

Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. Journal of bacteriology *104*, 313-322.

Neish, A.S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. Gastroenterology *136*, 65-80.

Neyt, K., Perros, F., Geurtsvankessel, C.H., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2012). Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. Trends in immunology *33*, 297-305.

Niess, J.H., and Adler, G. (2010). Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. J Immunol *184*, 2026-2037.

Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., *et al.* (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. Science *307*, 254-258.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., and Dong, C. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. Immunity *29*, 138-149.

O'Connor, J.C., Lawson, M.A., Andre, C., Briley, E.M., Szegedi, S.S., Lestage, J., Castanon, N., Herkenham, M., Dantzer, R., and Kelley, K.W. (2009a). Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior. J Immunol *182*, 3202-3212.

O'Connor, J.C., Lawson, M.A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (2009b). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. Molecular psychiatry *14*, 511-522.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., *et al.* (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature *411*, 603-606.

Pabst, O., Herbrand, H., Friedrichsen, M., Velaga, S., Dorsch, M., Berhardt, G., Worbs, T., Macpherson, A.J., and Forster, R. (2006). Adaptation of solitary intestinal lymphoid tissue in response to microbiota and chemokine receptor CCR7 signaling. J Immunol *177*, 6824-6832.

Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., and Brown, P.O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS biology *5*, e177.

Pamp, S.J., Harrington, E.D., Quake, S.R., Relman, D.A., and Blainey, P.C. (2012). Single-cell sequencing provides clues about the host interactions of segmented filamentous bacteria (SFB). Genome research *22*, 1107-1119.

Patrick, S., Jobling, K.L., O'Connor, D., Thacker, Z., Dryden, D.T., and Blakely, G.W. (2011). A unique homologue of the eukaryotic protein-modifier ubiquitin present in the bacterium Bacteroides fragilis, a predominant resident of the human gastrointestinal tract. Microbiology *157*, 3071-3078.

Pearson, C., Uhlig, H.H., and Powrie, F. (2012). Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. Trends in immunology *33*, 289-296.

Peters, A., Pitcher, L.A., Sullivan, J.M., Mitsdoerffer, M., Acton, S.E., Franz, B., Wucherpfennig, K., Turley, S., Carroll, M.C., Sobel, R.A., *et al.* (2011). Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. Immunity *35*, 986-996.

Peterson, D.A., and Cardona, R.A. (2010). Specificity of the adaptive immune response to the gut microbiota. Adv Immunol *107*, 71-107.

Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L., and Gordon, J.I. (2007). IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. Cell host & microbe *2*, 328-339.

Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J.P., Edelman, L., Sansonetti, P.J., and Corthesy, B. (2002). Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. Immunity *17*, 107-115.

Pistiner, M., Gold, D.R., Abdulkerim, H., Hoffman, E., and Celedon, J.C. (2008). Birth by cesarean section, allergic rhinitis, and allergic sensitization among children with a parental history of atopy. J Allergy Clin Immunol *122*, 274-279.

Polk, D.B., and Peek, R.M., Jr. (2010). Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. Nature reviews. Cancer *10*, 403-414.

Pollard, M. (1964). Germfree Animals and Biological Research. Science *145*, 247-251.

Prakash, T., Oshima, K., Morita, H., Fukuda, S., Imaoka, A., Kumar, N., Sharma, V.K., Kim, S.W., Takahashi, M., Saitou, N., *et al.* (2011). Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of th17 cell differentiation. Cell host & microbe *10*, 273-284.

Ptacnik, R., Solimini, A.G., Andersen, T., Tamminen, T., Brettum, P., Lepisto, L., Willen, E., and Rekolainen, S. (2008). Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 5134-5138.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., *et al.* (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature *464*, 59-65.

Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. Science *307*, 1904-1909.

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell *118*, 229-241.

Rangel-Moreno, J., Carragher, D.M., de la Luz Garcia-Hernandez, M., Hwang, J.Y., Kusser, K., Hartson, L., Kolls, J.K., Khader, S.A., and Randall, T.D. (2011). The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. Nat Immunol *12*, 639-646.

Rawls, J.F., Samuel, B.S., and Gordon, J.I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 4596-4601.

Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C., Gloor, G.B., Knight, R., and Busscher, H.J. (2011). Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. Nature reviews. Microbiology *9*, 27-38.

Reimann, H.A. (1965). Microbic Phagocytosis by Enteric Epithelial Cells. JAMA : the journal of the American Medical Association *192*, 1130-1132.

Reinhardt, C., Bergentall, M., Greiner, T.U., Schaffner, F., Ostergren-Lunden, G., Petersen, L.C., Ruf, W., and Backhed, F. (2012). Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. Nature *483*, 627-631.

Renz-Polster, H., David, M.R., Buist, A.S., Vollmer, W.M., O'Connor, E.A., Frazier, E.A., and Wall, M.A. (2005). Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. Clin Exp Allergy *35*, 1466-1472.

Rescigno, M. (2011). Dendritic cells in bacteria handling in the gut. J Leukoc Biol *90*, 669-672.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol *2*, 361-367.

Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F.E., Heath, A.C., Rohwer, F., and Gordon, J.I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. Nature *466*, 334-338.

Rocha, B., Vassalli, P., and Guy-Grand, D. (1991). The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. J Exp Med *173*, 483-486.

Sait, L.C., Galic, M., Price, J.D., Simpfendorfer, K.R., Diavatopoulos, D.A., Uren, T.K., Janssen, P.H., Wijburg, O.L., and Strugnell, R.A. (2007). Secretory antibodies reduce systemic antibody responses against the gastrointestinal commensal flora. International immunology *19*, 257-265.

Saito, H., Kanamori, Y., Takemori, T., Nariuchi, H., Kubota, E., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., and Ishikawa, H. (1998). Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. Science *280*, 275-278.

Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjoberg, J., Amir, E., Teggatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., *et al.* (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. Nat Immunol *11*, 76-83.

Sanford, S.E. (1991). Light and electron microscopic observations of a segmented filamentous bacterium attached to the mucosa of the terminal ileum of pigs. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc *3*, 328-333.

