



**HAL**  
open science

# Etude des interactions du microbiote intestinal avec le récepteur de l'immunité innée NOD2 dans la maladie de Crohn et le cancer colorectal

Aurélie Couturier-Maillard

► **To cite this version:**

Aurélie Couturier-Maillard. Etude des interactions du microbiote intestinal avec le récepteur de l'immunité innée NOD2 dans la maladie de Crohn et le cancer colorectal. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S008 . tel-01127310

**HAL Id: tel-01127310**

**<https://theses.hal.science/tel-01127310>**

Submitted on 7 Mar 2015

**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.

UNIVERSITE LILLE 2 – DROIT ET SANTE  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE

Doctorat  
Spécialité : Immunologie

Présenté par

Aurélie COUTURIER-MAILLARD

# Etude des interactions du microbiote intestinal avec le récepteur de l'immunité innée NOD2 dans la maladie de Crohn et le cancer colorectal

*Thèse dirigée par le Dr Mathias CHAMAILLARD*

Soutenue le 6 septembre 2012

**Jury :**

**Pr. Michel SIMONET**

**Pr. François ERARD**

**Dr. Hervé BLOTTIERE**

**Dr. Harry SOKOL**

**Dr. Mathias CHAMAILLARD**

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Directeur de Thèse**

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille,  
Université Lille Nord de France. Equipe « Nod Like Receptors in Infection and Immunity »



# Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier le Pr. Michel Simonet, le Dr. Hervé Blottière et le Dr. Harry Sokol d'avoir accepté de prendre part à l'évaluation de mon travail de thèse.

Je tiens à remercier plus particulièrement le Pr. François Erard de m'avoir initiée et donné goût à l'immunologie ainsi que d'avoir une fois de plus accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie le Dr Chantal Pichon sans qui je n'aurais pas poursuivi mes études après mon BTS et qui m'a soutenue pour ma demande de bourse de thèse.

J'adresse mes remerciements au Dr. Mathias Chamillard pour m'avoir confié ce projet et encadré mes travaux de thèse. Merci de m'avoir proposé cette thèse alors que je me prédestinais à des études plus courtes.

Je souhaite témoigner toute ma gratitude à tous les membres de l'équipe 7 du CIIL, Anne, Myriam, Marion, Teddy et Sylvain. Avec gentillesse, chacun dans son domaine m'a apporté son savoir faire et a su me donner un coup de pouce quand j'en avais besoin.

Une pensée pour le Dr Corinne Granette pour les manipulations que nous avons faites ensemble dans la bonne humeur malgré les difficultés d'optimisation que nous avons pu rencontrer.

Merci au Dr Jean Claude Sirard d'avoir pu me fournir des animaux de son élevage lorsque j'en avais besoin.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'animalerie et plus particulièrement Nathalie pour sa gentillesse et son efficacité aux isolateurs. Merci d'avoir organisé les transferts de souris dans l'urgence de mon travail. Merci aussi à Thierry pour sa gentillesse et sa disponibilité pour les conseils techniques.

Je souhaite remercier également Teddy, Marion, Sylvain, Aline, Mumu, Ju et Mathieu pour tous les bons moments passés ensemble et sans lesquels la vie à Lille aurait été plus monotone.

Je terminerai par un immense merci à mon mari, Jérémy, pour m'avoir soutenue dans mon projet professionnel et ce, malgré la distance qui nous séparait pendant 3 ans. Merci d'avoir toujours été là dans les moments heureux comme dans les moments plus difficiles.

# Sommaire

Remerciements .....	3
Sommaire .....	5
Abréviations.....	8
Résumé .....	12
Abstract .....	14
Introduction générale.....	16
Chapitre 1 : Le tube digestif.....	21
1. Structure du tube digestif.....	21
2. Composition cellulaire de l'épithélium intestinal .....	23
3. Le système lymphoïde associé à l'intestin.....	24
3.1. Les plaques de Peyer .....	25
3.2. Les ganglions mésentériques.....	25
3.3. Les autres GALT .....	25
Chapitre 2 : L'immunité innée .....	27
1. Généralités sur l'immunité .....	27
2. Barrières de l'immunité innée .....	27
3. La réaction inflammatoire .....	28
4. Les médiateurs de l'immunité.....	28
4.1. Les cytokines pro-inflammatoires.....	29
4.1.1. Le Tumour Necrosis Factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) .....	29
4.1.2. L'interleukine 1 (IL-1) .....	31
4.1.3. L'interleukine 6 (IL-6) .....	31
4.2. Les Cytokines anti-inflammatoires .....	34
4.2.1. L'interleukine 10 (IL-10) .....	34
4.2.2. Le Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	35
4.3. Les Chimiokines.....	36
5. Les Récepteurs de l'immunité innée : Les Pattern Recognition Receptors (PRR)	
36	
5.1. Les Toll Like Receptors (TLR) : Récepteurs membranaires .....	37
5.1.1. Structure des TLR .....	37
5.1.2. Ligands des TLR .....	38
5.1.3. Voies de signalisation des TLR.....	39
5.2. Les Nod Like Receptors (NLR) : Récepteurs cytoplasmiques .....	41
5.2.1. Structure des NLR.....	41
5.2.2. Les NACHT, LRR and PYD domain-containing protein (NLRP) et l'inflammasome.....	42
5.2.3. Les Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD)..	43
Chapitre 3 : La flore intestinale .....	48

1. Généralités .....	48
2. Composition du microbiote intestinal .....	48
2.1. Les eucaryotes et les virus.....	48
2.2. Les Archées .....	49
2.3. Les bactéries .....	49
2.4. Le microbiote intestinal.....	51
3. Fonctions du microbiote intestinal sur son hôte.....	51
3.1. Métabolisme .....	52
3.2. Fonction Protectrice .....	53
3.2.1. Compétition avec les pathogènes .....	53
3.2.2. Production de facteurs anti-microbiens .....	53
3.3. Fonctions structurales.....	54
3.3.1. Jonctions serrées et angiogenèse .....	54
3.3.2. Contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales ..	54
3.3.3. Maturation et stimulation du système immunitaire.....	55
4. Régulation de la flore intestinale par l'Hôte .....	56
4.1. Effet de l'alimentation sur la composition du microbiote intestinal .....	56
4.2. Facteurs génétiques influençant la composition de la flore intestinale .....	57
4.3. Prise d'antibiotiques .....	58
4.4. Les conditions d'hygiène .....	58
4.5. La production de mucus .....	59
4.6. Les peptides anti-microbiens.....	59
4.6.1. Les défensines .....	60
4.6.2. Les Cathélicidines .....	61
4.6.3. Les lectines de type C Reg3 $\beta$ et Reg3 $\gamma$ .....	62
4.6.4. Les peptides à activité enzymatique.....	62
4.7. La production IgA .....	62
Chapitre 4 : De la maladie de Crohn au cancer colorectal .....	64
1. La maladie de Crohn .....	64
1.1. Généralités.....	64
1.2. Epidémiologie .....	64
1.3. Thérapies .....	65
1.4. Facteurs influençant l'apparition de la MC.....	66
1.4.1. Facteurs génétiques .....	67
1.4.2. Facteurs environnementaux.....	68
1.4.3. Rôle de l'immunité innée dans le développement de la MC.....	69
1.4.4. Le microbiote dans le développement de la MC.....	72
2. Conséquence aux MICI le cancer colorectal .....	76
2.1. Facteurs de risque.....	76
2.2. Inflammation et CCR .....	77
2.3. Microbiote et CCR .....	78
Objectifs du travail de thèse .....	80
Résultats.....	82
Article 1 : NOD2-dependent licensing of the microbiota intrinsically prevents transmissible intestinal inflammation and tumorigenesis in mice.....	82

Article 2 : A suppressive role of NOD2 on Th2-mediated intestinal inflammation through IL1 $\beta$ -mediated signaling pathway. ....	132
Résultats complémentaires .....	156
Discussion et perspectives .....	159
Références bibliographiques .....	167



# Abréviations

AD : Activator domain

ADN : Acide Desoxyribonucléique

Ang-4 : Angiogénine 4

AOM : Azoxymethane

AP-1 : Activator Protein 1

ARN : Acide Ribonucléique

ASC : Apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD

ATG16L1 : Autophagy-related gene 16-like 1

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B cell receptor

BIR : Baculovirus inhibitor of apoptosis domain

CAC : Cancer associé à la colite

CARD : Caspase-activation and recruitment domain

CCL : Chimiokine à motif CC

CCR : Cancer colorectal

CF : Cross fostering

CFU : Unité formant colonie

CH : Co-housing

CLR : C-type lectin receptor

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

Cox : Cyclooxygénase

CRAMP : Cathelin-related antimicrobial peptide

CXCL : Chimiokine à motif CXC

DAMP : Damage-associated molecular patterns

DAP : Diaminopimelic Acid

DC : Cellules dendritiques

Defcr : Defensin-related cryptdin

Defcr-rs : Defensin-related cryptdin (Defcr)–related sequence

DSS : Dextran Sodium Sulfate

ERK : Extracellular signal-regulated protein kinase

FADD : Fas-associated death domain protein

Fas : Apoptosis Stimulating Fragment

GALT : Gut-associated lymphoid Tissues  
GF : Germ free ou axénique  
gp130 : glycoprotéine 130  
*H.h* : *Helicobacter hepaticus*  
HBD : Human beta défensine  
HD : Human defensin  
HNP : Human neutrophil peptide  
HSP : Heat Shock proteins  
 $\text{I}\kappa\text{B}$  : Inhibitor of *kappa* B  
ICAM : Intercellular adhesion molecule  
IEC : Cellules épithéliales intestinales  
IEL : Lymphocytes intra-épithéliaux  
IFN : Interferon  
Ig : Immunoglobuline  
IKK : Inhibitor of  $\kappa\text{B}$  kinase  
IL : Interleukine  
IL-1R : Interleukine 1 receptor  
ILC : Innate lymphoid cells  
ILF : Follicules lymphoïdes isolés  
iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible  
IRAK : IL-1R associated kinase  
IRF 3 : IFN regulatory factor 3  
IRGM : Immunity-related GTPase family M protein  
JAK : Janus kinase  
JNK : c-Jun N-terminal kinase  
KO : Knockout  
LPMC : Cellules mononuclées de la *lamina propria*  
LPS : Lipopolysaccharide  
LRR : Leucin rich repeat  
LTA : Acide Lipotechoïque  
LTGF- $\beta$  : Latent Transforming growth factor  $\beta$   
mIL-6R : Récepteur membranaire de l'interleukine 6  
MALT : Mucosa-associated lymphoid tissues

MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
MC : Maladie de Crohn  
MDP : Muramyl dipeptide  
MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin  
MLN : Mesenteric Lymph Nodes  
MMP : Metalloprotéinase  
MNV : Norovirus murin  
MUC : Mucine  
MyD88 : Myeloid differentiation 88  
NACHT : NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), C2TA (MHC class 2 transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) and TP1 (telomerase-associated protein)  
NAG : N-acétylglucosamine  
NAIP : Baculoviral IAP repeat-containing protein  
NALP : NACHT, LRR and PYD domains-containing protein  
NAM : Acide N-acétylmuramique  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-*kappa* B  
NK : Natural killer  
NLR : Nod like receptor  
NOD : Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein  
OTU : Operational Taxonomic Units  
PAMP : Pathogen-associated molecular patterns  
PAP : Pancreatic-associated protein  
PGE2 : Prostaglandine E2  
PGN : Peptidoglycane  
PP : Plaques de Peyer  
PRR : Pattern recognition Receptors  
Ptgs2 : Prostaglandine endoperoxydase synthase 2  
PYD : Domaine Pyrine  
Rag-2 : Recombination activating gene 2  
Reg3 : Regenerating islet-derived protein 3  
RICK : RIP-like interacting CLARP kinase  
RIP : Receptor-interacting protein  
RLR : RIG-I-like receptor

RNS : Espèces réactives nitrogénées  
ROS : Espèces réactives oxygénées  
sgp130Fc : Fragment Fc soluble de la gp130  
SH : Single housed  
sIL-6R : Récepteur soluble de l'interleukine 6  
Smad : Mothers against decapentaplegic homolog  
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription  
TACE : TNF $\alpha$  converting enzyme  
TAK : Transforming growth factor  $\beta$  activated kinase  
T-bet : T-box transcription factor  
TBK-1 : TANK-binding kinase 1  
TCR : T cell receptor  
TGF : Transforming growth factor  
TIR : Toll-IL-1 receptor domain  
TIRAP : TIR domain-containing adaptator protein  
TLR : Toll like receptor  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TNFR : TNF receptor  
TRADD : TNFR1-associated death domain protein  
TRAF : TNF receptor-associated factor 6  
TRAM : TRIF-related adaptator molecule  
TRIF : TIR domain-containig adaptator inducing IFN $\gamma$   
VCAM : Vascular cell adhesion molecule  
WT : Wild type  
ZO : zona occludens

# Résumé

## Etude des interactions du microbiote intestinal avec le récepteur de l'immunité innée NOD2 dans la maladie de Crohn et le cancer colorectal

Pathologie multifactorielle, la maladie de Crohn pourrait être la conséquence de facteurs environnementaux, génétiques et impliquerait également une dérégulation de la réponse immunitaire vis-à-vis du microbiote intestinal. En effet, des variations qualitatives et quantitatives du microbiote intestinal ont pu être mises en évidence chez les patients atteints de cette pathologie. Dysbiose également observée dans le cancer colorectal dont le risque de développement est doublé chez les patients atteints de maladie de Crohn.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle du récepteur de l'immunité innée NOD2, dont les polymorphismes génétiques prédisposent à la maladie de Crohn ainsi qu'à l'influence du microbiote intestinal dans l'établissement de colites et du cancer colorectal.

Un modèle murin de colite chimique et de cancer associé à la colite (CAC) a permis de mettre en évidence une aggravation des signes cliniques de ces pathologies chez les animaux *Nod2*<sup>-/-</sup> et *Rip2*<sup>-/-</sup> en comparaison aux animaux sauvages suggérant un rôle protecteur de NOD2 et de son adaptateur protéique RIP2 dans la colite et à plus long terme dans la tumorigenèse.

En vue de déterminer l'origine de ce sur-risque observé chez les animaux *Nod2* ou *Rip2*-déficients nous avons tout d'abord vérifié le caractère transmissible de la colite. Des expériences de co-hébergement et d'adoption ont montré une transmission de la susceptibilité associée aux animaux déficients à des animaux sauvages de manière horizontale (par les congénères) et verticale (par la mère). Une analyse systématique du microbiote dans le modèle de CAC a mis en évidence une réduction de la diversité microbienne ainsi qu'une dysbiose chez les animaux *Nod2*<sup>-/-</sup> suggérant une implication de la flore dans l'établissement du sur-risque observé chez les animaux déficients. L'administration d'une antibiothérapie à large spectre a conforté cette hypothèse en réduisant la susceptibilité des animaux *Nod2*<sup>-/-</sup>. Une analyse transcriptionnelle a été réalisée afin d'établir les mécanismes moléculaires associés à la colite en réponse au microbiote et a permis de mettre en cause l'IL-6 ainsi que ses gènes cibles déjà décrits pour leur caractère pro-tumoral. Implication confirmée

par inhibition de la voie IL-6 à l'aide d'un anticorps bloquant son récepteur capable de réduire la tumorigenèse. Enfin, la génération de souris axéniques *Nod2*<sup>-/-</sup> et leur recolonisation par une flore issue de souris sauvages a montré la possibilité d'inverser le sur-risque observé chez les *Nod2*<sup>-/-</sup>.

Pour conclure, dans un contexte déficient pour *Nod2*, une réponse inflammatoire à l'encontre du microbiote intestinal dépendante de l'IL-6 favoriserait la mise en place d'une flore délétère qui prédisposerait à la colite et au CAC. Le caractère transmissible de cette flore représente un outil pour l'étude des interactions avec le système immunitaire inné et adaptatif. Enfin, la mise en évidence de la ou des bactéries colitogènes ainsi que des mécanismes inflammatoires impliqués, permettra la mise au point de thérapies ciblées en vue de réduire la tumorigenèse associée à une inflammation persistante chez les patients atteints de la maladie de Crohn.

**Mots clés** : Maladie de Crohn, Cancer colorectal, NOD2, microbiote intestinal, dysbiose.

# Abstract

## Interactions between intestinal microbiota and the innate immunity receptor NOD2 in Crohn's disease and colorectal cancer

Crohn's disease is a multifactorial disease that could result from environmental or genetic factors and could also involve a deregulation of the immune response against the intestinal microbiota. Indeed, qualitative and quantitative variations of the gut microbiota can be detected in Crohn's patients or colorectal cancer patients. Moreover, the risk of colorectal cancer development is doubled in patients with Crohn's disease.

In this study, we focus on the role of the innate immunity receptor NOD2, whose polymorphisms predispose to Crohn's disease, and the influence of gut microbiota in the development of colitis and colorectal cancer.

A colitis model and colitis associated cancer (CAC) model in mice highlighted an increased susceptibility of *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> animals compared to WT animals suggesting that NOD2 and its adaptor protein RIP2 can protect from colitis and tumorigenesis.

To determine the origin of this increased risk observed in *Nod2* or *RIP2*-deficient animals we first checked the transmissibility of colitis. Co-housing and cross-fostering experiments showed a transmission of susceptibility associated with *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice in WT animals horizontally (by congeners) and vertically (by the mother). A systematic analysis of the microbiota in the CAC model showed a reduction of microbial diversity and a dysbiosis in *Nod2*<sup>-/-</sup> animals suggesting an involvement of the flora in increasing the risk observed in deficient animals. Administration of a broad-spectrum antibiotherapy has confirmed this hypothesis by reducing the susceptibility of *Nod2*<sup>-/-</sup> animals. A transcriptional analysis was performed to determine the molecular mechanisms associated with colitis in response to microbiota and highlighted IL-6 and its target genes, already described for their pro-tumoral effects. Involvement of IL-6 was confirmed by using an antibody blocking IL-6 receptor that can reduce tumorigenesis. Finally, the generation of germ free *Nod2*-deficient mice and recolonization by WT mice microbiota showed the ability to reverse the increased risk observed in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice.

To conclude, in a Nod2-deficient context, an IL-6-dependent inflammatory response directed against intestinal microbiota, promotes the establishment of pro-colitogenic microbiota and would predispose to colitis and CAC. The transmissibility of this flora may be itself a tool to study interactions between innate and adaptive immune systems. Finally, the identification of colitogenic bacteria and inflammatory mechanisms involved, will allow the development of therapies in order to reduce tumorigenesis associated with persistent inflammation in patients with Crohn's disease.

**Key words** : Crohn's disease, Colorectal cancer, Nod2, gut microbiota, Dysbiosis.



## Introduction générale

La muqueuse intestinale est caractérisée par sa capacité à tolérer les microorganismes commensaux tout en limitant l'intrusion d'agents infectieux. Cet équilibre complexe fait intervenir des mécanismes encore largement méconnus. Le dialogue entre le microbiote intestinal et le système immunitaire inné est récemment apparu comme participant à ces propriétés de surveillance et à la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) dont la maladie de Crohn (MC).

Avec une prévalence estimée à plus de un sujet pour 1000 dans la population occidentale, la MC représente un problème majeur de santé publique, et tout particulièrement dans la région Nord Pas de Calais. Des facteurs génétiques et environnementaux interviennent dans la physiopathologie de la MC qui touche plus particulièrement les jeunes adultes et pour laquelle seuls des traitements palliatifs sont disponibles. Si aucun agent infectieux responsable de cette pathologie invalidante n'a été identifié à ce jour, une altération des fonctions de la barrière intestinale est fréquemment observée chez ces patients. Près de la moitié sont porteurs d'au moins une mutation perte de fonction de NOD2 avec un défaut d'expression de certains peptides antimicrobiens [2, 3].

NOD2 est un récepteur cytosolique du muramyl dipeptide bactérien (MDP) connu pour ses propriétés adjuvantes [4]. La reconnaissance du MDP par NOD2 permet le recrutement intracellulaire et l'activation de kinases, comme la sérine-thréonine kinase RIP2 et le complexe IKK. Il est à noter que l'absence d'IKK $\gamma$  au niveau des entérocytes est associée à un développement spontané de lésions inflammatoires coliques et à une défaillance de la barrière intestinale [5]. Chez la souris, l'absence de NOD2 entraîne une susceptibilité accrue de la muqueuse intestinale à l'infection par certains entéro-pathogènes et un déficit d'expression iléale de certains peptides antimicrobiens, tels que les  $\alpha$ -défensines [4]. Ces données suggèrent que NOD2 joue un rôle important dans l'homéostasie intestinale et que l'altération de la reconnaissance par ce récepteur de fragments du peptidoglycane de certaines bactéries prédisposerait au développement de la MC.

Le tube digestif est en contact permanent avec des micro-organismes infectieux ou non, ce qui conditionne son intégrité et sa physiologie. Il représente un système essentiel de tolérance vis-à-vis des antigènes de la lumière intestinale et de défense contre l'entrée et la dissémination d'agents infectieux. Hautement conservés, les acteurs de l'immunité innée coordonnent l'homéostasie intestinale en limitant l'intrusion de pathogènes tout en tolérant la flore digestive et en réparant les lésions de la muqueuse intestinale. Le développement des lésions intestinales inflammatoires est également associé à des perturbations quantitatives et qualitatives du microbiote, communément appelées dysbioses. Le phylum des firmicutes, tout particulièrement l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*, est en effet, sous-représenté chez les patients atteints de MICI [6]. Ces observations suggèrent que certains composants de la flore digestive participeraient dans le développement de lésions inflammatoires chroniques chez des individus génétiquement prédisposés. Cependant, le rôle physiopathologique de NOD2 reste spéculatif. Il est à noter que la sévérité des lésions inflammatoires dans certains modèles expérimentaux de colites chez l'animal est modulée par l'inhibition de la signalisation des TLRs, soulignant le rôle clé du dialogue entre l'immunité innée et la flore digestive dans l'homéostasie intestinale [7, 8]. Le rôle physiopathologique de NOD2 dans la rupture de tolérance vis-à-vis de certains micro-organismes commensaux peut par conséquent être suspecté comme intervenant. Décrypter le dialogue complexe entre NOD2 et la flore digestive représente ainsi une approche pour mieux comprendre comment NOD2 contrôle la réponse immunologique de la muqueuse saine et lésée vis-à-vis du microbiote et comment restaurer la fonction altérée de NOD2 par le développement de nouvelles immunothérapies ciblant la réponse immunitaire innée intestinale et/ou la flore commensale.

Dans ce contexte, certains micro-organismes commensaux pourraient être suspectés comme pouvant intervenir dans le développement de la MC en réponse à une expression de *Nod2* défailante. Plusieurs questions restent néanmoins en suspens. Quel est le rôle de NOD2 sur le microbiote intestinal et quels mécanismes moléculaires associés à NOD2 pourraient contrôler la progression des lésions intestinales chroniques ?

Pour répondre à ces questions, la physiologie de NOD2 a été étudiée en partant de l'organisme dans sa globalité jusqu'au niveau moléculaire en vue de définir le rôle de NOD2 dans la régulation de la flore commensale intestinale et la progression des lésions intestinales chroniques.

Des données révèlent que l'activation de NOD2, suite à son exposition au MDP, est capable de réduire la sévérité des lésions inflammatoires intestinales dans deux modèles de colite expérimentale [9]. Dans un premier temps, la sévérité des lésions intestinales induites par exposition aiguë et chronique à un agent chimique a été évaluée chez les souris *Nod2*-déficientes en comparaison à des souris WT. Les signes cliniques de la maladie (perte de poids, diarrhée et saignement) et la morbidité associée ont été suivis prospectivement chez les animaux déficients ou non pour *Nod2*. Des mesures histologiques ont également été réalisées (infiltration de cellules inflammatoires et dommages de l'épithélium), ainsi que des analyses transcriptionnelles de l'expression des gènes caractéristiques de l'inflammation au niveau du tissu colique à des temps précoces et tardifs du développement des lésions inflammatoires.

Afin de déterminer la contribution de la flore intestinale de souris *Nod2*<sup>-/-</sup> dans un contexte WT, des transferts de flore ont été mis en place au laboratoire grâce à 2 méthodes précédemment publiées qui sont les transferts par cohébergement et par adoption [10]. Le développement de colite a été suivi chez ces animaux afin de déterminer si le transfert de flore *Nod2*<sup>-/-</sup> ou *Rip2*<sup>-/-</sup> était capable d'induire une susceptibilité accrue des animaux WT. De plus une analyse transcriptionnelle après transfert de flore en absence de lésion chimique a été réalisée afin d'identifier les gènes spécifiquement régulés par la flore issue de souris *Nod2*<sup>-/-</sup>.

En l'absence de pathogène spécifique, aucune inflammation spontanée n'a pu être observée chez les souris déficientes pour *Nod2*. Ces observations suggèrent une reconnaissance par NOD2 d'un sous-ensemble spécifique de micro-organismes de la flore commensale. La muqueuse intestinale est en étroite relation avec la flore intestinale, dont la composition peut varier d'un individu à l'autre, en fonction de son âge et de son environnement. Une analyse par pyroséquençage du microbiote provenant de souris wild type (WT) ou *Nod2*<sup>-/-</sup> a par conséquent été envisagée afin

d'étudier quels pourraient être les micro-organismes favorisant l'apparition de l'inflammation intestinale sans a priori.

Une manipulation sélective de la flore intestinale a été réalisée avec des antibiotiques à spectre varié, afin d'évaluer le rôle spécifique de certaines populations bactériennes et la contre-indication éventuelle de la prescription de certains antibiotiques chez des patients déficients pour NOD2. Une antibiothérapie à large spectre étant capable de réduire la susceptibilité des animaux WT et déficients pour *Nod2* à la colite, une analyse pangénomique d'expression de gènes de l'intestin a été réalisée en vue de déterminer quels mécanismes moléculaires pouvaient être modifiés en présence ou non de micro-organismes délétères. Cette analyse a permis de mettre en lumière l'implication de l'IL-6, cytokine inflammatoire, ce qui a pu être confirmé par l'inhibition de sa voie de signalisation par un anticorps bloquant.

Afin d'analyser la contribution de NOD2 dans la réponse de l'hôte à une flore intestinale issue d'animaux WT, des souris *Nod2*<sup>-/-</sup> axéniques ont été développées en partenariat avec le CDTA d'Orléans. Le développement de colites a également été suivi chez ces animaux axéniques recolonisés, afin d'évaluer le potentiel rôle compensateur de voies de signalisation de l'immunité innée induites par le microbiote et indépendantes de NOD2.

La seconde partie du projet vise à définir les mécanismes moléculaires au niveau des cellules résidant dans la muqueuse intestinale, par lesquels NOD2 participe à la fonction de tolérance et de barrière.

L'évaluation de son rôle intrinsèque au niveau des cellules épithéliales intestinales et des leucocytes de la muqueuse digestive pourra être effectué à l'aide d'un modèle d'étude *in vivo* approprié en rendant les souris invalidées pour *Nod2* alymphoïdes, afin de nous affranchir d'un effet des cellules de l'immunité adaptative. Pour cela des souris invalidées pour *Rip2* et *Rag2* $\gamma$ C ont été croisées entre elles, afin d'identifier une population lymphocytaire capable de prévenir le développement de colite en absence de la voie de signalisation de NOD2.

La régulation de la réponse immunitaire innée reste peu connue au niveau de la muqueuse intestinale limitant le développement de nouvelles immunothérapies pour

les MICI. Ce projet intègre plusieurs facettes de l'immunité innée depuis l'homéostasie intestinale aux interactions entre le microbiote et les facteurs de l'hôte. Par conséquent, ce projet vise à améliorer notre compréhension des interactions entre l'intestin et sa propre flore commensale. Cette approche globale cherche ainsi à révéler de nouveaux liens entre l'exposition microbienne, l'homéostasie des tissus et l'apparition des lésions inflammatoires chroniques dans la maladie de Crohn et le cancer colorectal. Enfin, cela pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies préventives et/ou curatives en manipulant les fonctions de NOD2 et de RIP2 *in vivo*.

# Chapitre 1 : Le tube digestif

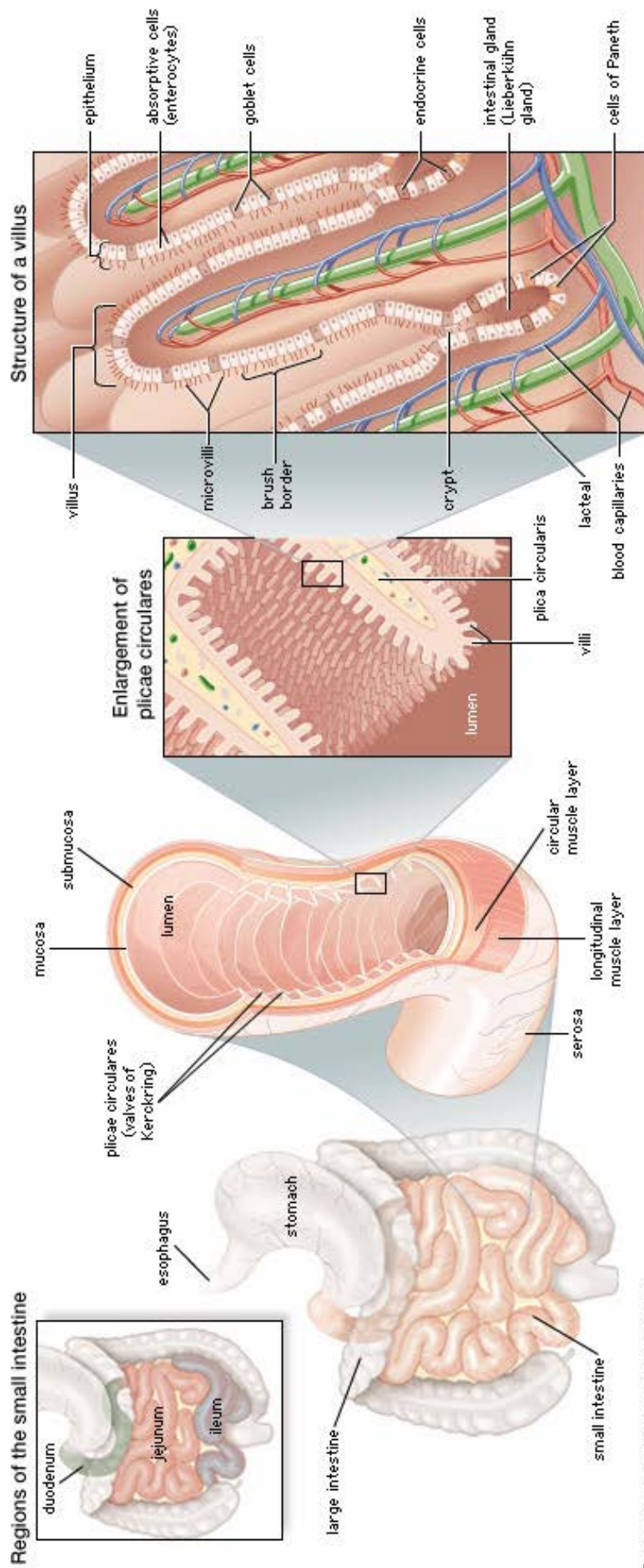
## 1. Structure du tube digestif

Chez l'Homme, le tube digestif est principalement impliqué dans la dégradation des aliments permettant leur absorption dans l'organisme. Mais du fait de sa continuité avec le milieu extérieur, le système gastro-intestinal est une entrée possible pour les micro-organismes. Ce système possède donc des dispositifs de défense regroupés sous le nom de tissus lymphoïde associé au tube digestif (pour « Gut-associated lymphoid Tissues » ou GALT).

L'appareil gastro-intestinal est constitué d'un tissu musculaire bordé d'une membrane muqueuse présentant des variabilités structurales en fonction de la zone du tube digestif de la bouche à l'anus. Ici nous nous intéresserons uniquement à la partie inférieure du tractus gastro-intestinal constitué de l'intestin grêle et du côlon (Figure 1). L'intestin grêle est constitué de trois parties. Le duodénum retrouvé à la sortie de l'estomac correspond à la partie initiale, le jéjunum est le segment moyen et l'iléon est la portion terminale de l'intestin grêle. De même le gros intestin est constitué d'une partie initiale appelée *caecum*, du côlon et d'une portion terminale, le rectum.

Le tube digestif possède quatre couches fonctionnelles. L'adventice ou séreuse, la couche la plus externe, est constituée d'un tissu conjonctif jouant un rôle de soutien. La musculuse, paroi musculaire constituée de cellules musculaires, participe aux contractions péristaltiques impliquées dans la progression des aliments lors de la digestion. La sous-muqueuse, couche de tissu de collagène permettant le soutien de la couche en contact avec la lumière intestinale, la muqueuse. Cette dernière se compose d'un épithélium unistratifié et d'un tissu conjonctif, la *lamina propria* [11].

L'intestin grêle étant le site principal d'absorption des produits de digestion, possède une structure lui permettant d'accroître sa surface d'absorption. La muqueuse présente des structures qui se projettent dans la lumière intestinale, les villosités ainsi que des invaginations, les cryptes intestinales ou glandes de Lieberkühn. Le gros intestin ayant un rôle dans la récupération d'eau et de sels à partir des résidus intestinaux possède une structure sous forme de glandes tubulaires droites serrées les unes contre les autres.



© 2003 Encyclopædia Britannica, Inc.

**Figure 1 : Anatomie de l'intestin [1].**

L'intestin est constitué de l'intestin grêle et du colon. La paroi de l'intestin est composée d'une couche séreuse, sous-muqueuse et muqueuse. Différents types cellulaires composent l'épithélium intestinal : les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules endocrines et les cellules de Paneth.

## 2. Composition cellulaire de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est composé de cellules provenant de la différenciation de cellules souches communes. Dans l'intestin grêle, les cellules souches intestinales sont situées dans les glandes de Lieberkühn alors que dans le côlon elles sont localisées à la base des cryptes. La différenciation de ces cellules souches est faite au cours de leur migration de la crypte au sommet de la villosité, pour former les différents types cellulaires composant l'épithélium intestinal (Figure 1).

Les cellules ainsi formées sont divisées en deux groupes en fonction de leur capacité d'absorption ou de sécrétion.

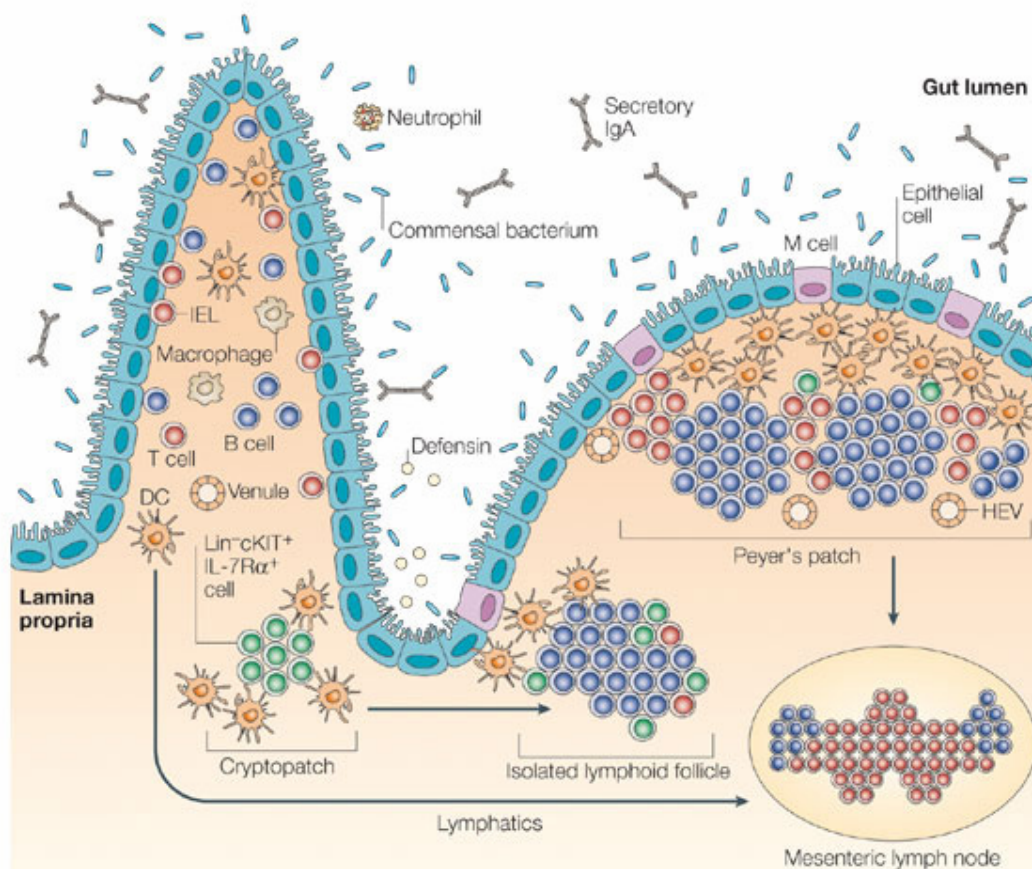
Les cellules les plus abondantes dans l'intestin sont les entérocytes, encore appelées colonocytes dans le gros intestin. Leur fonction est d'absorber les nutriments provenant de la dégradation des aliments sur leur face apicale et de les exporter du côté basal. Leur surface apicale est constituée de microvillosités, augmentant ainsi d'autant plus la surface d'échange. La production d'enzymes comme les hydrolases par ces cellules participent à leur capacité de digestion et elles forment une barrière entre le contenu intestinal et le corps grâce à la présence de jonctions serrées les reliant entre elles.

Les cellules sécrétrices regroupent plusieurs types cellulaires. Les cellules caliciformes représentent 4% de l'épithélium de l'intestin grêle et peuvent représenter plus de 16% de l'épithélium du côlon [12]. Elles interviennent dans la production et la sécrétion du mucus, couche protectrice à la surface de l'épithélium muqueux, constitué de glycoprotéines. Les cellules endocrines sont impliquées dans la production et sécrétion d'hormones et représentent quant à elles 1% des cellules intestinales. Les cellules de Paneth, spécifiques de l'intestin grêle, produisent et sécrètent des peptides antimicrobiens et des protéines spécifiques comme le lysozyme, impliqué dans la protection contre les micro-organismes pathogènes [13]. Contrairement aux autres cellules composant l'épithélium intestinal, elles complètent leur différenciation à la base des cryptes. Les cellules M (Microfold), un autre type cellulaire minoritaire retrouvé dans les follicules lymphoïdes, participent à la réponse immune en reconnaissant et en transportant les antigènes et les micro-organismes intestinaux [14].