Sansonetti, P.J. (2009). Comment l'hôte discrimine-t-il entre microorganismes commensaux et pathogènes ?

Sansonetti, P.J., and Medzhitov, R. (2009). Learning tolerance while fighting ignorance. Cell *138*, 416-420.

Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology *134*, 577-594.

Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. J Exp Med *206*, 3101-3114.

Sczesnak, A., Segata, N., Qin, X., Gevers, D., Petrosino, J.F., Huttenhower, C., Littman, D.R., and Ivanov, II (2011). The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment. Cell host & microbe *10*, 260-272.

Shaw, M.H., Kamada, N., Kim, Y.G., and Nunez, G. (2012). Microbiota-induced IL-1beta, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. J Exp Med *209*, 251-258.

Shroff, K.E., Meslin, K., and Cebra, J.J. (1995). Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. Infection and immunity *63*, 3904-3913.

Shulzhenko, N., Morgun, A., Hsiao, W., Battle, M., Yao, M., Gavrilova, O., Orandle, M., Mayer, L., Macpherson, A.J., McCoy, K.D., *et al.* (2011). Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. Nat Med *17*, 1585-1593.

Sit, C.S., and Vederas, J.C. (2008). Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire *86*, 116-123.

Slack, E., Balmer, M.L., Fritz, J.H., and Hapfelmeier, S. (2012). Functional flexibility of intestinal IgA - broadening the fine line. Front Immunol *3*, 100.

Slack, E., Hapfelmeier, S., Stecher, B., Velykoredko, Y., Stoel, M., Lawson, M.A., Geuking, M.B., Beutler, B., Tedder, T.F., Hardt, W.D., *et al.* (2009). Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. Science *325*, 617-620.

Snel, J., Bakker, M.H., and Heidt, P.J. (1997). Quantification of antigen-specific immunoglobulin A after oral booster immunization with ovalbumin in mice mono-associated with segmented filamentous bacteria or Clostridium innocuum. Immunology letters *58*, 25-28.

Snel, J., Heinen, P.P., Blok, H.J., Carman, R.J., Duncan, A.J., Allen, P.C., and Collins, M.D. (1995). Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "Candidatus Arthromitus". International journal of systematic bacteriology *45*, 780-782.

Snellen, J.E., and Savage, D.C. (1978). Freeze-fracture study of the filamentous, segmented microorganism attached to the murine small bowel. Journal of bacteriology *134*, 1099-1107.

Snoeck, V., Goddeeris, B., and Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. Microbes Infect *7*, 997-1004.

Sonnenberg, G.F., and Artis, D. (2012). Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. Immunity *37*, 601-610.

Spor, A., Koren, O., and Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. Nature reviews. Microbiology *9*, 279-290.

Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 15451-15455.

Stecher, B., Denzler, R., Maier, L., Bernet, F., Sanders, M.J., Pickard, D.J., Barthel, M., Westendorf, A.M., Krogfelt, K.A., Walker, A.W., *et al.* (2011). Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 1269-1274.

Stecher, B., and Hardt, W.D. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. Curr Opin Microbiol *14*, 82-91.

Stepankova, R., Powrie, F., Kofronova, O., Kozakova, H., Hudcovic, T., Hrncir, T., Uhlig, H., Read, S., Rehakova, Z., Benada, O., *et al.* (2007). Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. Inflammatory bowel diseases *13*, 1202-1211.

Stoel, M., Jiang, H.Q., van Diemen, C.C., Bun, J.C., Dammers, P.M., Thurnheer, M.C., Kroese, F.G., Cebra, J.J., and Bos, N.A. (2005). Restricted IgA repertoire in both B-1 and B-2 cell-derived gut plasmablasts. J Immunol *174*, 1046-1054.

Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. BMJ *299*, 1259-1260.

Strugnell, R.A., and Wijburg, O.L. (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. Nature reviews. Microbiology *8*, 656-667.

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., and Dore, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Applied and environmental microbiology *65*, 4799-4807.

Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., and Fagarasan, S. (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 1981-1986.

Suzuki, K., Oida, T., Hamada, H., Hitotsumatsu, O., Watanabe, M., Hibi, T., Yamamoto, H., Kubota, E., Kaminogawa, S., and Ishikawa, H. (2000). Gut cryptopatches: direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis. Immunity *13*, 691-702.

Talham, G.L., Jiang, H.Q., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (1999). Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. Infection and immunity *67*, 1992-2000.

Tannock, G.W., Miller, J.R., and Savage, D.C. (1984). Host specificity of filamentous, segmented microorganisms adherent to the small bowel epithelium in mice and rats. Applied and environmental microbiology *47*, 441-442.

Taylor, R.T., Lugering, A., Newell, K.A., and Williams, I.R. (2004). Intestinal cryptopatch formation in mice requires lymphotoxin alpha and the lymphotoxin beta receptor. J Immunol *173*, 7183-7189.

Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. Nature *448*, 929-933.

Thomas, C.M., and Nielsen, K.M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nature reviews. Microbiology *3*, 711-721.

Thompson, C.L., Vier, R., Mikaelyan, A., Wienemann, T., and Brune, A. (2012). 'Candidatus Arthromitus' revised: segmented filamentous bacteria in arthropod guts are members of Lachnospiraceae. Environmental microbiology *14*, 1454-1465.

Thurnheer, M.C., Zuercher, A.W., Cebra, J.J., and Bos, N.A. (2003). B1 cells contribute to serum IgM, but not to intestinal IgA, production in gnotobiotic Ig allotype chimeric mice. J Immunol *170*, 4564-4571.

Tomasz, A. (1965). Control of the competent state in Pneumococcus by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. Nature *208*, 155-159.

Treangen, T.J., and Rocha, E.P. (2011). Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes. PLoS Genet *7*, e1001284.

Tremaroli, V., and Backhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature *489*, 242-249.

Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. Science *323*, 1488-1492.

Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, II, Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. Immunity *29*, 261-271.

Turnbaugh, P.J., and Gordon, J.I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. J Physiol *587*, 4153-4158.

Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., *et al.* (2008). A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature *457*, 480-484.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature *444*, 1027-1031.

Turroni, F., Peano, C., Pass, D.A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M.J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., *et al.* (2012). Diversity of Bifidobacteria within the Infant Gut Microbiota. PLoS One *7*, e36957.

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.G., Jung, Y.J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., *et al.* (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. Nat Immunol *9*, 769-776.

Umesaki, Y., Okada, Y., Matsumoto, S., Imaoka, A., and Setoyama, H. (1995). Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. Microbiol Immunol *39*, 555-562.

Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., and Okada, Y. (1993). Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. Immunology *79*, 32-37.

Upadhyay, V., Poroyko, V., Kim, T.J., Devkota, S., Fu, S., Liu, D., Tumanov, A.V., Koroleva, E.P., Deng, L., Nagler, C., *et al.* (2012). Lymphotoxin regulates commensal responses to enable diet-induced obesity. Nat Immunol.

Uribe, A., Alam, M., Johansson, O., Midtvedt, T., and Theodorsson, E. (1994). Microflora modulates endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rat. Gastroenterology *107*, 1259-1269.

Vaishampayan, P.A., Kuehl, J.V., Froula, J.L., Morgan, J.L., Ochman, H., and Francino, M.P. (2010). Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. Genome Biol Evol *2*, 53-66.

Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., and Hooper, L.V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 20858-20863.

Van der Sluis, M., De Koning, B.A., De Bruijn, A.C., Velcich, A., Meijerink, J.P., Van Goudoever, J.B., Buller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., and Einerhand, A.W. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. Gastroenterology *131*, 117-129.

van der Waaij, L.A., Limburg, P.C., Mesander, G., and van der Waaij, D. (1996). In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. Gut *38*, 348-354.

Wei, M., Shinkura, R., Doi, Y., Maruya, M., Fagarasan, S., and Honjo, T. (2011). Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. Nat Immunol *12*, 264-270.

Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., *et al.* (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science *334*, 105-108.

Wu, H.J., Ivanov, II, Darce, J., Hattori, K., Shima, T., Umesaki, Y., Littman, D.R., Benoist, C., and Mathis, D. (2010). Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. Immunity *32*, 815-827.

Xu, Z., Pone, E.J., Al-Qahtani, A., Park, S.R., Zan, H., and Casali, P. (2007). Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. Crit Rev Immunol *27*, 367-397.

Yamamoto, M., Rennert, P., McGhee, J.R., Kweon, M.N., Yamamoto, S., Dohi, T., Otake, S., Bluethmann, H., Fujihashi, K., and Kiyono, H. (2000). Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. J Immunol *164*, 5184-5191.

Yamauchi, K.E., and Snel, J. (2000). Transmission electron microscopic demonstration of phagocytosis and intracellular processing of segmented filamentous bacteria by intestinal epithelial cells of the chick ileum. Infection and immunity *68*, 6496-6504.

Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., *et al.* (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature *486*, 222-227.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annu Rev Immunol *28*, 445-489.

Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D., and de Vos, W.M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. Applied and environmental microbiology *68*, 3401-3407.

ANNEXE

Role of microbiota in postnatal maturation of intestinal T-cell responses

Valérie Gaboriau-Routhiau, Emelyne Lécuyer and Nadine Cerf-Bensussan

INSERM U989, Université Paris Descartes, Paris and INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France

Correspondence to Nadine Cerf-Bensussan, MD, PhD, INSERM U989, Université Paris Descartes, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France
Tel: +33 1 4061 5637; fax: +33 1 4061 5637;
e-mail: nadine.cerf-bensussan@inserm.fr

Current Opinion in Gastroenterology 2011, 27:502–508

Purpose of review

Taking advantage of their rapid growth and capacity for continuous genetic adaptation, prokaryotes have colonized all possible ecological environments on earth, including the body surfaces of eukaryotes and their gastrointestinal tract. The mammalian gut contains a complex community of 10^{14} bacteria with a meta-genome containing 1500-fold more genes than the human genome. The forces that control the relationships between eukaryotic hosts and their intestinal bacterial symbionts have, thus, become a major focus of interest.

Recent findings

Recent data have highlighted how the dialogue between mammalian hosts and their microbiota stimulates the postnatal maturation of an efficient intestinal barrier that promotes niche colonization by symbiotic bacteria and opposes colonization by pathogens. Herein, we review microbiota-induced T-cell responses and discuss how individual bacteria may shape the balance between regulatory and inflammatory responses. We will also show how host factors might influence the outcome of gut immune responses and affect the structure of the microbiota.

Summary

Deciphering host–microbiota reciprocal influence may not only help in understanding the recent outburst of intestinal inflammatory diseases but also point to strategies able to maintain or restore intestinal homeostasis.

Keywords

gut immune system, intestinal T cells, microbiota

Curr Opin Gastroenterol 27:502–508
© 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
0267-1379

Introduction

With a concentration of 10^{12} bacteria/ml of content, the distal part of the mammalian intestine is the ecological site on earth that is the most densely packed with bacteria. A trade-off setup between the microbiota and their hosts during their long co-evolution results in mutualistic relationships that promote the metabolic fitness of each partner. Yet, to face the menace represented by the intimate contact with a huge concentration of bacteria, hosts have developed a spectrum of complementary layers of defense. The intestinal epithelium has evolved into a highly regulated barrier that produces mucus and antimicrobial peptides and can recruit immune cells of hematopoietic origin. The latter cells include innate phagocytic cells and, in vertebrates, B and T lymphocytes that mediate long-lived specific adaptive immunity (reviewed in [1]).