### 3. Le système lymphoïde associé à l'intestin

L'intestin présente des tissus lymphoïdes mieux connus sous le nom de GALT ou MALT (Mucosa-associated lymphoid tissues). Ces tissus sont souvent divisés en deux catégories suivant si ils sont organisés, comme les plaques de Peyer (PP), les ganglions mésentériques (MLN ou Mesenteric Lymph Nodes), ou plus diffus comme c'est le cas des follicules lymphoïdes isolés (ILF), des cryptopatches, des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) ou des cellules mononuclées de la *lamina propria* (LPMC) [15].



**Figure 2 : Représentation schématique des GALT [16].**

Les tissus organisés des plaques de Peyer, des ganglions mésentériques, des ILF et des cryptopatches sont impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire alors que les sites effecteurs sont dispersés le long de l'épithélium et de la *lamina propria* de l'intestin. Les IEL détectent les dommages épithéliaux et les antigènes bactériens. Les LPMC produisent des IgA en réponse aux antigènes bactériens captés par les cellules dendritiques et dirigés aux ganglions par l'intermédiaire du système lymphatique.

Les GALT représentent un moyen de détection et de protection de l'hôte à l'encontre des agents exogènes tels que les bactéries et les antigènes alimentaires. Ces tissus sont des sites où les cellules B peuvent proliférer, être activées et se différencier afin

de produire des immunoglobulines A (IgA), procurant une protection en réponse aux antigènes du non-soi. (Figure 2)

### **3.1. Les plaques de Peyer**

Les plaques de Peyer sont retrouvées dans la membrane muqueuse de l'intestin grêle. Ce sont des organes lymphoïdes bien délimités composés de nombreux follicules lymphoïdes. Ces follicules comprennent un centre germinatif, composé principalement de lymphocytes B, entouré par des lymphocytes T, et des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques et les macrophages. Un dôme de cellules épithéliales, entre lesquelles sont enchâssées des cellules M, délimite le follicule. Les cellules M facilitent l'échantillonnage des antigènes intestinaux et constituent une porte d'entrée pour les micro-organismes qui seront pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes. Après stimulation antigénique, les lymphocytes B se différencieront en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines [17].

### **3.2. Les ganglions mésentériques**

Les ganglions mésentériques sont des structures lymphoïdes organisées, groupées aux jonctions des vaisseaux lymphatiques et contenant des lymphocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Les antigènes intestinaux sont apportés par la lymphe de l'épithélium et la *lamina propria* vers les ganglions mésentériques. La couche la plus externe de cet organe, le cortex, est essentiellement composée de lymphocytes B disposés en follicules lymphoïdes. Sous le cortex, se trouve le paracortex, principalement peuplé de lymphocytes T et de cellules dendritiques. Lorsqu'un antigène est amené par la lymphe dans les ganglions, il est capté par les cellules dendritiques et présenté aux cellules T pour induire leur différenciation.

### **3.3. Les autres GALT**

Les ILF et les cryptopatches sont des groupes de cellules lymphoïdes peu organisés de la *lamina propria*. Contrairement aux MLN et aux PP, ces structures ne se développent qu'après la naissance, lorsque l'intestin est colonisé par les bactéries. Les ILF jouent un rôle similaire à celui des plaques de Peyer mais ne contiennent qu'un seul follicule de cellules B ainsi qu'un faible nombre de cellules T et de cellules

dendritiques (DC). Les cryptopatches sont des petits regroupements de DC et de précurseurs de cellules T entre les cryptes intestinales. Elles se développeraient en ILF lorsqu'elles seraient exposées à des bactéries ou à des stimuli pro-inflammatoires. [16]

Les IEL et les LPMC sont des cellules lymphoïdes dispersées dans différentes régions du tractus gastro-intestinal. Les IEL sont enchâssés entre les cellules épithéliales alors que les LPMC sont retrouvés au niveau de la *lamina propria*. Ces deux populations cellulaires sont principalement composées de lymphocytes T impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale.

## **Chapitre 2 : L'immunité innée**

### **1. Généralités sur l'immunité**

Dès la naissance, nous sommes exposés à une multitude de micro-organismes et d'éléments exogènes. Sans protection efficace, notre organisme serait sujet à diverses pathologies en réponse à ces micro-organismes et substances étrangères. Ainsi, il existe un système complexe de mesures permettant une protection, appelé système immunitaire.

L'immunité se décompose en deux parties, l'immunité innée et l'immunité adaptative, agissant ensemble pour prendre en charge et éliminer les agents indésirables.

L'immunité innée est un ensemble de mesures non spécifiques, mise en place très rapidement à l'encontre des agents exogènes alors que l'immunité acquise est mise en place dans les 5 à 6 jours après l'intrusion du micro-organisme avec un haut degré de spécificité.

Ces deux subdivisions de l'immunité font intervenir une composante cellulaire et humorale.

En général, après détection d'un micro-organisme, son élimination non spécifique sera assurée par une réponse cellulaire faisant intervenir des cellules phagocytaires comme les cellules dendritiques et les macrophages. En cas d'échappement du micro-organisme aux mécanismes naturels alors l'immunité acquise va se déclencher en réponse à des signaux moléculaires (cytokines et chimiokines). L'immunité innée et l'immunité acquise n'agissent pas de façon indépendante. En effet, elles coopèrent en vue de produire une réponse plus efficace.

### **2. Barrières de l'immunité innée**

Les barrières physiques et anatomiques représentent la première ligne de défense non spécifique du corps humain. De part leurs structures, la peau et les muqueuses constituent une barrière empêchant l'entrée d'agents exogènes dans l'organisme. Dans le cas où cette barrière serait rompue, par exemple dans le cas d'une lésion, elle constituerait un point d'entrée possible pour l'intrusion d'agents infectieux. La surface de la peau et les muqueuses peuvent produire des sécrétions muqueuses comme les larmes, la salive et le mucus, participant elles aussi au maintien de la

barrière. Ces sécrétions agissent de façon mécanique, et chimique, par la production de substances antibactériennes.

Dans l'intestin, la muqueuse est recouverte de cils à la surface des cellules épithéliales, permettant de rejeter les pathogènes dans le mucus. Il existe également une barrière microbienne. En effet, les muqueuses sont colonisées par des bactéries (flore commensale ou microbiote) entrant en compétition avec les pathogènes afin d'empêcher leur liaison aux cellules épithéliales et l'invasion dans la muqueuse.

De plus, les conditions de pH ou encore de température représentent aussi des barrières physiologiques contre les micro-organismes. Le pH acide du sébum à la surface de la peau et le pH gastrique faible limitent l'implantation bactérienne.

### **3. La réaction inflammatoire**

La réaction inflammatoire est un des modes de réponse les plus fréquents de l'organisme face à une agression. Elle peut être provoquée par des causes infectieuses (bactérienne, virale, parasitaire), immunologiques, tumorales, physiques (intervention chirurgicale, brûlure) ou encore chimiques (microcristaux).

Un dommage tissulaire permettant l'entrée dans l'organisme d'un agent exogène induit une réponse inflammatoire caractérisée par 4 paramètres : Douleur, chaleur, tumeur et rougeur. Ces paramètres reflètent les événements principaux de la réponse inflammatoire qui sont la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité capillaire permettant l'influx sanguin ainsi que la margination et la diapédèse des leucocytes à travers la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins, qui migreront au niveau du site de l'inflammation. Cette réponse inflammatoire implique également des cellules immunitaires capables de phagocytose, comme les cellules dendritiques et les macrophages, constituant une barrière phagocytaire impliquée dans la capture de pathogènes par des mécanismes d'endocytose ainsi que dans la production de médiateurs solubles permettant le recrutement cellulaire.

### **4. Les médiateurs de l'immunité**

Le développement d'une réponse immunitaire efficace implique de nombreux types cellulaires. Les interactions entre ces cellules sont médiées par un groupe de protéines, les cytokines. Sécrétées par la majorité des cellules, et plus particulièrement celles du système immunitaire, elles interviennent dans le

développement de réponse immunitaire cellulaire et humorale, la régulation de l'hématopoïèse, le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire et, enfin, la cicatrisation. Les cytokines agissent généralement localement par des modes de communication autocrines et paracrines mais parfois elles peuvent agir à distance en exerçant ainsi une action endocrine. Elles se lient à des récepteurs spécifiques situés à la membrane de leurs cellules cibles, et déclenchent la transduction de signaux qui modifient l'expression des gènes de ces cellules.

Les cytokines sont classées en 4 grandes familles qui sont : les cytokines de classe I (ou hématopoïétines), les cytokines de classe II ou interférons, les facteurs de nécrose tumorale (TNF pour Tumor Necrosis Factor) et les chimiokines.

Plus couramment, les cytokines sont subdivisées en deux sous parties : les cytokines conduisant à l'inflammation, dites pro-inflammatoires, et celles participant à l'inhibition de l'inflammation dites anti-inflammatoires. Cependant, rares sont les cytokines ayant des propriétés exclusivement pro- ou anti-inflammatoires et leur effet dépend du contexte cellulaire et moléculaire. Malgré cela, les cytokines présentent des propriétés soit pro- soit anti-inflammatoires plus prononcées permettant de les classer dans l'un ou l'autre groupe.

#### **4.1. Les cytokines pro-inflammatoires**

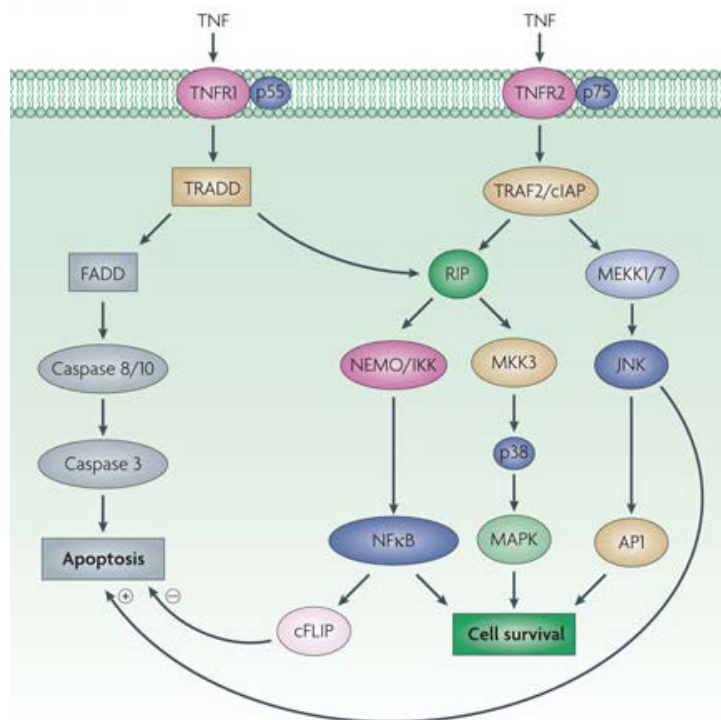
##### **4.1.1. Le Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

Premièrement décrit comme facteur inducteur de nécrose des cellules cancéreuses [18], le TNF $\alpha$  est la cytokine la plus étudiée de la superfamille du TNF, qui comprend plus de 40 membres. Les sources cellulaires principales du TNF $\alpha$  sont les monocytes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales stimulées et il peut également être sécrété par les lymphocytes T et B, les mastocytes et les kératinocytes. Sa synthèse est principalement induite par les endotoxines bactériennes, l'IL-1 ou encore l'IL-17. Le TNF $\alpha$  est synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif ancré à la membrane. Pour acquérir son activité le TNF $\alpha$  doit être clivé par la métalloprotéase TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme) [19]. Le TNF $\alpha$  ainsi sécrété forme des multimères de 2, 3 ou 5 unités qui peuvent être glycosylées ou phosphorylées, reliées entre-elles par des liaisons non covalentes [20]. Son activité biologique est principalement centrée sur l'inflammation où il joue un rôle clé dans

l'initiation des réactions inflammatoires de l'immunité innée en induisant la production de cytokines et en activant l'expression de molécules d'adhésion.

Deux récepteurs sont capables de fixer le  $TNF\alpha$ , le TNFR1 et le TNFR2, qui diffèrent par leur domaine intracellulaire et par conséquent activent des voies de signalisation différentes.

Le TNFR1 possédant un domaine intracellulaire de mort (ou death domain), recrute en premier lieu la protéine TRADD (TNFR1-associated death domain protein) et FADD (Fas-associated death domain protein) conduisant à l'activation des caspases-8 et -3, impliquées dans l'apoptose. D'autre part le TNFR1 est également un activateur de l'expression génique par le recrutement indirect de TRADD qui permet le recrutement du médiateur RIP1 (Receptor-interacting protein 1) conduisant à l'activation de  $NF-\kappa B$  et de la voie des MAPK.



**Figure 3 : Voie de signalisation du TNF [21].**

TNFR1 et TNFR2 recrutent TRAF2, induisant l'activation de  $NF-\kappa B$ , des MAP kinase de AP1, augmentant ainsi l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et la survie cellulaire. TNFR1 peut également entraîner l'apoptose par le recrutement de TRADD puis de FADD, qui comprennent des domaines de mort, responsables de l'activation de caspases pro-apoptiques.

Au contraire, la liaison du  $TNF\alpha$  au TNFR2 conduit au recrutement direct des protéines TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) et TRAF1 (TNF receptor-associated factor 1) en vue de l'activation de  $NF-\kappa B$  (Nuclear Factor-*kappa* B) et de

la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) ou bien de AP-1 (Activator protein 1) [22].(Figure 3)

#### **4.1.2. L'interleukine 1 (IL-1)**

La famille de l'IL-1 est composée de nombreux membres dont l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18. Ces cytokines sont sécrétées par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales, les kératinocytes et les fibroblastes [23]. Ces cytokines sont impliquées dans la réponse des cellules hôte à une infection.

Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs nécessitant une maturation par clivage enzymatique pour être actives. Ainsi, l'IL-1 $\alpha$  est clivée par la calpaïne [24] alors que l'IL-1 $\beta$  [25] et l'IL-18 [26] sont maturées par la caspase-1. Deux récepteurs peuvent lier l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . L'IL-1R1 est capable d'induire la transduction du signal. En revanche, le récepteur IL-1R2, qui ne possède pas de domaine intracellulaire effecteur joue, lui, un rôle de régulateur négatif de l'activité des IL-1 [27]. L'IL-18, quant à elle, exerce son action en se fixant sur l'IL-18R. Ces récepteurs induisent des voies de transduction conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et à l'activation de MAP kinases. L'activation de ces voies conduit à la synthèse de la cyclooxygénase 2 (*Cox-2* encore appelée prostaglandine endoperoxydase synthase 2 ou *Ptgs2*), de la phospholipase A et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) responsables de la formation de monoxyde d'azote, de la prostaglandine E2 (PGE2) et du facteur activateur de plaquettes [23]. Ces composés sont impliqués dans l'apparition de fièvre et de douleurs ainsi que dans la vasodilatation des capillaires sanguins durant l'inflammation. L'IL-1 joue également un rôle dans l'expression de chimiokines afin de promouvoir l'infiltration des cellules immunitaires dans les tissus lésés.

#### **4.1.3. L'interleukine 6 (IL-6)**

##### **4.1.3.1. Généralités**

L'interleukine 6 est une cytokine intervenant dans la régulation de processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'activation de gènes intervenant dans la réponse immune, l'hématopoïèse, la réponse de phase aiguë et l'inflammation.

Elle est produite par de nombreux types cellulaires tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les fibroblastes, les kératinocytes



et les cellules endothéliales [28] et exerce son action sur différents types de cellules cibles (pléiotropisme) par l'intermédiaire de son système de deux récepteurs composés de l'interleukine 6 récepteur (IL-6R) et la glycoprotéine 130 (gp130).

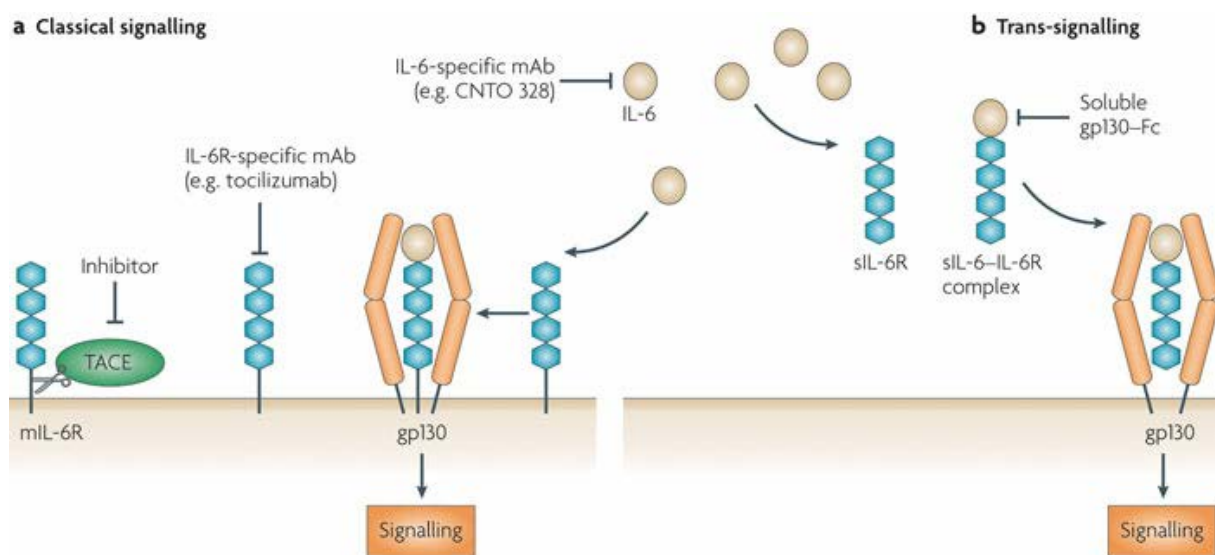
La liaison de l'IL-6 à ses récepteurs suivie de leur dimérisation induit l'activation de JAK (Janus kinase) qui activera STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) par phosphorylation. Une fois phosphorylé, STAT formera un dimère capable de pénétrer dans le noyau cellulaire afin d'y exercer son rôle de facteur de transcription [29]. La voie de signalisation JAK/STAT ainsi activée permettra la régulation de l'expression de gènes de l'inflammation.

#### **4.1.3.2. Récepteurs et inhibition pharmacologique de l'IL-6**

La signalisation de l'IL-6 est assurée par l'intermédiaire de la gp130 ubiquitaire et de l'IL-6R exprimé par les cellules hématopoïétiques et les hépatocytes. Cette cytokine peut également être reconnue par une forme soluble de l'IL-6R (sIL6-R) générée par épissage alternatif de l'ARNm de l'IL6-R ou par clivage protéolytique de la forme membranaire (mIL-6R) par la métalloprotéase TACE. Deux mécanismes différents d'activation de la signalisation de l'IL-6 font intervenir la forme membranaire ou soluble de l'IL-6R : respectivement la voie de signalisation classique et la voie de trans-signalisation [30] (Figure 4).

Classiquement, la fixation de l'IL-6 au mIL6-R permet le recrutement de deux chaînes de gp130 indispensables à la transduction du signal. Dans le mécanisme de trans-signalisation, l'IL-6 forme un complexe avec le sIL-6R avant de se fixer à deux chaînes de gp130 membranaires.

Différents agents pharmacologiques peuvent être utilisés pour inhiber l'une ou l'autre de ces voies. La neutralisation de l'IL-6 par un anticorps est capable de bloquer la voie classique et la trans-signalisation en interférant dans la liaison de l'IL-6 à l'IL-6R que ce dernier soit membranaire ou soluble. L'anticorps anti-IL-6R, lui, interfère dans la liaison de l'IL-6 à l'IL-6R et bloque également les 2 voies de signalisation mais va conduire à une accumulation d'IL-6. Enfin le sgp130Fc, fragment Fc soluble de la gp130, n'inhibe que la trans-signalisation par inhibition compétitive du gp130 membranaire sans interférer dans la voie classique car l'accès du sgp130Fc à l'IL-6 est réduit lorsqu'elle est fixée au complexe IL-6R/gp130 [31].



**Figure 4 : Signalisation et trans-signalisation de l'IL-6 [30].**

a. L'IL-6 effectue sa signalisation, de façon classique par l'intermédiaire des récepteurs IL-6R et gp130. b. Le sIL-6R, forme soluble de l'IL-6R, peut être libéré suite au clivage de la forme membranaire du récepteur (mIL-6R) et former un complexe avec l'IL-6 qui pourra alors se lier aux récepteurs gp130 et conduire à la trans-signalisation de cette cytokine.

Ces deux voies de signalisation peuvent être bloquées par des anticorps neutralisant soit l'IL-6, soit l'IL-6R. La trans-signalisation de l'IL6 peut être spécifiquement neutralisée par le sgp130Fc.

#### 4.1.3.3. Activités inflammatoires de l'IL-6

Une inflammation aiguë est caractérisée dans un premier temps par une infiltration de neutrophiles sur le site de lésion. Les cellules endothéliales sont activées par l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-6 en vue de produire des chimiokines participant au processus d'attraction des neutrophiles.

Dans un deuxième temps, le clivage protéolytique de l'IL-6R par les neutrophiles infiltrés conduit à l'activation de la trans-signalisation de l'IL-6. L'activation de cette voie permet la suppression des chimiokines attirant les neutrophiles comme CXCL1, CXCL8 et CX3CL1 en faveur de la production de chimiokines attractantes pour les monocytes comme CCL2, CXCL5 et CXCL6. En effet, une accumulation trop importante de neutrophiles dans le tissu lésé pourrait entraîner des dommages dus à leur production de protéases et d'espèces réactives oxygénées (ou ROS Reactive oxygen-species). Cette signalisation permet également d'augmenter la régulation des molécules d'adhésion cellulaires comme l'ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1), la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), la E-sélectine et la L-sélectine.

De plus, la trans-signalisation de l'IL-6 réduit l'apoptose des lymphocytes T en régulant la transcription de régulateurs apoptotiques comme Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) et Fas (Apoptosis Stimulating Fragment). L'IL-6 est aussi impliquée dans la différenciation des lymphocytes T et B et augmente la production d'Ig par cette dernière population.

L'IL-6 joue un rôle important dans la transition de l'immunité innée vers l'immunité acquise. Suite à l'activation par des cellules présentatrices d'antigènes, les cellules T-helper (Th) naïves peuvent se différencier en différentes sous populations. Ainsi, l'IL-6 peut induire l'activation de sous populations pro-inflammatoires comme les Th17 ou inhiber l'activation de la population T régulatrice (Treg) anti-inflammatoire [32].

Malgré ses effets pro-inflammatoires, l'IL-6 peut exercer un rôle anti-inflammatoire notamment en inhibant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le  $TNF\alpha$  ou l' $IFN\gamma$  (Interféron  $\gamma$ ) [33, 34]. Par ailleurs, l'IL-6 induit la synthèse de glucocorticoïdes et du récepteur soluble du TNF, contribuant à la résolution de l'inflammation [35]. L'activation de la voie classique de signalisation permet également la prolifération et l'inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales. Enfin, l'IL-6 est également impliquée dans la régulation du métabolisme dans le foie et la maintenance de l'homéostasie osseuse [32].

## **4.2. Les Cytokines anti-inflammatoires**

### **4.2.1. L'interleukine 10 (IL-10)**

L'IL-10 est une cytokine possédant des effets anti-inflammatoires nets. Acteur principal des cytokines de la famille de l'IL-10, contenant entre autres l'IL-22, elle est le seul membre à avoir des propriétés anti-inflammatoires. Les sources principales d'IL-10 sont les monocytes, les macrophages et les sous populations de lymphocytes T régulateurs. Mais les cellules dendritiques, les cellules B, les cellules Natural Killer (NK), les mastocytes, les neutrophiles ainsi que les éosinophiles synthétisent également de l'IL-10 [36]. L'activité pléiotropique de l'IL-10 est médiée par le récepteur IL-10R composé de deux chaînes, IL-10R1 et IL-10R2 activant la voie de signalisation JAK/STAT.

L'IL-10 influence 3 fonctions importantes des monocytes et macrophages : la présentation antigénique, la libération de médiateurs solubles de l'immunité, et la

phagocytose. En effet, l'IL-10 inhibe l'expression du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II et la production des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-6 et le  $TNF\alpha$  [37]. En complément, l'IL-10 conduit à la libération des récepteurs du TNF dans la circulation systémique en diminuant leur localisation membranaire [38]. A côté de son rôle anti-inflammatoire, l'IL-10 induit aussi la synthèse d'Ig par les lymphocytes B [39].

Les souris KO pour l'IL-10 développent spontanément une inflammation chronique de l'intestin [40], montrant l'importance de l'activité de l'IL-10 dans la régulation négative de la réponse inflammatoire.

#### **4.2.2. Le Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

Le TGF- $\beta$  est une cytokine possédant trois isoformes humaines, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3, de structures très similaires, codées par trois gènes distincts. Elles sont synthétisées par de nombreux types cellulaires comme les plaquettes, les macrophages, les fibroblastes ou les cellules tumorales, sous forme d'un précurseur latent (LTGF- $\beta$  pour latent TGF- $\beta$ ) qui requiert une maturation par la furine [41].

La signalisation du TGF- $\beta$  contrôle une variété de processus cellulaires dont la prolifération, la reconnaissance, la différenciation et l'apoptose. Le TGF- $\beta$  initie sa signalisation en se liant à un récepteur à la surface cellulaire composé d'une chaîne de type I et d'une chaîne de type II (T $\beta$ RI et T $\beta$ RII) et ayant une activité de type serine/thréonine kinase. Ceci permet au récepteur de type II de phosphoryler le domaine kinase du récepteur I qui pourra alors propager le signal par phosphorylation des protéines Smad (Mothers against decapentaplegic homolog) capables de se dimériser afin d'être transloquées dans le noyau, et moduler l'expression de gènes cibles [42]. Le TGF- $\beta$  favorise la dégradation des MMP ainsi que l'expression d'inhibiteurs de protéases [35]. Il inhibe la production d'IL-8 par les cellules endothéliales et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et le  $TNF\alpha$  par les monocytes et macrophages. Le TGF- $\beta$  est largement sécrété par les macrophages phagocytant les neutrophiles apoptotiques, inhibant ainsi le recrutement et l'activation de nouveaux leucocytes.

### **4.3. Les Chimiokines**

Les chimiokines sont des cytokines de 8 à 10 kDa sécrétées douées d'un pouvoir chimiotactique envers les cellules avoisinantes. Elles contrôlent sélectivement, l'adhésion, la chimiotaxie et l'activation de nombreux types de cellules immunitaires dont les leucocytes. Par conséquent, elles régulent le trafic cellulaire.

Les chimiokines possèdent quatre résidus cystéines et sont divisées en 4 familles en fonction de la position de ces résidus. Les chimiokines du groupe C possèdent une seule paire de cystéines, le groupe CC présente 2 paires de cystéines contiguës, celles du groupe CXC présentent des cystéines séparées par un acide aminé et enfin le groupe CX3C présente 2 paires de cystéines séparées par 3 acides aminés. L'action des chimiokines est médiée par des récepteurs à sept domaines transmembranaires. La transduction d'un signal par ces récepteurs entraîne l'activation des intégrines leucocytaires permettant leur adhésion aux parois endothéliales ainsi que la libération des granules des neutrophiles, macrophages, basophiles et éosinophiles. Les chimiokines sont produites en réponse à des stimuli provenant de pathogènes ou de l'hôte. Elles vont créer un gradient chimioattractant pour les leucocytes afin de les conduire sur le site de l'inflammation et vont relier l'immunité innée et acquise [43, 44].

## **5. Les Récepteurs de l'immunité innée : Les Pattern Recognition Receptors (PRR)**

Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense à l'encontre des micro-organismes. Les pathogènes possèdent des motifs moléculaires conservés appelés PAMP (Pathogen-associated Molecular Patterns) qui sont reconnus par des récepteurs de l'immunité innée appelés PRR (Pathogen Recognition Receptors). Ces récepteurs sont aussi impliqués dans la reconnaissance de signaux de danger non microbiens appelés DAMP (Damage-associated Molecular Patterns) comme par exemple les cristaux d'acide urique, les protéines de choc thermique (HSP ou Heat shock proteins) et l'ATP (Adenosine triphosphate). La reconnaissance de DAMP et PAMP par les PRR conduit à l'activation de voies de signalisation intervenant dans l'inflammation et la réponse anti-microbienne. Les PRR possèdent également un rôle dans l'opsonisation, l'activation du complément et des cascades de coagulation, la phagocytose et

l'induction de l'apoptose [45]. Ils sont divisés en plusieurs grandes familles : les Toll-like receptors (TLR), les Nod-like receptors (NLR), les RIG-I-like receptors (RLR) et les C-type lectin receptors (CLR). Seuls les TLR et les NLR seront décrits ici.

### **5.1. Les Toll Like Receptors (TLR) : Récepteurs membranaires**

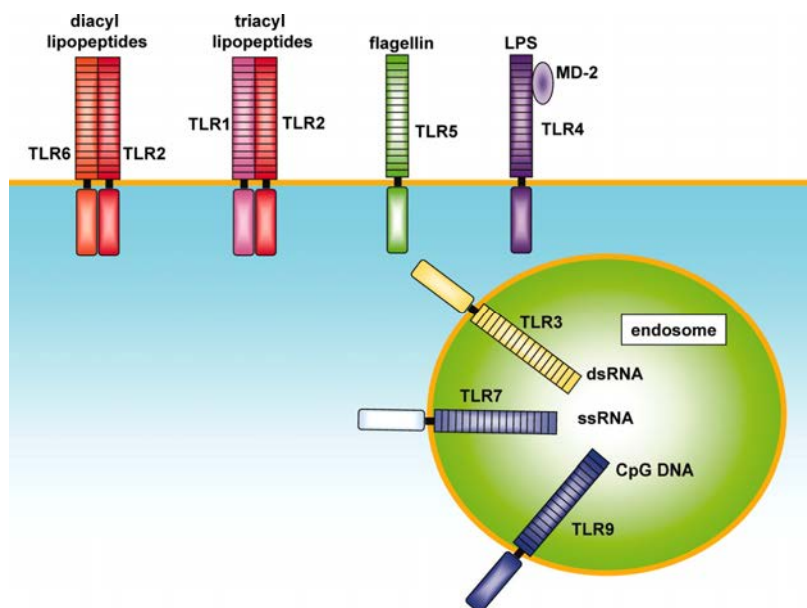
La découverte de la famille des TLR a commencée avec l'identification de Toll, un récepteur exprimé par les insectes essentiel à l'établissement de la polarité dorsoventrale durant l'embryogenèse [46]. Plus tard, des études ont révélé l'implication de Toll dans la réponse immunitaire innée chez l'insecte lors d'infections fongiques [47]. Depuis, TLR4, l'homologue humain de Toll, a été identifié chez le mammifère ainsi que 10 autres TLR humains et 13 TLR murins constituant ainsi la famille des TLR [48].

#### **5.1.1. Structure des TLR**

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires de type I, caractérisés par un domaine extracellulaire riche en leucines (Leucine-Rich repeat LRR) et un domaine intracellulaire effecteur TIR (Toll/IL-1 receptor).

Le domaine extracellulaire des TLR contient 19 à 25 copies du motif LRR composées chacune de 24 à 29 acides aminés dont de nombreuses leucines. Le domaine LRR forme une structure en fer à cheval impliqué dans la reconnaissance de PAMP. Les TLR et les IL-1R partagent une queue cytoplasmique dont la structure est conservée et constituée d'environ 200 acides aminés, le domaine TIR. Ce domaine comporte 3 boîtes homologues qui sont cruciales pour la signalisation car elles interviennent dans la capacité des TLR à interagir avec des protéines adaptatrices [49].

La localisation cellulaire des TLR est corrélée à la localisation des ligands qu'ils sont capables de reconnaître. Ainsi, les TLR3, 7, 8 et 9 qui sont impliqués dans la reconnaissance d'acides nucléiques, sont localisés à la surface des organites intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, les lysosomes et les endosomes. Au contraire les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10, reconnaissent des produits bactériens spécifiques, sont exprimés à la membrane cellulaire. (Figure 5)



**Figure 5 : Localisation des TLR [50].**

Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont localisés à la surface des cellules, associés à la membrane alors que les TLR 3, 7 et 9 sont en position intracellulaire associés à la membrane des organites cellulaires tels que les endosomes.

### 5.1.2. Ligands des TLR

<i>TLR</i>	<i>Ligand</i>	<i>Origine du ligand</i>
TLR1	Lipopeptides triacylés, facteurs solubles	Bactéries et mycobactéries
TLR2	Lipoprotéines, PGN, LTA, lipoarabinomannane, zymosan	Bactéries Gram positives Mycobactéries, champignons
TLR3	ARN double brin	Virus
TLR4	LPS, protéines d'enveloppe virales	Bactéries Gram négatives, virus
TLR5	Flagelline	Bactéries flagellées
TLR6	LTA, lipopeptides triacylés, zymosan	Bactéries Gram positives, Mycoplasmes, champignons
TLR7	ARN simple brin, Imidazoquinoline	Virus, composé synthétique
TLR8	ARN simple brin, Imidazoquinoline	Virus, composé synthétique
TLR9	ADN CpG non méthylé	Bactéries et virus
TLR10	Non déterminé	Non déterminé
TLR11	Non déterminé, molécules de type profiline	Bactéries uropathogènes, Toxoplasma gondii

**Tableau 1 : Les TLR et leurs ligands (adapté d'après Akira et Takeda, Nat Rev Immunol 2004 [49])**

Selon leur localisation cellulaire, les TLR vont détecter des ligands de nature différente. Les TLR insérés dans la membrane plasmique (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11) reconnaissent des molécules libérées ou exprimées à la surface des micro-organismes alors que les TLR présent au niveau des endosomes (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) vont reconnaître des acides nucléiques ou des molécules libérés après la dégradation des micro-organismes dans des vésicules intracellulaires (endosomes ou lysosomes).

Bien que la structure du domaine LRR soit conservée entre les différents TLR, il est capable de reconnaître des ligands variés. Ainsi, TLR1, 2 et 6 reconnaissent des composants de la paroi des bactéries Gram positives comme l'acide lipoteichoïque

(LTA) et le peptidoglycane (PGN), TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des bactéries Gram négatives et TLR5 détecte la flagelline, constituant des flagelles bactériens. Les TLR3, 7, 8 et 9 sont des récepteurs des acides nucléiques et de leurs dérivés. Notamment, TLR3 lie l'ARN double brin, TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin et TLR9 l'ADN viral [51, 52].(Tableau 1)

### **5.1.3. Voies de signalisation des TLR**

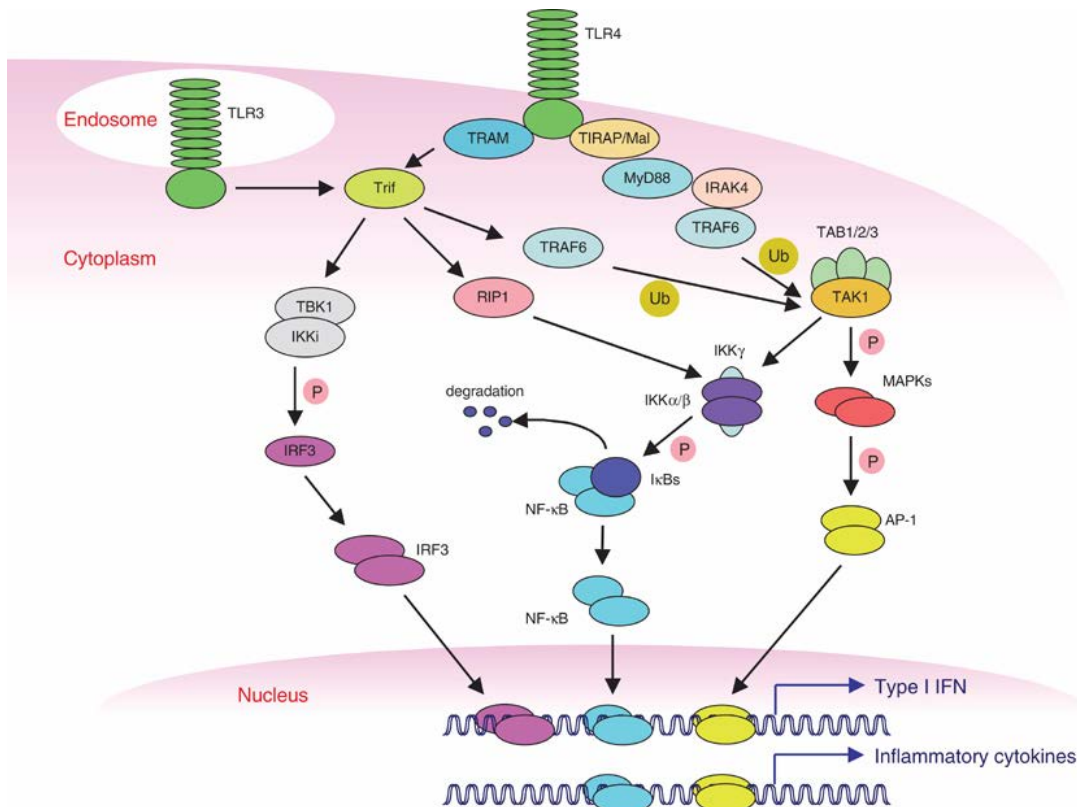
Une fois leurs ligands reconnus, les TLR induisent l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans la défense de l'hôte. Ceux-ci incluent les cytokines et les chimiokines inflammatoires, les peptides antimicrobiens, les molécules de co-stimulation, les molécules du CMH, ainsi que d'autres effecteurs permettant à l'hôte de lutter contre les pathogènes [53]. Les TLR activent ces gènes par l'intermédiaire de voies de signalisation utilisant diverses molécules adaptatrices qui déterminent en partie la spécificité de la réponse. La réponse aux TLR est classée selon l'implication ou non de la voie de signalisation dépendante de MyD88 (Myeloid Differentiation 88).