In the mammalian gut immune system, lymphocytes are distributed between inductive and effector sites. Peyer's patches, isolated lymphoid follicles (ILFs) located in the intestinal wall and mesenteric lymph nodes (MLNs), are secondary lymphoid organs in which naive T lymphocytes bearing an αβ T-cell receptor (TCR) can be primed by dendritic cells that have sampled luminal antigens across the gut epithelium, notably across the specialized epithelium overlaying Peyer's patches. During their priming in Peyer's patches and MLNs, T lymphocytes but also B lymphocytes acquire homing receptors that allow their migration into the intestinal mucosa and their distribution along the whole intestinal length. Locally, they achieve their maturation into effector cells: immunoglobulin A (IgA) plasma cells and $CD4^+$ T cells settle in lamina propria, whereas $CD8^+$ T cells preferentially locate in between enterocytes. The intestinal mucosa is, thus, the effector site of the gut immune system (reviewed in [2,3]).

The development of the gut immune system is initiated before birth by a genetic program that drives the formation of Peyer's patches and MLNs, but its

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

postnatal maturation depends on intestinal colonization. Signals delivered by the microbiota drive the development of ILFs [4], stimulate Peyer's patches maturation and initiate the migration of IgA plasma cells and mature T lymphocytes into the mucosa [5,6]. Recent work has more particularly demonstrated how the microbiota can stimulate dual regulatory and inflammatory T-cell responses that cooperate to reinforce the intestinal epithelial barrier and maintain local and systemic homeostasis. Herein, we will review microbiota-induced T cell responses and discuss how individual bacteria may shape the balance between regulatory and inflammatory responses. We will also show how host and environmental factors might influence the outcome of gut immune responses to the microbiota.

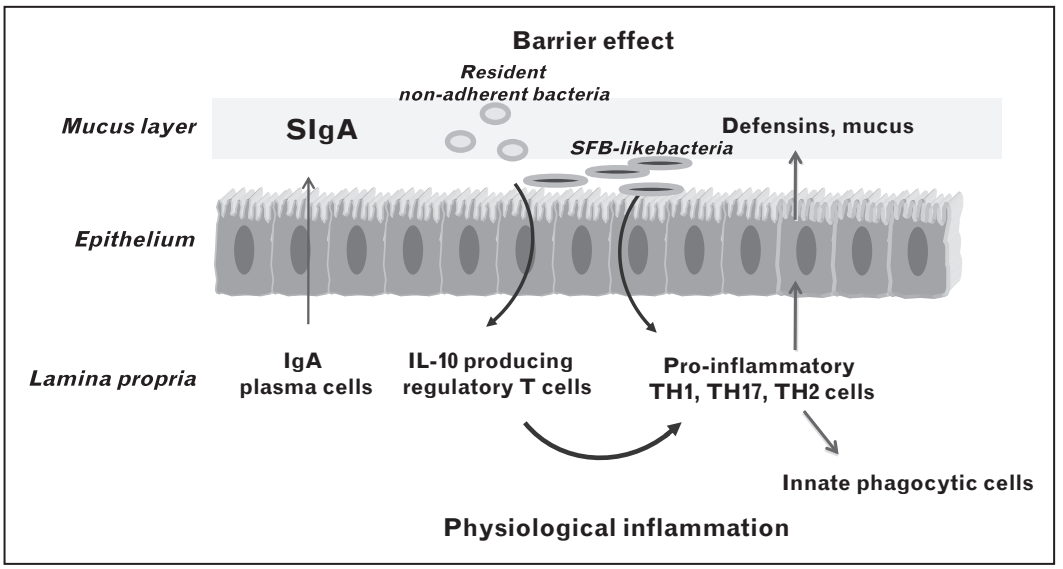
Key points

- The dialogue between hosts and their microbiota shapes the activation of the gut immune system, which, in turn, influences the structure of the microbiota.
- Intestinal colonization stimulates the postnatal maturation of an efficient intestinal barrier that protects hosts against pathogens.
- Intestinal colonization induces a broad spectrum of inflammatory and regulatory T-cell responses that balance each other in immunocompetent hosts.
- Individual bacteria can shape the balance between regulatory and inflammatory responses, but the outcome is strongly dependent on host immune status.
- The cytokine interleukin (IL)-10 is central to limit gut inflammatory responses and defective IL-10 signaling results in early onset colitis in infants.

Nature of gut T-cell responses to the microbiota

Comparison between immunocompetent mice, either germ-free or colonized by a mouse microbiota at birth or at the adult age, indicates that intestinal colonization stimulates the activation/migration of cytotoxic $CD8^+$ intraepithelial T lymphocytes [7,8] and of lamina propria $CD4^+$ T cells that can secrete inflammatory cytokines [interferon-γ (IFNγ), interleukin (IL)-17, IL-13/IL-4] and/or exert regulatory functions [9,10••] (Fig. 1). Intestinal T cells that expand in response are mainly classical T cells bearing a TCR. Induction of a minor subset of IL-17-producing T cells bearing a γδ TCR has, however, been recently reported [11].

Figure 1 The barrier effect of microbiota-induced T-cell responses in immunocompetent hosts



Intestinal colonization induces the activation of inflammatory and regulatory T cells. Most resident bacteria are nonadherent and preferentially stimulate immunoglobulin A (IgA) production and activation of regulatory T cells. Soluble products either derived from bacteria (e.g. polysaccharide A from *Bacteroides fragilis*) or resulting from bacterial metabolism in the host intestine, notably short-chain fatty acids, can promote regulatory T-cell responses. A subset of symbiotic bacteria (the prototype of which is segmented filamentous bacterium or SFB) can develop more intimate contacts with epithelial cells and/or secrete products (e.g. ATP) that stimulate strong innate epithelial responses and inflammatory T-cell responses. In immunocompetent hosts, inflammatory and regulatory T-cell responses balance each other, resulting in physiological inflammation that reinforces the epithelial barrier and confines bacteria in the lumen where they live entrapped by SIgA in the mucus. Resident bacteria and host immune responses, thus, cooperate to maintain local homeostasis and oppose colonization by pathogens. Recent data in mice and in humans have highlighted the central role of the regulatory cytokine interleukin (IL)-10 to prevent inflammatory responses to the microbiota. This cytokine is produced by a variety of cell types and notably by a subset of regulatory T cells induced by the microbiota. SIgA, secretory IgA; TH, T helper.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

The induction of a broad spectrum of $CD8^+$ and $CD4^+$ T-cell subsets in response to the microbiota raises several questions. The first concerns the specificity of T-cell responses to the microbiota. This question was recently addressed in mice with $CD4^+$ T cells expressing a single transgenic TCR directed against an antigen not found in the microbiota. These mice developed a substantial number of lamina propria T helper (TH)17^+ cells, which, thus, differentiated independently of a specific signal [12]. The proportions of TH17 cells specific or not for microbial antigens remain to be established in nontransgenic mice. Yet, the recent discovery that lamina propria contains innate lymphoid cells that secrete IL-17, IL-22 or IL-13, generally thought to be T-derived cytokines, indicate that signals in the intestinal microenvironment can drive cytokine production independently of a specific signal delivered via the TCR (reviewed in [13]).