#### **5.1.3.1. La voie dépendante de MyD88**

MyD88, l'adaptateur utilisé par tous les TLR à l'exception de TLR3, interagit avec leur domaine TIR puis recrute et active la kinase IRAK-4 (IL-1R associated kinase 4) par l'intermédiaire de son domaine de mort. Cette liaison permet la phosphorylation et le recrutement d'IRAK-1 qui interagira à son tour avec TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6). Le complexe IRAK-1/TRAF6 se dissocie alors du récepteur pour interagir avec les kinases JNK (c-Jun N-terminal kinase) et IKK (inhibitor of  $\kappa$ B kinase). Cette interaction permet ensuite l'activation de la kinase p38 et des facteurs de transcription AP-1 (Activator protein-1) et NF- $\kappa$ B [51].

Il faut noter que la liaison de MyD88 aux TLR peut se faire de façon directe ou indirecte. Dans le cas de TLR2 et TLR4 la protéine TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein encore appelé Mal pour MyD88-adaptor-like) peut servir de protéine adaptatrice à MyD88 pour la transduction du signal [54, 55]. (Figure 6)





**Figure 6 : Les voies de signalisation des TLR [56]**

L'activation du TLR4 par le LPS engendre deux voies de signalisation distinctes : une voie dépendante de MyD88 conduisant à la translocation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et à l'activation des MAP kinases, l'autre indépendante de MyD88, conduisant à l'activation tardive de NF- $\kappa$ B et à la translocation d'IRF3 (IFN regulatory factor 3).

### 5.1.3.2. La voie indépendante de MyD88













MyD88 est essentiel pour la production de cytokines en réponse à des molécules bactériennes. Pourtant, le LPS, composant majeur de la paroi des bactéries Gram négatives, est capable d'induire l'activation de NF- $\kappa$ B et de JNK dans des macrophages dépourvus de MyD88 par l'intermédiaire de TLR4 [57]. Ceci indique l'existence d'une voie de signalisation du LPS, indépendante de l'adaptateur MyD88. La protéine TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\gamma$ ) est l'adaptateur de cette voie [58]. Le TLR4 n'interagit pas directement avec TRIF mais par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice TRAM (TRIF-related adaptor molecule) [59]. TRIF pourra alors interagir d'une part avec TRAF6, conduisant à l'activation de NF- $\kappa$ B. D'autre part, TRIF peut interagir avec TBK-1 (TANK-binding kinase 1) en vue de l'activation du facteur de transcription IRF3 (IFN regulatory factor 3), responsable de l'expression du gène codant l'IFN $\gamma$  [60].

## **5.2. Les *Nod Like Receptors (NLR)* : Récepteurs cytoplasmiques**

Contrairement aux TLR, les NLR sont des récepteurs intracellulaires qui ne sont pas associés à des membranes, retrouvés dans le compartiment cytosolique. Les NLR ont été identifiés dans les plantes où ils jouent un rôle important dans la résistance à l'encontre des pathogènes, puis des homologues ont été identifiés chez les vertébrés. Il existe 23 NLR chez l'Homme et 34 NLR chez la souris [61]. Ces récepteurs sont exprimés majoritairement par les cellules immunitaires mais également par les cellules épithéliales.

### **5.2.1. Structure des NLR**

Les NLR sont des protéines composées de plusieurs domaines dont la nature varie en fonction des récepteurs. La région située en C-terminal de la protéine est constituée, la plupart du temps, par un domaine LRR permettant la reconnaissance de motifs bactériens de la même façon que les TLR. Un domaine central NACHT est impliqué dans l'oligomérisation des NLR suite à la reconnaissance d'un ligand. Enfin, un domaine N-terminal variable suivant les NLR définit les cinq sous familles de ces récepteurs. La plupart de ces récepteurs possèdent un ou deux domaine(s) CARD (Caspase-activation and recruitment domain) ou un domaine pyrine (PYD). D'autres NLR présentent un domaine BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis domain) comme NAIP (Baculoviral IAP repeat-containing protein) ou des domaines moins caractérisés comme pour les récepteurs NLRX1, NLRC3 et NLRC5. Enfin, le récepteur CIITA possède à la fois un domaine CARD et un domaine activateur (AD). Ces différents domaines participent à la spécificité fonctionnelle de chaque NLR en permettant le recrutement de protéines adaptatrices [62]. L'initiale du nom de ces domaines est retrouvée dans le nom des sous familles de NLR. Ainsi, les NLR regroupent les sous familles NLRC (encore appelée NOD), NLRP (ou NALP pour NACHT, LRR and PYD domains-containing protein), NLRB (ou NAIP), NLRA et NLRX. (Figure 7)

NLR Family	Symbol	Structure
NLRA	<i>CIITA</i>	
NLRB	<i>NAIP</i>	
NLRC	<i>NOD1</i>	
	<i>NOD2</i>	
	<i>NLRC3/5</i>	
	<i>NLRC4 (IPAF)</i>	
NLRP	<i>NLRP1</i>	
	<i>NLRP2-9</i>	
	<i>NLRP11-14</i>	
	<i>NLRP10</i>	
NLRX	<i>NLRX1</i>	
		

**Figure 7 : Représentation schématique des récepteurs de la famille des NLR [63].**

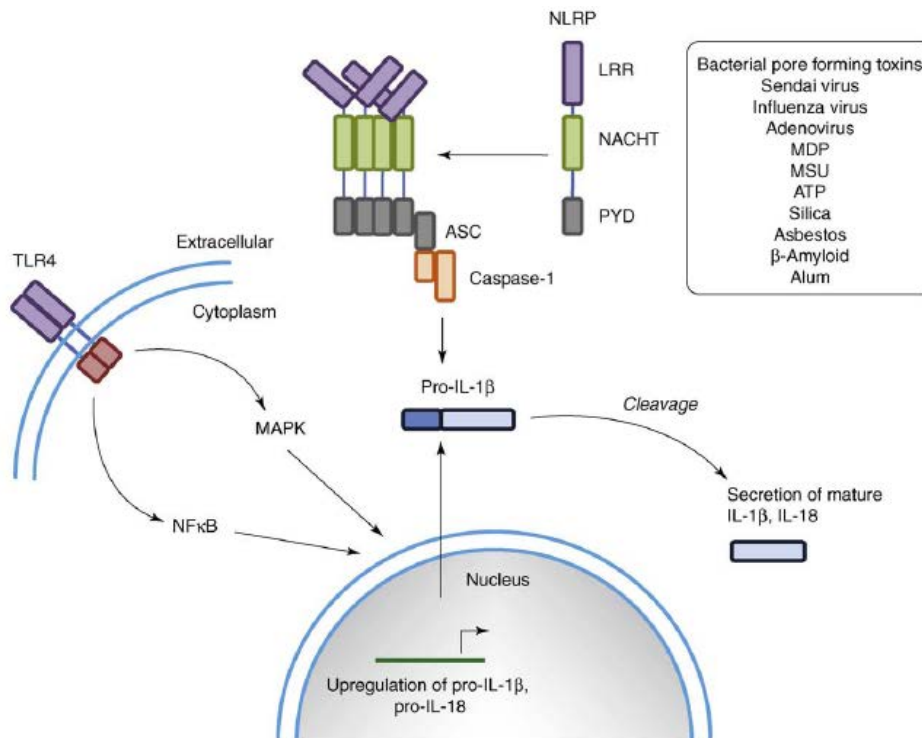
Les NLR sont caractérisés par 3 domaines: un domaine LRR, capable de lier le ligand, un domaine central NACHT nécessaire à leur oligomérisation, et un domaine de liaison protéique CARD, PYD, BIR ou inconnu. Ils peuvent être classés en sous-familles en fonction de ce domaine effecteur.

### 5.2.2. Les NACHT, LRR and PYD domain-containing protein (NLRP) et l'inflammasome

Certains membres de la famille des NLR, dont NLRC4, NLRP1 et NLRP3, sont capables de former un complexe moléculaire appelé l'inflammasome, le complexe le mieux décrit étant l'inflammasome NLRP3.

Lors d'une infection, la reconnaissance des PAMP par les TLR induit la synthèse de la pro-IL-1 $\beta$ . Cette pro-IL-1 $\beta$  est cytoplasmique et inactive jusqu'à l'arrivée d'un second stimulus qui va entraîner sa maturation via la formation de l'inflammasome [64].

L'activation de la formation de ce complexe est initiée par la fixation au récepteur d'un ligand bactérien ou d'une molécule produite en réponse à un stress cellulaire. Cette reconnaissance provoque la dimérisation du récepteur puis le recrutement de la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD) et de la pro-caspase-1. Le recrutement de deux molécules de pro-caspase-1 permet leur clivage pour former la caspase-1 active capable de maturer l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 par clivage de leurs précurseurs, la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 [65]. (Figure 8)



**Figure 8 : Formation de l'inflammasome [66]**

Un premier stimulus, souvent médié par les TLR et les NLR, conduit à la formation de pro-IL-1 $\beta$ . La détection d'un second stimulus par les NLRP conduit à l'activation de la caspase-1 entraînant la maturation puis la sécrétion d'IL-1 $\beta$ .

### 5.2.3. Les Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD)

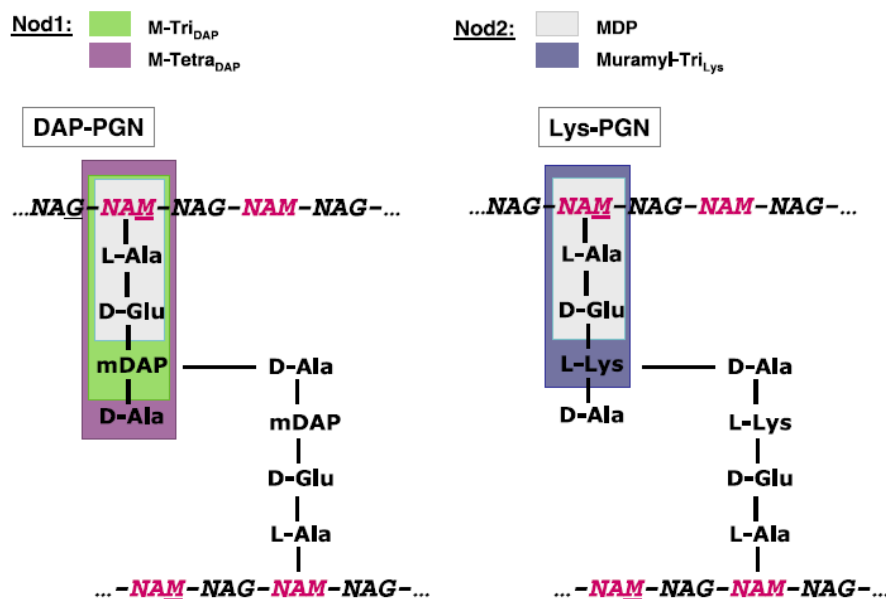
Nod1 et Nod2 sont des membres bien connus de la famille des NLR. Nod1 est exprimé par tous les types cellulaires [67] alors que Nod2 est retrouvé chez les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales [68-70]. A l'origine ces récepteurs étaient impliqués dans les réponses induites par le LPS mais il a ensuite été démontré que cette réponse provenait du fait que ce ligand était contaminé par du peptidoglycane [71].

#### 5.2.3.1. Les ligands de Nod1 et Nod2

Le peptidoglycane est le constituant majeur de la paroi des bactéries Gram positives et est retrouvé de façon minoritaire dans l'espace périplasmique situé entre les deux membranes des bactéries Gram négatives. Il est composé de chaînes glycaniques, le N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acetylmuramique (NAM) reliées entre elles par des chaînes peptidiques, de compositions variables, permettant la formation d'un polymère rigide au niveau de la membrane bactérienne. Cette structure

d'apparence solide n'est pourtant pas statique. Lors de leur multiplication les bactéries présentent un remodelage constant de leur peptidoglycane permettant le relargage de fragments dans le milieu environnant. De plus, les enzymes produites par l'hôte, comme le lysozyme, génèrent également des fragments de peptidoglycane. Les fragments ainsi formés peuvent alors pénétrer dans les cellules par des mécanismes d'endocytose ou par l'intermédiaire de transporteurs membranaires, de systèmes de sécrétion bactériens, de vésicules membranaires et de toxines formant des pores membranaires [72].

Nod2 est un senseur à la fois des bactéries Gram positives et négatives. En effet, il reconnaît le muramyl dipeptide (MDP), motif minimum retrouvé dans tous les peptidoglycanes et il reconnaît également de façon minoritaire le muramyl-TriLys [73, 74]. Nod1 reconnaît un motif différent du peptidoglycane, le meso-DAP (meso-Diaminopimelic Acid), retrouvé essentiellement chez les bactéries Gram négatives et quelques bactéries Gram positives comme *Bacillus sp* et *Listeria monocytogenes* [75, 76]. (Figure 9)



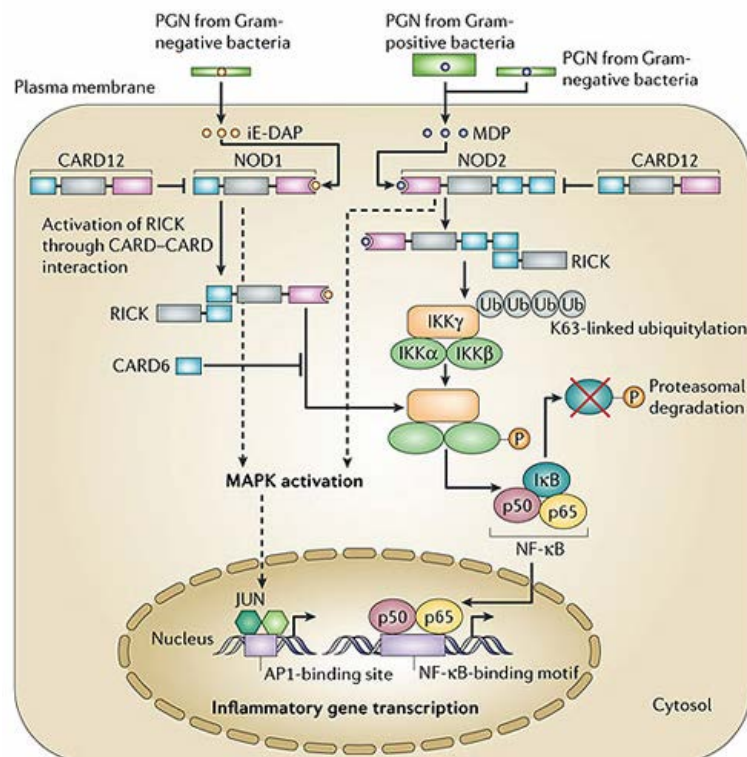
**Figure 9 : Motifs du peptidoglycane reconnus par les récepteurs Nod1 et Nod2 [77].**

NOD2 reconnaît le muramyl dipeptide (MDP), la structure minimale commune à tous les peptidoglycanes, ainsi que le muramyl-triLys des peptidoglycanes de type Lys. NOD1 quant à lui reconnaît le M-triDAP et le M-tetraDAP.

En complément de sa capacité à reconnaître des motifs bactériens, NOD2 est un PRR capable de reconnaître l'ARN simple brin et peut ainsi contribuer à la réponse virale en induisant la production d'interférons [78].

### 5.2.3.2. Les voies de signalisation de Nod1 et Nod2

A l'état natif, les NOD sont maintenus dans le cytoplasme sous forme inactive grâce à des interactions intraprotéiques entre leurs parties LRR et NOD. Lors de la reconnaissance de leurs ligands respectifs, les protéines NOD vont devenir actives, rompant ainsi leurs liaisons intra-protéiques. Leur domaine NOD devient alors accessible, rendant leur dimérisation possible [61]. Ensuite, les protéines NOD s'associent avec la kinase RIP2 (ou RICK2 pour RIP-like interacting CLARP kinase 2) par l'intermédiaire de leurs domaines CARD. Cette association va engendrer le recrutement de la kinase TAK-1 (Transforming growth factor  $\beta$  activated kinase). Le complexe RIP2/TAK-1 sera alors responsable de l'activation du complexe IKK via la polyubiquitilation d'IKK $\gamma$  (inhibitor of  $\kappa$ B kinase) et la phosphorylation d'IKK $\beta/\gamma$ . NF- $\kappa$ B sera alors libéré de son inhibiteur I $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B), ce qui conduira à l'activation de ses gènes cibles. [61, 67]. Le complexe RIP2/TAK1 peut également conduire à l'activation des MAP kinases via l'activation des protéines p38, JNK et ERK (Extracellular signal-regulated protein kinase) [79]. (Figure 10)



**Figure 10 : Voies de signalisation de Nod1 et Nod2 [80]**

Après reconnaissance de leurs ligands respectifs, NOD1 et NOD2 recrutent la kinase RIP2 (ou RICK2) permettant la polyubiquitilation de IKK $\gamma$  et la phosphorylation de IKK $\alpha$  et  $\beta$  afin de libérer NF- $\kappa$ B et d'induire la transcription de gènes inflammatoires. La signalisation de NOD1 et NOD2 peut également conduire à l'activation des MAPK.

### 5.2.3.3. Fonctions associées aux NOD

#### Rôle des NOD dans la reconnaissance bactérienne et sur les cellules immunitaires.

Les NOD sont des senseurs de ligands bactériens et par conséquent participent à la protection de l'hôte vis-à-vis des bactéries. Ainsi, NOD1 participe à la reconnaissance *in vitro* des bactéries *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Chlamydomphila pneumonia* et *Pseudomonas aeruginosa* et *in vivo* il participe à la lutte contre les infections à *Helicobacter pylori*. De la même façon, NOD2 a pour ligand le MDP des bactéries *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* et *Staphylococcus aureus in vitro* [62]. Ces récepteurs exercent leur effet protecteur en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 et l'IL-6, de facteurs de croissance et de molécules d'adhésion [81]. NOD1 et NOD2 coordonnent le recrutement des cellules phagocytaires et des neutrophiles par leur capacité à induire des chimiokines et agissent également sur la capacité des neutrophiles à éliminer les pathogènes par l'intermédiaire de la production de ROS (Espèces réactives oxygénées) et de monoxyde d'azote [72].

#### NOD et production de peptides anti-microbiens

Les muqueuses, et plus particulièrement la muqueuse intestinale, sont capables de produire des peptides anti-microbiens comme les défensines pour lutter contre les pathogènes. Une diminution de l'expression de défensines, telle que l' $\alpha$ -défensine 5, a été observée en conséquence d'une mutation du gène Nod2 [3, 82]. Au contraire, la stimulation de cellules épithéliales avec du MDP induit l'expression de la  $\beta$ -défensine 2 [83] suggérant l'implication de NOD2 dans la production de ces peptides anti-microbiens. De la même façon, NOD1 peut aussi influencer la production de la  $\beta$ -défensine 2 en réponse à la bactérie *Helicobacter pylori* [84, 85]. Les NOD participent donc au contrôle des bactéries en régulant l'expression de peptides anti-microbiens.

#### NOD et autophagie

Certaines macromolécules et organelles cytoplasmiques, présentant une taille trop importante pour être dégradées par l'intermédiaire du protéasome, peuvent être éliminées via l'autophagie. De même, certains pathogènes intracellulaires peuvent

être éliminés par ce processus qui sera alors appelé xénophagie. Dans l'autophagie, des composants membranaires cytoplasmiques isolés, appelés phagophores, entourent l'agent à éliminer pour former une double membrane, l'autophagosome. Cette vésicule pourra alors fusionner avec des lysosomes et conduire à la dégradation de son contenu par les enzymes lysosomales. Les autophagosomes sont également capables de fusionner avec des endosomes ou des compartiments contenant du CMH de classe II [86]. L'autophagie participe à la fois à l'immunité innée en aidant à l'élimination des pathogènes et en régulant les PAMP et les PRR et à l'immunité adaptative en favorisant la présentation antigénique et la maturation des lymphocytes [87]. NOD1 et NOD2 jouent un rôle clé dans l'induction de l'autophagie en réponse à une invasion bactérienne en recrutant ATG16L1 (autophagy-related gene 16-like 1), une protéine de l'autophagie, au niveau de la membrane plasmique [88]. De plus, la stimulation de NOD2 par le MDP est également capable d'induire l'autophagie chez les cellules dendritiques [89].



# Chapitre 3 : La flore intestinale

## 1. Généralités

Le corps humain héberge une quantité de bactéries supérieure au nombre de cellules somatiques et germinales le constituant et la globalité des génomes du microbiote coderait au moins 150 fois plus de gènes que les génomes humains [90]. La composition du microbiote intestinal est dynamique et présente des changements au cours du temps.

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans différentes fonctions de l'organisme comme le métabolisme énergétique, la prolifération et la survie des cellules épithéliales et la protection contre les pathogènes. Il potentialise des réponses à la fois pro- et anti-inflammatoires et la composition bactérienne de l'intestin peut être reliée au fonctionnement du système immunitaire. Des changements dans sa composition sont ainsi capables de provoquer un déséquilibre immunitaire et par conséquent favoriseraient le développement de pathologies [91].

## 2. Composition du microbiote intestinal

Les bactéries sont la composante principale du microbiote intestinal mais on peut également détecter des virus, des champignons et des protozoaires.

### 2.1. Les eucaryotes et les virus

Le protozoaire *Blastocyste sp* peut être retrouvé de façon asymptomatique chez l'Homme. Des champignons comme *Aspergillus* et *Rhizochaete* peuvent également être retrouvés de façon transitoire dans l'intestin [92] mais le plus souvent on retrouve la levure *Candida*. Chez l'Homme la diversité fongique est moins importante que chez la souris. En effet chez cette dernière 4 principaux phyla fongiques sont retrouvés: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, et *Zygomycota*. Ils participeraient à la digestion et produiraient des composés immuno-modulateurs participant à l'homéostasie microbienne [93].

La flore fécale humaine contient différents virus mais principalement des bactériophages ou des prophages insérés dans certains génomes bactériens [94], ainsi que des virus à ARN de plantes [95].

La plupart des virus à ARN retrouvés dans l'intestin sont des pathogènes de végétaux comme les légumes, les céréales et les fruits suggérant une contamination via l'alimentation [96]. Le virus le plus abondant dans les fèces provenant de végétaux est le pepper mild mottle virus (PMMV) et le virus eucaryote le plus fréquent est le picobirnavirus. L'étude des communautés virales est en pleine expansion grâce à l'émergence de nouvelles techniques de séquençage et il semblerait qu'elles puissent jouer un rôle dans le développement de pathologies comme la fibrose [97]. L'étude du virome n'en est qu'à ses débuts et d'autres virus pourront certainement être reliés à d'autres pathologies.

## **2.2. Les Archées**

Les Archées font partie des micro-organismes procaryotes pouvant être retrouvés dans le microbiote intestinal humain. Ces organismes unicellulaires peuvent être subdivisés en plusieurs grands groupes définis par leurs capacités métaboliques mais seules les archées halophiles et méthanogènes ont pu être détectées dans l'intestin [98]. Ces dernières ont été les premières à pouvoir être identifiées et isolées grâce à des techniques de culture et constituent la majeure partie des archées faisant partie du microbiote intestinal. Les *Methanobrevibacter* et les *Methanosphaera* sont les genres les plus représentés [99] car les espèces *Methanobrevibacter smithii* et *M. stadtmanae* représenteraient respectivement 95,5% et 29,4% des archées méthanogènes [100]. D'autres genres peuvent également être retrouvés dans l'intestin comme les *Methanomassiliicoccus*.

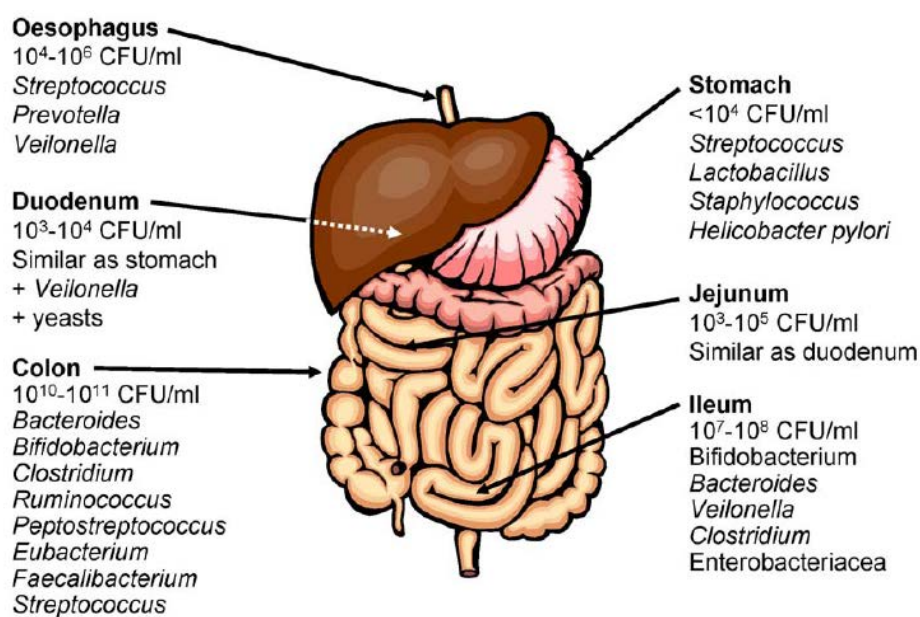
## **2.3. Les bactéries**

La flore du tractus gastro-intestinal est estimée à environ  $10^{14}$  bactéries [101]. Cette population regroupe 400 à 1000 espèces bactériennes différentes [102]. Les bactéries composant ce microbiote appartiennent à 6 principaux phyla du domaine *Bacteria* : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* et *Actinobacteria*. La majorité appartenant au *Firmicutes* et aux *Bacteroidetes* [103]. La plupart des bactéries intestinales (99,9%) sont anaérobies [101] et on observe une quantité croissante de ce type de bactéries en descendant le tractus gastro-intestinal. En particulier, les *Bacteroidetes* présentent une augmentation de leur représentation depuis l'intestin grêle jusqu'au caecum, côlon et fèces [104]. Une

variation qualitative et quantitative est donc observée le long du TGI selon les conditions physico-chimiques présentées dans le compartiment considéré [103, 105]. De plus, des différences de composition du microbiote sont également observées entre le lumen et la surface de la muqueuse [106]. (Figure 11)

Dans l'estomac, le duodénum et le jéjunum peu de bactéries sont retrouvées en raison du pH acide. Ce compartiment héberge des bactéries acidotolérantes, comme les streptocoques et les lactobacilles, pouvant résister ; mais seules des bactéries anaérobies strictes résistantes peuvent s'y implanter comme *Helicobacter pylori* [103]. L'iléon, région de transit de l'intestin, contient une flore beaucoup plus diversifiée représentant  $10^7$  à  $10^8$  CFU (Unités Formant Colonies)/mL. Ce compartiment est constitué de bactéries anaérobies facultatives ou anaérobies strictes des genres *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ou encore *Enterobacteriaceae*.

Dans le côlon le transit digestif est plus lent et par conséquent la flore microbienne est plus abondante. Ce dernier compartiment contient  $10^{10}$  à  $10^{11}$  CFU/mL, composées de 400 à 500 espèces bactériennes. Enfin, la composition fécale est identique à celle du côlon terminal.



**Figure 11 : Schéma représentant la variation qualitative et quantitative bactérienne le long du tractus gastro-intestinal [107].**

La souris est l'animal modèle utilisé au laboratoire. Le microbiote intestinal de la souris et de l'Homme présente les mêmes phyla (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *TM7*, *Fusobacteria*

et *Spirochaetes*). Mais la plupart des genres et espèces bactériennes trouvés chez la souris ne sont pas observés chez l'Homme [108].

La majorité des bactéries (environ 80%) est non cultivable du fait de l'absence de connaissances sur leurs besoins de croissance. Par conséquent, des techniques d'identification par approche métagénomique sont réalisées à l'aide de méthodes de biologie moléculaire basées sur l'analyse des ADN et ARN 16S ribosomiques bactériens.

#### **2.4. Le microbiote intestinal**

Le microbiote correspond à un écosystème qui vit en symbiose avec son hôte pouvant être considéré comme un organe à part entière. A l'âge adulte, le microbiote est organisé et hiérarchisé, avec des espèces très abondantes et d'autres plus rares. La totalité des micro-organismes intestinaux, leurs génomes, leurs conditions environnementales ainsi que les relations établies entre-eux constituent le microbiome intestinal. Ce microbiome intestinal peut être divisé en deux parties. Une base commune, est constituée de gènes bactériens retrouvés dans l'intestin, présente chez la plupart des individus [109]. L'autre partie du microbiome est variable en fonction de l'individu. La composition de ce microbiome variable est dépendante des facteurs de l'hôte comme sont génotype, sa physiologie, son style de vie, son environnement et la présence de populations bactériennes transitoires [110] (voir partie 4 de ce chapitre : régulation de la flore intestinale par l'hôte).

Récemment, 3 entérotypes distincts ont pu être caractérisés. Ces entérotypes sont composés par une population bactérienne prédominante, *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus* [111]. Chaque individu est caractérisé par un de ces entérotypes particulier. Les entérotypes ne semblent pas être associés ni à la nationalité de l'individu, ni l'alimentation, ni la variabilité génétique, ni l'âge ou le sexe [111], Il s'agirait donc d'une caractéristique fondamentale de l'hôte.

### **3. Fonctions du microbiote intestinal sur son hôte**

L'utilisation de modèles axéniques et gnotoxéniques a permis d'étudier les fonctions physiologiques et pathologiques de la flore intestinale. Les études utilisant ce type de modèle ont suggéré une implication de la flore intestinale dans le métabolisme et la

digestion, la fonction barrière intestinale, le contrôle de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, la maturation du système immunitaire ainsi que la régulation de l'homéostasie intestinale. (Figure 12)

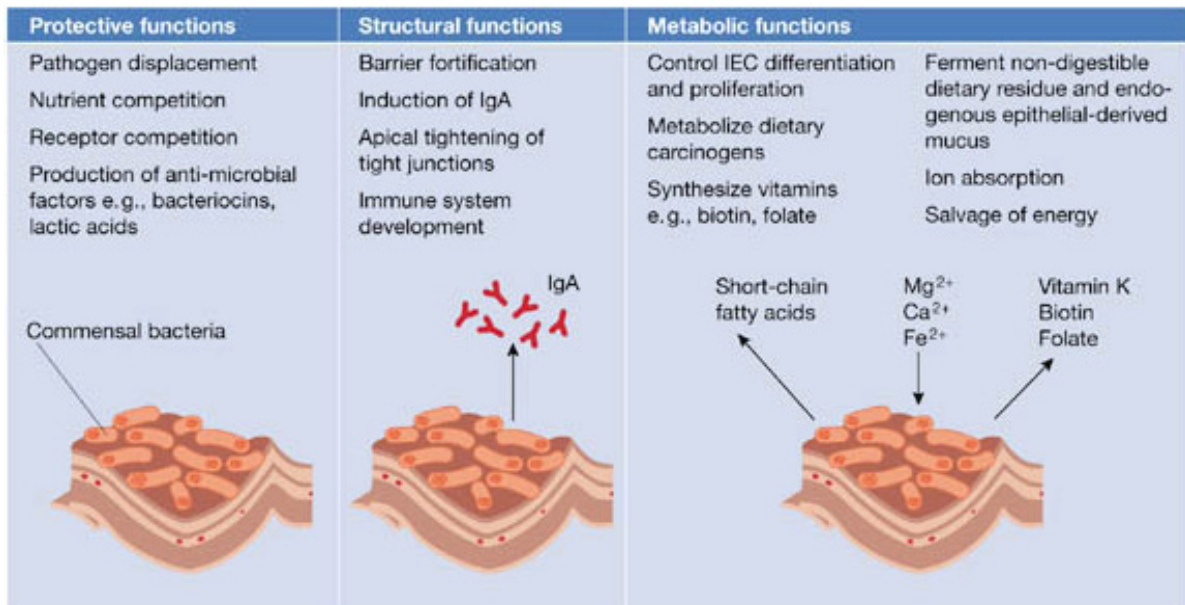


Figure 12 : Fonctions du microbiote sur l'hôte [105].

### 3.1. Métabolisme

La fonction métabolique majeure de la flore composant le tractus gastro-intestinal est la fermentation des résidus alimentaires non digestibles par le corps humain. En effet, les bactéries possédant des enzymes et des voies biochimiques complémentaires [112], aident à la fermentation de certains composés lors de la digestion permettant de les rendre absorbables par l'hôte. Elles peuvent également participer à la synthèse de vitamines [113] et à l'absorption du calcium, du magnésium et du fer [114]. Les bactéries participent également à la dégradation des glucides, polysaccharides, glycoprotéines et de sucres non digestibles en les transformant principalement en courtes chaînes d'acides gras. Trois principaux composés résultent de cette fermentation : le propionate, le butyrate et l'acétate. Ces métabolites permettent la maintenance de l'homéostasie des colonocytes en agissant sur la régulation du métabolisme des acides gras, les transports d'électrons et le stress oxydatif au niveau transcriptionnel [115]. Des effets bénéfiques sur le niveau de cholestérol, la lipogenèse et la carcinogénèse sont également observés suite à la synthèse de propionate [116].

La synthèse de ces acides gras à chaîne courte par la flore au niveau des colonocytes exerce également un moyen de contrôle de la croissance microbienne via l'expression de peptides antimicrobiens comme LL-37 [117].

## **3.2. Fonction Protectrice**

### **3.2.1. Compétition avec les pathogènes**

Les bactéries de la flore intestinale constituent une barrière à l'encontre des micro-organismes exogènes et préviennent l'implantation de pathogènes dans les tissus. En effet, certaines bactéries peuvent entrer en compétition avec les pathogènes en terme d'utilisation de nutriments et au niveau des sites de fixation situés à la surface de la bordure en brosse intestinale [118]. Ainsi, les souris axéniques sont plus susceptibles aux agents infectieux tels que *Shigella flexneri*, *Bacillus anthracis* et *Listeria* [119] et les traitements antibiotiques, réduisant la diversité microbienne, favorisent les infections virales [120] et bactérienne [121, 122].

### **3.2.2. Production de facteurs anti-microbiens**

Les bactéries sont capables de synthétiser des bactériocines. Ces molécules ont une activité antimicrobienne, comme les peptides anti-microbiens synthétisés par les cellules eucaryotes, mais sont directement produites dans certaines bactéries par la voie de synthèse ribosomique. Les souches bactériennes pouvant produire des bactériocines comme *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella pneumoniae* sont principalement des Gram négatives, mais les bactéries lactiques Gram positives comme *Lactobacillus spp*, peuvent également en produire. Les bactériocines produites agissent principalement sur les bactéries Gram positives et permettent d'augmenter la capacité d'envahissement de la souche productrice ou son maintien [123].

De plus, les Lactobacilles sont capables de produire d'autres facteurs anti-microbiens comme le peroxyde d'hydrogène, capable d'inhiber la croissance des bactéries environnantes, ou encore l'acide lactique ou l'acide acétique, permettant une réduction du pH défavorable à la croissance des bactéries pathogènes [124, 125].

En plus de ces mécanismes d'exclusion compétitive, certaines bactéries peuvent favoriser ou interférer avec la production de mucus. Le pathogène *Helicobacter pylori* est capable d'interférer dans la production de mucines composant le mucus pour lui

permettre un passage plus aisé de la barrière muqueuse. Au contraire des souches bactériennes comme *Lactobacillus plantarum* augmentent l'expression de mucines comme MUC2 et MUC3, inhibant la fixation bactérienne, en vue de prévenir l'invasion des cellules intestinales par *Escherichia coli* entéro-pathogène [126].

### **3.3. Fonctions structurales**

#### **3.3.1. Jonctions serrées et angiogénèse**

Participant au maintien de la barrière intestinale, les jonctions serrées sont un groupement de protéines entre les cellules épithéliales formant une barrière entre la lumière intestinale et la *lamina propria*. Ce type de jonction cellulaire est constitué de protéines intracellulaires comme les zonae occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) et de protéines membranaires comme les occludines et les claudines. Certaines souches probiotiques comme *E. coli* Nissle peuvent fortifier la barrière épithéliale en agissant sur les jonctions serrées par l'intermédiaire de ZO-2 [127]. De même, *Lactobacillus plantarum* augmente la localisation de l'occludine et de ZO-1 dans les jonctions serrées de l'épithélium intestinal [128]. Administrés en cocktail ces probiotiques sont capables de réduire la perméabilité après une lésion chimique de l'intestin provoquée par du DSS (Dextran Sodium Sulfate) en agissant sur les protéines de jonctions ZO-1, claudine et occludine [129].

Dans les villosités intestinales, les cellules endothéliales, formant un réseau de capillaires sanguins, participent à la distribution et à l'absorption des nutriments. Les bactéries intestinales telles que *B. thetaiotaomicron* jouent un rôle dans la régulation de l'angiogénèse intestinale via les cellules de Paneth [130].

#### **3.3.2. Contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales**

Le butyrate, un des produits final de dégradation des chaînes courtes d'acides gras, métabolisé par les bactéries, peut être utilisé comme source d'énergie par les colonocytes. Il stimule la prolifération des cellules épithéliales, régule l'inflammation et exerce un rôle anti-carcinogène [131]. Les effets du butyrate passent par sa capacité à moduler l'expression génique en agissant sur l'acétylation des histones et de l'ADN pour favoriser la transcription [132]. De plus, le butyrate et les autres

métabolites bactériens, propionate et acétate jouent un rôle dans l'induction de l'apoptose, indispensable au renouvellement de l'épithélium intestinal [133].

### **3.3.3. Maturation et stimulation du système immunitaire**

Le développement des GALT est déficient chez les souris axéniques. Ces souris présentent également une réduction de la taille et du nombre de plaques de Peyer et de ganglions mésentériques. Le nombre de cellules dans la *lamina propria* intestinale est également diminué en comparaison avec des animaux comportant une flore intestinale [134-136].