A second important question concerns the pro-inflammatory versus regulatory roles of individual bacteria. This question has become the focus of major interest with the discovery of substantial changes in the composition of the microbiota in patients with inflammatory bowel diseases (IBDs) (reviewed in [14,15]). Moreover, the increasing incidence of IBDs in industrialized countries has raised the possibility that environmental changes might affect the composition of the gut microbiota and participate in this epidemic, a hypothesis supported by recent demonstration that microbiota composition is strongly influenced by the mode of birth delivery and by the diet [16••,17••,18].

Peace-keeping properties of most microbiota members

Contrasting with the strong and coordinated induction of pro-inflammatory and regulatory responses in mice colonized by a complete fecal mouse microbiota, only a moderate induction of regulatory responses was observed in mice colonized by the culturable fraction of this fecal microbiota [9]. These findings suggest either that T cells remain ignorant of many microbiota members or, conversely, that many bacteria preferentially induce regulatory T cells responses. The later hypothesis is supported by two recent studies. Atarashi *et al.* [19••] observed that colonization of germ-free mice by a mixture of 46 indigenous *Clostridium* species induced the expansion of IL-10-secreting forkhead box P3 $(Foxp3)^+CD4^+$ T cells in the colonic mucosa. Expansion of colonic $Foxp3^+CD4^+$ T cells, presumably IL-10 producing, was also observed by Geuking *et al.* [10••] in mice colonized by the altered Schaedler flora (ASF), a simplified microbiota consisting of eight culturable intestinal bacteria. In both studies, induction of $Foxp3^+CD4^+$ T cells could prevent the colitis provoked by oral administration of dextran sulfate sodium (DSS) (Fig. 1).

Foxp3 $CD4^+$ T cells (Tregs) are the best characterized subset of regulatory T cells. The latter cells comprise a subset of natural Tregs generated in the thymus that prevent antiself immune responses, and a second subset of induced Tregs (iTregs) generated during responses to exogenous antigens, notably in the intestine [20••]. The exact role of Tregs in controlling intestinal responses to the microbiota is not fully delineated. Colitis is inconstant in immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome children lacking FOXP3 $CD4^+$ T cells. Recent studies in mice suggest that their absence may be compensated by the expansion of a subset of IL-10-producing $CD4^+$ T cells lacking Foxp3, and called Tr1 cells [21]. IL-10 is indeed critical to control inflammatory responses to the microbiota. Thus, mice but also infants lacking IL-10 or a functional IL-10 receptor (IL-10R) develop severe colitis [22–24]. IL-10 is produced by many cell types, but recent studies have more particularly stressed the protective role of IL-10 derived from $CD4^+Foxp3^+$ Treg or Tr1 cells [25•,26•]. IL-10 can act not only on antigen-presenting cells [24] but also on IL-10R-expressing T cells. Notably, IL-10 can stimulate Foxp3 expression and IL-10 secretion in Tregs, whereas inhibit IL-17 production in differentiated TH17 cells [25•,26•]. Interestingly, treatment of ASF-colonized mice with a blocking anti-IL10R antibody resulted in the expansion of TH1 and TH17 cells, indicating that both pro-inflammatory and anti-inflammatory T-cell subsets were induced upon colonization, but that IL-10 exerted a tight control and prevented the generation and/or expansion of inflammatory subsets (Fig. 1).

Besides their anti-inflammatory effects, microbiota-induced Tregs might stimulate IgA responses and, thereby, exert a second key function in local homeostasis. Thus, some Peyer's patch Tregs can differentiate into follicular helper T cells and drive Peyer's patch B-cell differentiation into IgA-producing cells [27,28] that migrate into lamina propria and differentiate into plasma cells. Secretory IgA (SIgA) translocated into the lumen bind bacteria and facilitate their trapping into mucus. The coordinated induction of SIgA and Tregs is likely instrumental to maintain homeostasis toward microbiota (Fig. 1 and see below).

Mechanisms controlling the induction of regulatory T cells by the microbiota

The mechanisms underlying the preponderant induction and/or activation of Tregs in response to the microbiota remain largely elusive. The role of Toll-like receptors (TLRs), and notably of TLR2, has been demonstrated for *Bacteroides fragilis*. This bacterium possesses an unusual capsular polysaccharide A (PSA) that exerts potent immunoregulatory effects and can dampen intestinal

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

inflammation in several models of colitis [29,30]. PSA was shown to electively bind TLR2 on $CD4^+Foxp3^+$ Tregs and to stimulate their production of IL-10 [31•]. Stimulation of colonic lamina propria $Foxp3^+$ Tregs by ASF flora might also depend on TLR, as their numbers were reduced in mice lacking MyD88 and TICAM1, two molecules involved in TLR signaling [10••]. In contrast, robust accumulation of colonic $Foxp3^+$ Tregs was observed in $MyD88^{-/-}$ mice colonized by the mixture of *Clostridium* [19••], and the inducing effect of the microbiota was rather ascribed to epithelial production of tumor growth factor (TGF)-β and of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Several mechanisms might, thus, contribute to the immunoregulatory functions of intestinal bacteria.