Mais au delà des défauts de formation de certains tissus, les profils cellulaires et moléculaires du système immunitaire intestinal sont également modifiés en absence de microbiote. Chez les souris axéniques, les cellules épithéliales (IEC) qui composent l'intestin, formant une barrière entre son contenu et le système immunitaire, présentent une réduction de l'expression des TLR [137] et du CMH de classe II [138], impliqués dans la reconnaissance et la présentation d'antigènes bactériens. Les IEL enchevêtrés entre les cellules épithéliales intestinales sont également en nombre réduit chez les souris axéniques et leur cytotoxicité n'est pas fonctionnelle [139]. Le nombre de cellules T CD4+ de la *lamina propria* est également réduit [140]. Le développement des follicules lymphoïdes (ILF) dans l'intestin composés de cellules dendritiques et de cellules B est également dépendant du microbiote [141]. De plus, certaines bactéries particulières ont montré un effet direct sur certaines sous population lymphocytaires. C'est le cas des lymphocytes Th17 induits en réponse à la bactérie filamenteuse SFB (Segmented Filamentous Bacteria) chez la souris [142, 143]. La recolonisation de souris axéniques par cette bactérie pourrait également stimuler la sécrétion d'IgA [144] et le recrutement des IEL [145] au niveau intestinal. De nombreuses populations cellulaires de l'immunité intestinale dépendent donc de la présence bactérienne pour leur développement et leur fonction.

Le microbiote est également une source de peptidoglycane permettant l'activation de neutrophiles apportant une protection à l'encontre de pathogènes comme *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* [146].

Malgré un effet direct pouvant être observé au niveau intestinal, l'absence de flore exerce aussi une action au-delà de ces barrières, de façon systémique. Ainsi, au niveau de la rate, le nombre de cellules T CD4+ est réduit et des modifications



quantitatives et qualitatives des centres germinatifs entraînent une réduction du niveau d'anticorps circulants. [147-149]

## **4. Régulation de la flore intestinale par l'Hôte**

Avant la naissance notre organisme est complètement stérile. Ce n'est qu'après la naissance que le tractus gastro-intestinal est colonisé progressivement par les bactéries de la mère et de l'environnement. A la naissance, la colonisation est influencée par le mode de délivrance par voie naturelle ou césarienne [150]. A ce moment la flore microbienne, se compose principalement de bactéries lactiques et de coliformes [101]. De plus, le lait maternel, contenant un inoculum bactérien naturel, participe à la colonisation néonatale [151]. Cet inoculum sera donc conditionné par l'alimentation ou encore la prise d'antibiotique par la mère. La diversité du microbiote intestinal simple chez l'enfant va se complexifier au cours de sa croissance.

Il semblerait que le microbiote intestinal présente une stabilité relative à l'âge adulte [152]. Mais, les facteurs environnementaux tels que l'alimentation, les facteurs génétiques de l'hôte, l'utilisation de médicaments, le système immunitaire de l'hôte ont un impact sur le microbiote intestinal [153-155]. Par conséquent, la flore est un caractère variable d'un individu à l'autre qui est capable d'évoluer au cours du temps.

### ***4.1. Effet de l'alimentation sur la composition du microbiote intestinal***

L'alimentation est un facteur exogène influençant la colonisation bactérienne du tube digestif. L'allaitement maternel favorise l'implantation des *Bifidobacterium* alors que les *Clostridium* et les *Bacteroides* s'implantent en quantités moins importantes [156]. Chez les enfants nourris avec du lait maternisé, la colonisation se fait par les mêmes bactéries mais associée avec une diversification plus importante du microbiote [157]. Dès l'introduction d'une alimentation variée, le microbiote se diversifie en particulier en bactéries anaérobies strictes.

Des habitudes alimentaires variables à travers le monde participent aux différences géographiques du microbiote de l'hôte. Ceci peut être constaté en comparant l'alimentation et la flore intestinale d'enfants Africains et Européens. Les enfants Africains, disposant d'une alimentation riche en fibres et avec des proportions en protéines et en graisses réduites, présentent une augmentation des *Bacteroidetes* et

des *Actinobacteria* au détriment des *Firmicutes* et des *Proteobacteria*, dont les *Enterobacteriaceae* (*Shigella* et *Escherichia*), en comparaison avec des enfants Européens. Les genres *Prevotella* et *Xylanibacter* contenant des gènes impliqués dans l'hydrolyse de cellulose et de xylanes se sont avérés absents chez les enfants Européens [158]. La quantité de fibres apportées par l'alimentation modifie la concentration luminale en acides gras à chaînes courtes affectant la composition microbienne [159].

Une alimentation enrichie en sucres et en graisses (comme celle des pays industrialisés) favorise l'augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes* chez des souris axéniques recolonisées par un microbiote humain. L'analyse du microbiome chez ces souris montre un enrichissement des voies de signalisation impliquées dans la prise en charge des sucres et des acides aminés. Au contraire, les animaux avec une alimentation riche en fibres présentent un enrichissement des voies impliquées dans la dégradation des glycanes et des glycosaminoglycanes ainsi que dans le métabolisme des sphingolipides qui sont aussi enrichies chez les *Bacteroidetes* [104].

Certains composés de l'alimentation agissent comme des prébiotiques. Les prébiotiques sont des nutriments non digestibles par l'hôte qui peuvent stimuler sélectivement la croissance et/ou l'activité de une ou plusieurs bactéries dans l'intestin et qui améliorent la santé de l'hôte. Des composés comme l'inuline et le fructo-oligosaccharide peuvent ainsi favoriser le développement des Bifidobactéries intestinales [160-162].

#### **4.2. Facteurs génétiques influençant la composition de la flore intestinale**

L'étude du microbiote chez les jumeaux suggère une association entre sa composition et le génotype de l'hôte [163]. Mais il est difficile d'apprécier une réelle association puisque les jumeaux sont en général sujets à des environnements communs qui influencent aussi le microbiote. Chez la souris, la mutation spécifique du gène codant la pyrine influence la diversité du microbiote intestinal [164]. L'influence de la génétique de l'hôte sur la composition du microbiote a récemment pu être analysée par génétique quantitative [165]. Cette analyse a révélé une association entre la variation génétique de l'hôte et l'abondance de 4 phyla majeurs

(*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Actinobacteria*). Ces variations génétiques sont présentes au niveau de gènes jouant un rôle important dans l'immunité de la muqueuse. Par exemple, le genre *Lactococcus* a été associé avec les gènes *Irak3*, *Ifng* et *Il22*.

D'autres gènes de l'immunité ont été directement associés à des changements de flore chez la souris comme *Tlr5* [166], *Tlr2* [167] et des gènes de la voie de signalisation de l'IFN [168].

Les facteurs génétiques impliqués dans l'immunité de l'hôte semblent donc intervenir pour contrôler le maintien et la stabilité du microbiote intestinal.

### **4.3. Prise d'antibiotiques**

Le microbiote humain peut être affecté de façon négative par des facteurs extérieurs, incluant les traitements antibiotiques [169, 170]. Les traitements antibiotiques peuvent conduire à une sélection de genres bactériens résistants et à une modification de la flore exerçant un effet barrière ce qui rend la colonisation par les pathogènes plus aisée [171]. Une prise d'antibiotique durant une durée limitée peut résulter en changements stables sur le long terme du microbiote fécal humain [172, 173]. Mais il est difficile de comparer des variations de flore chez l'Homme aux vues de la variation interindividuelle due à l'environnement et aux facteurs génétiques. Des études sur le microbiote de souris congéniques hébergées dans un environnement contrôlé sont donc plus faciles à effectuer pour s'affranchir de ces effets « extérieurs » malgré que la composition du microbiote soit quelque peu différente entre chaque individu. Dans ces conditions, l'administration d'antibiotiques peut entraîner des changements permanents de la diversité de la flore intestinale suivant le type d'antibiotique administré. Ainsi, suite au traitement par un cocktail d'antibiotique composé d'AMB (Amoxicillin, metronidazole, bismuth) la flore intestinale pourra être restaurée alors que suite à la prise de céfoperazone va apparaître des changements de la flore pouvant perdurer jusqu'à 6 semaines après l'arrêt du traitement [174].

### **4.4. Les conditions d'hygiène**

Bien que l'hygiène soit un facteur protecteur à l'encontre des maladies infectieuses, la théorie de l'hygiène suggère que l'excès d'hygiène de la société moderne dans les

pays développés est également un facteur de risque pour le développement de désordres médiés par l'immunité. L'établissement et le développement d'un microbiote intestinal normal requièrent une exposition continue aux bactéries, processus compromis en condition d'hygiène excessive. L'acquisition d'un microbiote adulte optimal nécessite une exposition continue aux bactéries de l'environnement pour établir une biodiversité et un processus de sélection ce qui permettra un bon développement et maturation de l'intestin et de l'immunité [175].

#### **4.5. La production de mucus**

La couche de mucus, recouvrant la lumière intestinale, est sécrétée par les cellules caliciformes et les cellules épithéliales. Elle favorise l'élimination du contenu intestinal et constitue une première ligne de défense à l'encontre des lésions physiques et mécaniques pouvant être induites par l'ingestion d'aliments et de bactéries.

Le mucus est principalement composé de mucines, des glycoprotéines codées par les gènes MUC1 à MUC20, participant à la formation d'une structure gélifiée à la surface de l'épithélium. Différents facteurs de l'hôte comme les hormones, les neuropeptides et les médiateurs inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  et PGE2), peuvent induire l'exocytose des mucines [176]. Une fine couche de mucus recouvre l'épithélium de l'intestin grêle alors que dans le côlon l'épaisseur du mucus diffère, en augmentant graduellement du côlon proximal au rectum. Le mucus est composé d'une couche luminale peu visqueuse colonisée par les bactéries, alors qu'une couche plus visqueuse forme une zone de protection proche des cellules épithéliales dans laquelle la mobilité bactérienne est réduite empêchant l'invasion par les pathogènes [177, 178]. En plus de ce rôle dans la protection des cellules, le mucus constitue une source d'énergie bactérienne au travers des oligosaccharides le composant [126].

#### **4.6. Les peptides anti-microbiens**

La faible quantité de bactéries retrouvées dans la couche interne de mucus est également causée par des facteurs antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales et les cellules de Paneth.

Les peptides antimicrobiens sont des molécules ayant la capacité de tuer une variété de bactéries Gram positives et Gram négatives ainsi que certains champignons et

virus. La présence de régions hydrophobes et basiques dans leurs structures permet l'établissement d'interactions électrostatiques avec les phospholipides des membranes ou le peptidoglycane bactérien chargé négativement. Ces interactions permettent leur insertion dans les membranes cellulaires microbiennes et causent la formation de pores déstabilisant l'intégrité bactérienne. Les charges des phospholipides des membranes eucaryotes et procaryotes ne sont pas distribuées de la même façon, ce qui confère aux peptides antimicrobiens une spécificité d'action dirigée à l'encontre des bactéries [179]. Chez l'Homme, diverses protéines exercent des activités antimicrobiennes : les défensines, les cathélicidines et les lectines de type C.

#### **4.6.1. Les défensines**

Les défensines constituent la famille principale des peptides antimicrobiens. Ce sont des peptides de 2 à 6 kDa exprimés par les cellules épithéliales, les neutrophiles et les macrophages. Les défensines humaines peuvent être divisées en deux groupes : les  $\alpha$ -défensines et les  $\beta$ -défensines.

##### **4.6.1.1. Les $\alpha$ -défensines**

Les  $\alpha$ -défensines exercent leur activité anti-microbienne sur les bactéries Gram positives et négatives, les champignons, les virus et les protozoaires. Ces défensines peuvent elles-mêmes être subdivisées en deux parties en fonction du type cellulaire les produisant. Ainsi, il existe 4  $\alpha$ -défensines produites par les neutrophiles, les HNP1 à HNP4 (Human neutrophil peptide) et seulement 2 sont exprimées par les cellules de Paneth de l'intestin grêle, HD-5 et HD-6 (Human defensin) chez l'Homme [180]. Il faut noter que HD-5 et HD-6 sont également retrouvées dans le côlon mais dans ce cas leur expression est beaucoup plus faible que dans l'iléon [181].

Chez la souris, les  $\alpha$ -défensines sont appelées cryptidines, mais sont seulement sécrétées par les cellules de Paneth dans l'intestin. Plus de 20 cryptidines différentes ont été décrites au niveau transcriptionnel [182] mais seulement 6 cryptidines ont montré un effet antimicrobien *in vitro* [183]. D'autres peptides cationiques à activité antimicrobienne sont retrouvés au niveau intestinal chez la souris. Ces peptides, similaires au  $\alpha$ -défensines, sont appelés les cryptidin-related sequence (CRS) peptides [184, 185].

Les  $\alpha$ -défensines ne sont pas produites sous forme active. Les cellules de Paneth relarguent une pro-forme inactive de défensine qui doit être clivée pour acquérir son activité. Les enzymes participant à ce processus enzymatique sont : la trypsine dans le cas de la défensine HD5 ou encore la metalloprotéinase 7 (MMP-7 encore appelée matrilysine) pour les cryptidines murines [186-188].

#### **4.6.1.2. Les $\beta$ -défensines**

Exprimées principalement par les entérocytes dans l'intestin, les  $\beta$ -défensines ont un rôle antimicrobien identique aux  $\alpha$ -défensines et jouent un rôle dans la chimioattraction des cellules dendritiques et des lymphocytes T [180]. Les  $\beta$ -défensines HBD1 et HBD2 (human beta defensin) peuvent être respectivement exprimées de façon indépendante ou dépendante du microbiote intestinal. Mais, la plupart des  $\beta$ -défensines épithéliales sont induites par des stimuli pro-inflammatoires tels que le  $TNF\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et ceci de façon dépendante de  $NF-\kappa B$  [189].

#### **4.6.2. Les Cathélicidines**

Ces peptides antimicrobiens exercent leur action par des mécanismes similaires aux défensines sur les bactéries Gram positives et négatives et sur les champignons. Les cathélicidines sont exprimées dans de nombreux tissus tels que la moelle osseuse, le thymus, le foie, la rate et l'estomac. Elles sont retrouvées de façon abondante dans les granules des neutrophiles et cellules épithéliales [180]. Un gène unique chez l'Homme et la souris code les deux principales cathélicidines, les peptides LL-37 et CRAMP (cathelin-related antimicrobial peptide). Le peptide LL-37, seule cathélicidine existante chez l'Homme, est généré par clivage de sa proforme hCAP-18 par la protéinase 3, [190]. Au-delà de leurs rôles anti-microbien les cathélicidines ont un pouvoir chimioattractant, induisent et relarguent des médiateurs inflammatoires comme les chimiokines, et peuvent neutraliser des endotoxines bactériennes [186].

Le peptide LL-37 exprimé indépendamment du microbiote par les monocytes, les NK, les cellules B et les cellules T  $\gamma\delta$  peut ainsi recruter des monocytes, des macrophages et des cellules T par chimiotactisme. Leur expression est augmentée par des motifs bactériens tels que le LPS (lipopolysaccharide) et l'acide lipotéichoïque chez les mastocytes [180].

#### **4.6.3. Les lectines de type C Reg3 $\beta$ et Reg3 $\gamma$**

Les lectines de type C sont des protéines capables de fixer des sucres de façon dépendante du calcium. Ces protéines, comme la PAP (pancreatic-associated protein) peuvent exercer un rôle antimicrobien. La PAP, exprimée par les entérocytes et les cellules de Paneth chez l'Homme, possède un homologue murin mieux décrit, Reg3 $\gamma$  (Regenerating islet-derived protein 3 $\gamma$ ). Reg3 $\gamma$  médie spécifiquement l'élimination des bactéries Gram positives grâce à sa capacité à lier le peptidoglycane [191] après avoir été activé par clivage par la trypsine [192]. La recolonisation bactérienne de souris axéniques augmente son expression [193] alors qu'un traitement antibiotique [194] et la déficience en MyD88 chez la souris provoquent une réduction de son expression [195]. Ainsi, l'expression de Reg3 $\gamma$  est induite par la flore et en particulier le LPS bactérien [194] par l'intermédiaire des TLR. La lectine Reg3 $\beta$ , de la même famille que Reg3 $\gamma$ , pourrait être induite par TLR2 après infection à *Yersinia pseudotuberculosis* [196].

#### **4.6.4. Les peptides à activité enzymatique**

La déstabilisation des parois bactériennes peut également être initiée par des peptides à activité enzymatique tels que le lysozyme et la phospholipase A2. Dans l'intestin, ces molécules sont sécrétées de façon constitutive par les cellules de Paneth. La production de lysozyme conduit à la dégradation enzymatique du peptidoglycane, composant la paroi des bactéries Gram positives. Retrouvée de façon ubiquitaire, la phospholipase A2 conduit à l'hydrolyse des phospholipides composant les membranes bactériennes. Une autre enzyme de la famille des ribonucléases exerce une action antimicrobienne à l'encontre des bactéries Gram positives et Gram négatives, l'angiogénine 4 (Ang-4). Cette protéine est exprimée de façon dépendante du microbiote par les cellules de Paneth mais son mécanisme d'action reste indéterminé [180].

### **4.7. La production IgA**

Le contrôle des contacts entre cellules épithéliales et bactéries représente un moyen important mis en œuvre par le système immunitaire de l'hôte pour limiter l'invasion bactérienne dans les muqueuses. Dans un objectif de surveillance et de contrôle, le système immunitaire sécrète des IgA afin de réduire la densité des bactéries

associées aux muqueuses [197], réduisant ainsi la pénétration bactérienne au sein de l'épithélium intestinal [198]. Les IgA dirigées à l'encontre des bactéries intestinales sont produites à l'aide des cellules dendritiques qui sont capables de capter les bactéries dans les muqueuses et plus particulièrement au niveau des GALT. L'interaction entre cellules dendritiques et lymphocytes B dirigera alors la différenciation de ces dernières pour produire des IgA [199]. La liaison des IgA aux bactéries intestinales pourra ensuite prévenir leur pénétration dans les tissus de l'hôte.



# Chapitre 4 : De la maladie de Crohn au cancer colorectal

## 1. La maladie de Crohn

### 1.1. Généralités

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal chez des individus génétiquement prédisposés et exposés à des facteurs de risque environnementaux. Ce type de pathologie regroupe la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn (MC) mais dans ce travail de thèse seul la MC sera exposée.

La maladie de Crohn a été décrite en 1932 par le Dr Burril B. Crohn. Elle est caractérisée par une inflammation discontinue, transmurale (pouvant affecter toutes les couches de la paroi intestinale) et souvent granulomateuse. L'inflammation peut apparaître tout le long du tractus gastro-intestinal de la bouche à l'anus mais elle est souvent limitée à l'iléon et au côlon [200]. Certains patients atteints de la maladie de Crohn présentent une diminution du diamètre de la lumière intestinale, ou sténose, due à une accumulation importante de macrophages et de cellules lymphoïdes dans la *lamina propria*. La MC se traduit, au niveau clinique, par des diarrhées, des douleurs abdominales, des saignements rectaux et une perte de poids. Ces symptômes peuvent être associés à une fistulisation dans la peau et les organes internes. Ces phases actives de la maladie sont séparées par des phases de rémission plus ou moins longues en faisant une pathologie chronique.

### 1.2. Epidémiologie

L'épidémiologie de la MC présente des variations importantes à travers le monde. L'industrialisation et le niveau de développement des pays semblent être corrélés à l'incidence de ces maladies. Ainsi, on note les prévalences les plus fortes en Amérique du nord et en Europe (Figure 12). L'incidence annuelle de la MC est estimée en Europe, entre 0,3 et 12,7 cas pour 100 000 et la prévalence est de 0,6 à 322 cas pour 100 000. L'incidence est en augmentation depuis les années 1930 laissant penser que la prévalence va encore augmenter dans les années à venir. En Europe de l'ouest, la MC touche plus particulièrement les femmes (tendance retrouvée en France) mais globalement la répartition mondiale homme/femme

semble équilibrée. De plus, il faut noter que l'incidence est plus élevée chez les individus âgés de 20 à 29 ans [201, 202].