Detection of bacteria-derived soluble factors able to promote regulatory versus inflammatory responses was recently exploited for in-vitro screening of probiotics strains [32,33••]. Mouse gavage with a mixture of five such selected strains (three *Lactobacillus* strains, *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus*) could prevent TH1 colitis induced by trinitrobenzene-sulfonic acid and TH2-mediated atopic dermatitis [33••]. In treated mice, MLN dendritic cells produced TGF-β, IDO and cyclooxygenase 2 and could promote Treg differentiation [33••].

Except for PSA, soluble microbiota-derived metabolites with immunoregulatory properties remain largely unknown. An alternative but nonexclusive mechanism involved molecules produced by bacteria in the intestinal lumen and notably short-chain fatty acids (SCFAs) produced during fermentation of nondigestible oligosaccharides by a subset of commensal bacteria. Apart from their well known function as a fuel for colonocytes, SCFAs can bind the G protein-coupled receptor 43 on neutrophils and inhibit their production of reactive oxygen species. Accordingly, oral administration of SCFAs could attenuate inflammation in several mouse models of colitis, arthritis and asthma [34]. This observation provides a rationale for the putative beneficial effect of fiber-enriched diets.

Immunostimulatory properties of a restricted number of symbionts

The lack or weak induction of T-cell-related genes in the ileum of gnotobiotic mice colonized by a human microbiota or by culturable members of the mouse microbiota contrasted with their strong induction in conventional mice [9]. These results suggested that a restricted number of unculturable species-specific bacteria might be able to drive the coordinated maturation of regulatory and inflammatory intestinal T-cell responses. One such species is segmented filamentous bacterium (SFB), an unculturable *Clostridium*-related species that develops host-specific adherence to the ileum of weaning mice [35]. Thus, monocolonization by SFB can largely recapitulate the inducing effects of a whole mouse microbiota and stimulate strong SIgA responses [36], intestinal migration of cytotoxic intraepithelial lymphocytes [7] and of lamina propria T cells able to secrete large amounts of IFNγ, IL-17, IL-4, IL-13 and IL-10 [9,37]. SFB can also stimulate a moderate expansion of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T cells [9]. In immunocompetent mice monocolonized by SFB, intestinal histology is normal, indicating that immunoregulatory and inflammatory responses balance each other and maintain homeostasis.

The mechanisms underlying the strong immunostimulatory properties of SFB remain to be deciphered. One unusual feature of SFB is a holdfast segment that anchors the bacterium into epithelial cells [38]. This intimate contact suggests that SFB needs to adhere to the epithelium for replication and colonization. This adherence might explain the strong epithelial innate responses observed in the ileum of mice monocolonized by SFB and subsequently promote host adaptive immune responses. Thus, SFB was shown to induce the epithelial synthesis of serum amyloid A that can, *in vitro*, stimulate dendritic cells production of IL-23 [37], a cytokine that favors both TH17 and TH1 responses. Sequencing the SFB genome, a work in progress in several laboratories, should provide insight into the immunostimulatory mechanisms of this unusual symbiont.

SFB provides the example of an interesting trade-off between hosts and their microbiota. In immunocompetent hosts, the inflammatory response induced by SFB is counterbalanced by a regulatory response [9]. As a result, the strength of the immune response is attenuated; the bacterium is not eliminated and can remain in its intestinal niche. Conversely, the immune response induced by SFB can strengthen the host intestinal barrier and confer protection against invasive pathogens. Thus, mice with a specific pathogen free microbiota lacking SFB could not control colonization by the invasive pathogen *Citrobacter rodentium*, whereas they were protected when SFB was present. The protective effect of SFB was ascribed to the induction of IL-17 and of IL-22-producing T cells and to the production of antimicrobial RegIIIγ and RegIIIβ peptides [37].

It is tempting to suggest that bacteria with comparable immunostimulatory properties are present in the microbiota of many animal species and play a privileged role in the postnatal maturation of host intestinal barrier and immune system. Bacteria sharing the unusual morphological features of SFB and its strong attachment to the intestinal wall have been detected in many species from invertebrates to mammals. Moreover, 16S

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

RNA sequences suggest the presence of SFB-like bacteria in rats, chicken and trout [39,40]. Determination of the mouse SFB genome may help to identify related sequences in the microbiota of other species including in humans.

Other bacteria may share the properties of SFB and/or potentiate its immunostimulatory effect on the intestinal barrier. Possible candidates are ATP-producing bacteria that promote the differentiation of intestinal TH17 cells by stimulating P2X and P2Y receptors on a subset of lamina propria dendritic cells, which produce IL-6 and TGF-β [41]. Yet, only rare members of the microbiota seem capable to produce ATP. One such strain recently identified in fecal mouse and human microbiota is the vancomycin-resistant Gram-positive *Enterococcus gallinarum* [42•]. Other candidates may perhaps be found among so-called pathobionts. This term was coined by S. Mazmanian to define bacteria, generally Proteobacteria such as *Helicobacter* [43,44] and *Escherichia coli* species [45], which silently colonize the gastrointestinal tract, but can cause severe inflammation in predisposed individuals or following changes in the gastrointestinal environment. Thus, *Helicobacter* species develop intimate contact with the epithelium and possess a secretion apparatus that can deliver molecules able to modulate host innate and adaptive functions.

Role of host factors in the outcome of host–microbiota interactions

Data discussed above show how bacterial features can influence host immune responses and tune the balance between regulation and inflammation. Yet, the impact of a given member of the microbiota strongly depends on host immune status and can be modified by factors in the gastrointestinal environment. Thus, resident bacteria can cause life-threatening opportunistic infections or, on the contrary, deleterious inflammation in predisposed individuals. On the basis of current studies, one can suggest several rules that govern the trade-off between hosts and their microbiota and maintain a physiological level of inflammation compatible with the fitness of each partner.

Controlled activation of epithelial cells is necessary to produce antimicrobial peptides, to recruit immune cells and, thereby, build an efficient intestinal immune barrier. This notion is well illustrated by the onset of colitis in mice with selective inactivation of NF-κB or of inflammasome pathway in intestinal epithelial cells [46–48].

The host must have robust immunomodulatory functions. Thus, colonization by most members of the microbiota results in the coordinated induction of SIgA and Tregs producing IL-10. Yet, blocking IL-10 signaling uncovers the induction of TH17 by *B. fragilis* as well as by the simplified Schaedler microbiota [10••,31•]. As a consequence, the latter bacteria become unable to confer protection against colitis and, on the contrary, exacerbate intestinal inflammation after DSS treatment. The early onset of colitis in children lacking a functional IL-10 pathway underscores the importance of this regulatory mechanism in humans [22,23].

Intestinal bacteria must remain entrapped in the mucus and away from the epithelial surface. Any alteration in the mechanisms that cooperate to intraluminal confinement of bacteria (e.g. production of mucus, defensins, SIgA) can lead to excessive activation of epithelial cells and of underlying immune cells. The case of the entero-invasive LF82 *E. coli* strain associated with ileal Crohn's lesions provides a striking example. Mice lacking carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6), the epithelial receptor for LF82 pili, are silently colonized by LF82. In contrast, severe colitis develops in transgenic mice with colonic expression of CEACAM6 [49]. In the human intestine, CEACAM6 is not constitutively expressed but is induced by inflammatory cytokines [50]. Adhesion of LF82 may, thus, occur secondarily to inflammation in Crohn's patients and sustain a vicious cycle. Alternatively, induction of CEACAM6 by an infectious process may initiate adhesion and onset of chronic inflammation in predisposed individuals.

If these rules are not respected, intestinal inflammation occurs with many possible deleterious consequences for the host and for colonic microbial ecology. Stecher *et al.* [51] were the first to show how inflammation can empty intestinal niches from resident bacteria and facilitate colonization by pathogenic Proteobacteria, presumably more resistant to host derived inflammatory metabolites. Two recent studies further demonstrate that inflammation can select for strains able to transfer colitis to healthy immunocompetent hosts. Owing to uncontrolled tumor necrosis factor-α production by dendritic cells, T-bet$^{-/-}$RAG2$^{-/-}$ ulcerative colitis (TRUC) mice develop a severe and highly penetrant colitis that can be transmitted to wild-type mice by cross-fostering and cohousing experiments [52,53]. Colitis is associated with a selective enrichment in *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumonia*, which are not sufficient alone to induce the colitis, but which can provoke colonic inflammation in wild-type mice when combined with a pathogen-free microbiota [54]. A comparable observation was made in mice lacking NOD-like receptor family pyrin domain containing 6 (NLRP6). This member of the nucleotide-binding oligomerization domain protein-like receptors (NLRs) is strongly expressed in the gut epithelium and controls epithelial production of IL-18 and of CCL5, a chemokine allowing immune cell recruitment [48]. In NLRP6$^{-/-}$ mice, the colitogenic effect of the microbiota was correlated with enrichment in

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Prevotellaceae. These observations in mouse models help to comprehend the dysbiosis observed in human IBDs often associated with depletion in resident *Firmicutes* spp., some of which endowed with regulatory effects [55,56] and enrichment in pathogenic *E. coli*. [50,57]. Interestingly, the colitis of TRUC mice could be improved by the consumption of milk fermented with *Bifidobacterium lactis*, a beneficial effect ascribed to a decrease in cecal pH and changes in SCFA profiles that created a nonpermissive environment for the two colitogenic Enterobacteriaceae [58].

In conclusion, recent data have highlighted how the dialogue between hosts and their microbiota can shape the activation of the immune system and, in turn, influence the structure of the microbiota. Intestinal colonization stimulates the postnatal maturation of an efficient intestinal barrier that protects the host against pathogens. Potent immunoregulatory mechanisms avoid adverse immune responses and promote niche colonization by symbiotic bacteria. This virtuous circle is, however, fragile and can be disrupted by host or environmental factors. Deciphering the rules that govern host–microbiota interactions is necessary to apprehend the pathogenesis of intestinal inflammatory diseases and design strategies able to maintain or restore intestinal homeostasis.

Acknowledgments

The authors are partners of the European Community networks Cross-Talk (contract number PITN-GA-2008–215553) and Tornado (FP7 222720). E.L. is a Cross-Talk fellow. The authors' work is supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Mé dicale (INSERM), the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2010 RPV10205KKA) and Fondation Princesse Grace. E.L. is supported by a PhD fellowship from INRA.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- • of special interest
- •• of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (p. 588).

1 Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol 2010; 10:159–169.

2 Mora JR, von Andrian UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. Mucosal Immunol 2008; 1:96–109.

3 Sigmundsdottir H, Butcher EC. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. Nat Immunol 2008; 9:981–987.

4 Bouskra D, Brezillon C, Berard M, *et al.* Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. Nature 2008; 456:507–510.

5 Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P. Gut-associated lymphoblasts and intestinal IgA plasma cells. Adv Exp Med Biol 1974; 45:41–46.

6 Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat Rev Immunol 2004; 4:478–485.

7 Umesaki Y, Okada Y, Matsumoto S, *et al.* Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. Microbiol Immunol 1995; 39:555–562.

8 Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, *et al.* Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. Infect Immun 1999; 67:3504–3511.

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

10 •• Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA, *et al.* Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. Immunity 2011; 34:794–806.
This elegant study shows that the induction of colonic lamina propria Tregs in mice colonized by ASF prevents inflammatory Th17 and Th1 responses. The latter responses are uncovered when mice are treated with a blocking anti-IL-10 antibody. These experimental data illustrate the critical role of IL-10 in the control of host immune responses to the microbiota.

11 Duan J, Chung H, Troy E, Kasper DL. Microbial colonization drives expansion of IL-1 receptor 1-expressing and IL-17-producing gamma/delta T cells. Cell Host Microbe 2010; 7:140–150.

12 Lochner M, Berard M, Sawa S, *et al.* Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells. J Immunol 2011; 186:1531–1537.

13 Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells, regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. Nat Immunol 2011; 12:21–27.

14 Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. Nature 2011; 474:298–306.

15 Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? Nat Rev Immunol 2010; 10:735–744.

16 •• De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:14691–14696.
Along with [17••], this work demonstrated the considerable impact of the diet in shaping gut microbial communities and how it can induce rapid shifts in its composition. Major differences were observed in microbiota composition between European children and children living in a rural part of Africa who eat a traditional fiber-rich diet.

17 •• Faith JJ, McNulty NP, *et al.* Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. Science 2011; 333:101–104.
Using gnotobiotic mice harboring a 10-member community of sequenced human gut bacteria, the authors test a mathematical model and predict how different ingredients of the diet can influence the composition of the microbiota. These data illustrate the major impact of the diet on the structure of the intestinal microbiota and the possibility to influence this composition by changing the diet.

18 Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:11971–11975.

19 •• Atarashi K, Tanoue T, Shima T, *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. Science 2011; 331:337–341.
The authors showed that colonization by a cocktail of 46 *Clostridium* strains induces the accumulation of Tregs producing IL-10 in the colonic lamina propria and can protect against colitis and allergic peripheral sensitization.

20 •• Hadis U, Wahl B, Schulz O, *et al.* Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. Immunity 2011; 34:237–246.
This elegant study describes the induction of iTregs that mediate tolerance to dietary ovalbumin (OVA). It shows that $CD103^+$ dendritic cells loaded with OVA migrate toward MLNs and induce iTregs that home into the intestinal lamina propria in which they expand and then disseminate to the periphery. Depletion experiments confirm the central role of Tregs in tolerance to OVA.

21 Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, *et al.* Role of conserved noncoding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. Nature 2010; 463:808–812.

22 Begue B, Verdier J, Rieux-Laucat F, *et al.* Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2011; 106:1544–1555.

23 Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. N Engl J Med 2009; 361:2033–2045.

24 Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. Immunol Rev 2008; 226:219–233.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

25 Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, *et al.* Interleukin-10 signaling
• in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. Immunity 2011; 34:566–578.
This article shows that IL-10R$^+$ Tregs activated by IL-10 downmodulate Th17 cell responses.

26 Huber S, Gagliani N, Esplugues E, *et al.* Th17 cells express interleukin-10
• receptor and are controlled by Foxp3 and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. Immunity 2011; 34:554–565.
This article provides complementary data, showing that Th17 cells express IL-10R and can be directly inhibited by IL-10.

27 Cong Y, Feng T, Fujihashi K, *et al.* A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:19256–19261.

28 Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, *et al.* Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. Science 2009; 323:1488–1492.

29 Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature 2008; 453:620–625.

30 Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:12204–12209.

31 Round JL, Lee SM, Li J, *et al.* The Toll-like receptor 2 pathway establishes
• colonization by a commensal of the human microbiota. Science 2011; 332:974–977.
This article shows that *B. fragilis* PSA can bind TLR2 on Tregs and stimulate their regulatory properties.

32 Grangette C, Nutten S, Palumbo E, *et al.* Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:10321–10326.

33 Kwon HK, Lee CG, So JS, *et al.* Generation of regulatory dendritic cells
•• and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:2159–2164.
This study provides evidence that in-vitro screening can help to select probiotic strains with potent immunoregulatory properties.

34 Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. Nature 2009; 461:1282–1286.

35 Tannock GW, Miller JR, Savage DC. Host specificity of filamentous, segmented microorganisms adherent to the small bowel epithelium in mice and rats. Appl Environ Microbiol 1984; 47:441–442.

36 Talham GL, Jiang HQ, Bos NA, Cebra JJ. Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. Infect Immun 1999; 67:1992–2000.

37 Ivanov II, Atarashi K, Manel N, *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell 2009; 139:485–498.

38 Davis CP, Savage DC. Habitat, succession, attachment, and morphology of segmented, filamentous microbes indigenous to the murine gastrointestinal tract. Infect Immun 1974; 10:948–956.

39 Klaasen HL, Koopman JP, Van den Brink ME, *et al.* Intestinal, segmented, filamentous bacteria in a wide range of vertebrate species. Lab Anim (NY) 1993; 27:141–150.

40 Snel J, Heinen PP, Blok HJ, *et al.* Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of '*Candidatus Arthromitus*'. Int J Syst Bacteriol 1995; 45:780–782.

41 Atarashi K, Nishimura J, Shima T, *et al.* ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. Nature 2008; 455:808–812.

42 Iwase T, Shinji H, Tajima A, *et al.* Isolation and identification of ATP-
• secreting bacteria from mice and humans. J Clin Microbiol 2010; 48: 1949–1951.
This study suggests that ATP-producing strains may be infrequent in the mouse and human microbiota and rather pathogenic bacteria.

43 Chow J, Mazmanian SK. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. Cell Host Microbe 2010; 7:265–276.

44 Polk DB, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. Nat Rev Cancer 2010; 10:403–414.

45 Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2010; 8:207–217.

46 Nenci A, Becker C, Wullaert A, *et al.* Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. Nature 2007; 446:557–561.

47 Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, *et al.* Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. Immunity 2010; 32:367–378.

48 Elinav E, Strowig T, Kau AL, *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. Cell 2011; 145:745–757.

49 Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, *et al.* Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. J Exp Med 2009; 206: 2179–2189.

50 Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, *et al.* CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. J Clin Invest 2007; 117:1566–1574.

51 Stecher B, Robbiani R, Walker AW, *et al. Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. PLoS Biol 2007; 5:2177–2189.

52 Garrett WS, Lord GM, Punit S, *et al.* Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. Cell 2007; 131:33–45.

53 Garrett WS, Punit S, Gallini CA, *et al.* Colitis-associated colorectal cancer driven by T-bet deficiency in dendritic cells. Cancer Cell 2009; 16:208–219.

54 Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenko T, *et al.* Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. Cell Host Microbe 2010; 8:292–300.

55 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, *et al. Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:16731–16736.

56 Sokol H, Seksik P, Furet JP, *et al.* Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. Inflamm Bowel Dis 2009; 15:1183–1189.

57 Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. Gastroenterology 2004; 127:412–421.

58 Veiga P, Gallini CA, Beal C, *et al. Bifidobacterium animalis* subsp. lactis fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:18132–18137.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.