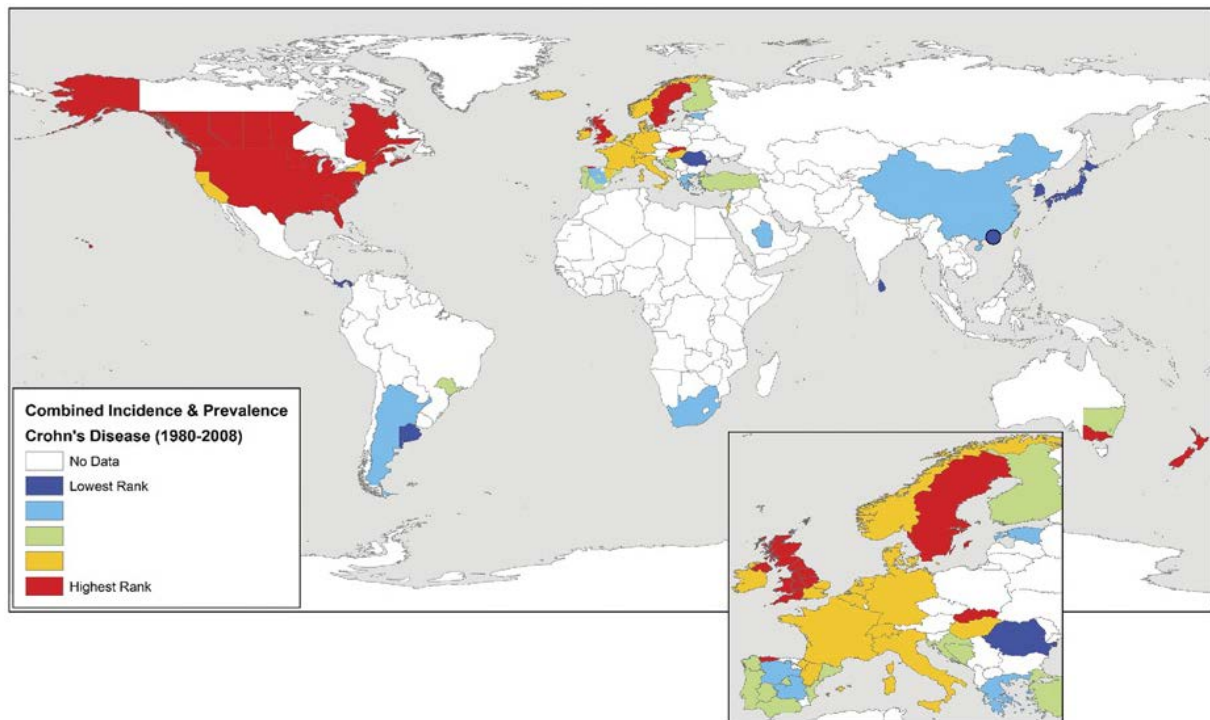


Figure 12 : Incidence et prévalence mondiale de la maladie de Crohn [201].

En France, un gradient nord-sud d'incidence de la MC est observé. Le nord de la France présente l'incidence la plus forte de la MC en France constituant un réel problème de santé publique dans la région Nord Pas de Calais. Depuis 1988, les patients atteints de MICI sont recensés dans un registre, appelé EPIMAD, dans le but de regrouper des données épidémiologiques [203].

### 1.3. Thérapies

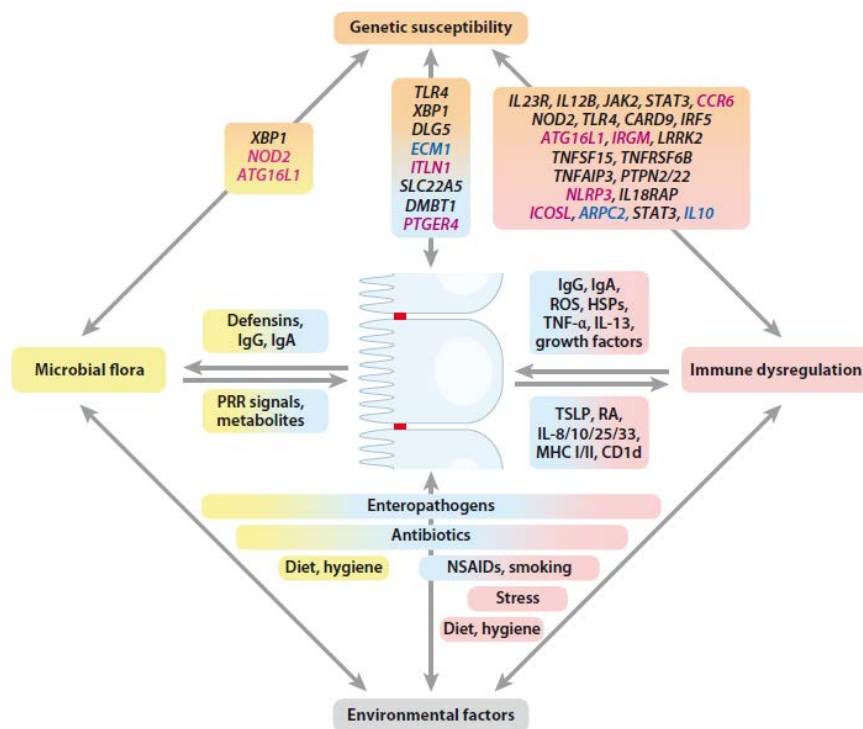
Les traitements existant de la maladie de Crohn ont pour objectif de réduire et de prévenir l'inflammation de la muqueuse intestinale, de traiter les symptômes liés à la maladie aiguë comme la douleur et de limiter la chronicité de la maladie. Ainsi, il est possible de distinguer les traitements d'induction utilisés lors des poussées inflammatoires et ceux de maintenance utilisés en traitement de fond pour maintenir la rémission.

Les dérivés aminosalicylés (acide 5-aminosalicylique (5-Asa) ou mésalazine) montrent peu d'effet chez les patients atteints de la MC. Alternativement, les corticoïdes sont utilisés pour traiter les poussées inflammatoires en association avec

un traitement de maintenance composé d'immunosuppresseurs tels que l'azathioprine, le 6-mercaptopurine et le methotrexate [204]. L'utilisation de traitements biologiques comme l'anti-TNF $\alpha$  constitue un progrès dans le traitement de la MC mais le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques permettrait de pallier aux effets secondaires de certaines drogues ou à l'absence de réponse chez certains patients.

#### 1.4. Facteurs influençant l'apparition de la MC

Bien que l'étiologie précise de la MC demeure inconnue, les données épidémiologiques mettent en cause des dérégulations de la réponse immune à l'encontre de la flore intestinale. La prédisposition génétique de l'hôte et le contexte environnemental participerait également à l'apparition et la réactivation de la maladie. (Figure 13)



**Figure 13 : La maladie de Crohn est un désordre multifactoriel [205].**

Elle implique la susceptibilité génétique de l'hôte, le microbiote intestinal, des facteurs environnementaux et le système immunitaire de l'hôte.

### 1.4.1. Facteurs génétiques

L'étude des facteurs génétiques repose sur l'observation de formes familiales [206, 207] de Maladies de Crohn (MC) et sur la concordance de cette maladie chez les Jumeaux monozygotes [208-210].

La maladie de Crohn est une maladie polygénique. Les études génétiques et en particulier les études d'association sur le génome entier (genome wide association studies ou GWAS) ont permis d'identifier à ce jour 71 loci conférant une susceptibilité à la MC [211]. Les neuf loci les mieux décrits sont nommés IBD1 à 9 (Inflammatory Bowel diseases) et sont placés sur diverses régions chromosomiques. Ces loci codent, entre autres, pour des gènes impliqués dans l'immunité innée (NOD2/CARD15, TLR4, CARD9), la régulation des lymphocytes T et B, l'autophagie (ATG16L1, IRGM (Immunity-related GTPase family M protein), NOD2), la maintenance de l'intégrité de la barrière épithéliale et l'induction de la réponse immunitaire acquise [200, 212].

Certaines associations ont pu être confirmées comme le locus IBD1 présent sur le chromosome 16 codant pour le gène CARD15/NOD2 comportant des polymorphismes associés à la MC [213, 214]. Un patient sur deux atteint de la MC présente au moins une mutation du gène *Nod2* en faisant un gène majeur de prédisposition de cette maladie. Il existe 3 polymorphismes principaux de NOD2 ayant été associés à la MC : deux substitutions d'acides aminés Gly908Arg, Arg702Trp et une mutation résultant de l'insertion d'une cytosine dans le cadre de lecture de la Leu1007 (mutation Leu1007fsinsC) provoquant un changement du cadre de lecture lors de la traduction [213]. Ces mutations sont localisées au sein ou à proximité du domaine de reconnaissance des ligands et confèrent au patient un phénotype perte de fonction. Les mutations de NOD2 constituent seulement des facteurs de susceptibilité de la MC mais ce facteur de risque seul ne suffit pas pour induire la maladie. C'est ce qui peut être observé dans le modèle de souris déficientes pour NOD2 qui ne développent pas d'inflammation intestinale spontanée [215].

## **1.4.2. Facteurs environnementaux**

L'industrialisation et l'urbanisation des sociétés sont associées avec des changements à l'exposition microbienne, l'hygiène, l'alimentation, la médication, le style de vie et la pollution. Tous ces facteurs peuvent constituer un risque environnemental pouvant être associé aux MICI.

### **1.4.2.1. Le tabac et l'appendicectomie**

La consommation de tabac et l'appendicectomie sont les seuls facteurs reconnus comme favorisant l'apparition de la MC. Le risque de développer une maladie de Crohn est plus élevé chez les fumeurs et la consommation de tabac entraîne une évolution de la maladie plus sévère en augmentant le nombre de poussées inflammatoires [216-218]. De plus, l'arrêt de la consommation de tabac est bénéfique pour les patients.

On note également une augmentation du risque de développer la MC après appendicectomie. Ce risque est variable en fonction du sexe et de l'âge du patient ainsi que des complications liées à l'appendicite [219, 220].

### **1.4.2.2. Alimentation et maladie de Crohn**

L'alimentation des pays développés est très différente de celle des pays en voie de développement. Comme nous avons pu le voir précédemment, l'alimentation des pays industrialisés est très riche en graisses et protéines et pauvre en fruits et légumes ce qui influence directement l'équilibre du microbiote intestinal. L'augmentation du risque de développer la MC a été souvent associée à divers composés alimentaires comme les graisses, les sucres, les protéines et la viande. Au contraire, la diminution du risque de MC a été souvent associée à la consommation de poisson, d'œufs, de fruits et légumes et de fibres. Mais ces observations restent des associations et non des facteurs causaux comme en témoignent l'hétérogénéité des résultats obtenus dans les différentes études [221].

### **1.4.2.3. Prise d'antibiotiques et maladie de Crohn**

On note une augmentation de l'utilisation d'antibiotiques dans les pays industrialisés. Des études cliniques ont montré que les patients atteints de MC ont reçu plus d'antibiotiques avant le diagnostic de la maladie que des témoins sains [222].

D'autres études ont montré que la consommation d'antibiotiques dans l'enfance augmenterait le risque d'apparition de MC pédiatrique en corrélation avec le nombre de prises des médicaments [223, 224]

#### **1.4.2.4. Autres facteurs environnementaux**

Quelques études ont investigué la contribution de la pilule contraceptive dans le développement des MICI. Malgré le manque d'association causale, il semblerait que les contraceptifs oraux constituent un facteur de risque accru [225].

Etant donné la disparité de la prévalence de la MC entre les différentes zones géographiques la piste de l'exposition solaire a été étudiée. En France métropolitaine, il semblerait que l'incidence de la MC soit inversement proportionnelle à l'ensoleillement. Cette association pourrait être la résultante d'un défaut de production de vitamine D suite à une faible exposition au soleil [226].

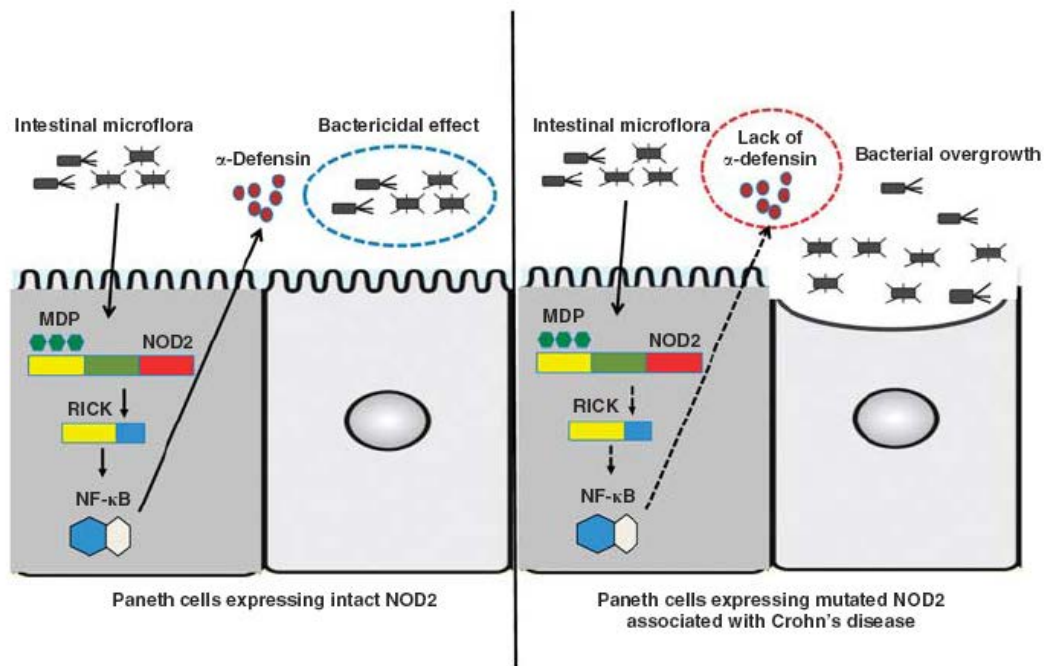
### **1.4.3. Rôle de l'immunité innée dans le développement de la MC**

#### **1.4.3.1. Dérégulation de l'immunité innée**

##### Nod2

Comme nous l'avons vu plus haut, les mutations du gène Nod2 ont été associées à la MC. Ces mutations, localisées au sein ou à proximité du domaine de reconnaissance des ligands, ont été associées à une diminution de l'activation de NF $\kappa$ B en réponse au MDP empêchant ainsi l'élimination des bactéries [71, 227]. Il est cependant encore difficile d'établir quels sont les mécanismes reliant les mutations de Nod2 avec l'apparition de la maladie. Deux hypothèses principales établissent un lien entre ces deux événements.

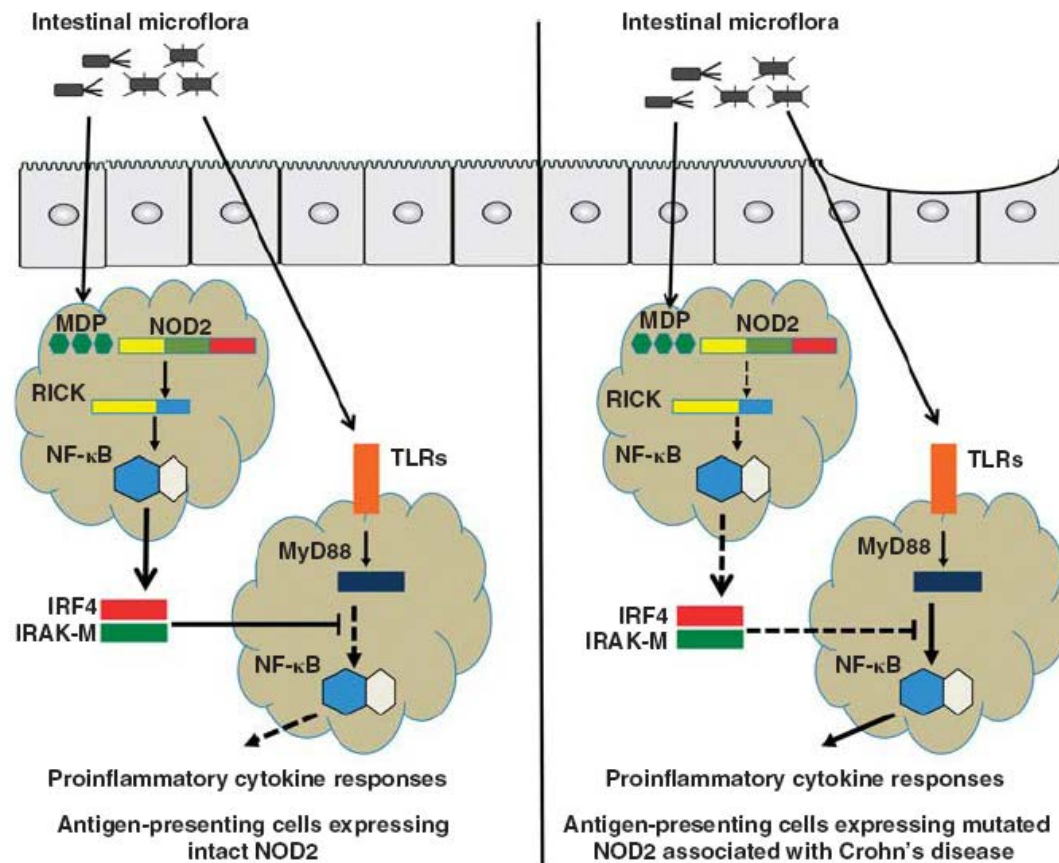
La première hypothèse suggère que la perte de fonction de NOD2 provoque une réduction de la production de peptides antimicrobiens dans les cellules épithéliales intestinales. Cette diminution conduit à un défaut de la fonction barrière permettant ainsi la pénétration de bactéries luminales dans l'épithélium et entraînerait l'établissement de l'inflammation (Figure 14). En effet, Nod2 contribue au maintien de la fonction barrière en participant à la production de peptides antimicrobiens (décrit plus bas).



**Figure 14 : La production en défensines est altérée dans un contexte Nod2 muté [228].**

En conditions physiologiques Nod2 permet la production de défensines par l'intermédiaire de NF $\kappa$ B contrôlant ainsi la charge bactérienne en contact avec l'épithélium intestinal (Partie gauche du schéma). La perte de fonction du gène Nod2 entraîne une diminution de la quantité de défensines produites par les cellules de Paneth conduisant à une augmentation de la charge bactérienne intestinale ce qui pourrait faciliter l'inflammation (Partie droite du schéma).

La deuxième hypothèse propose que NOD2 puisse réguler négativement les réponses initiées par les TLR participant à la mise en place de la tolérance intestinale. Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse. Tout d'abord l'activation de NOD2 par son ligand, le MDP, peut réduire la production de cytokines inflammatoires induite par TLR2 [229]. De plus, des souris portant le transgène Nod2 présentent des réponses TLR diminuées [230]. Puis, les souris déficientes pour le gène *Nod2* présentent une surexpression des TLR2 et 4 [231]. Enfin, l'action régulatrice de NOD2 résulterait de l'activation de IRF4 (IFN regulatory factor 4), inhibiteur des TLR [9]. (Figure 15)



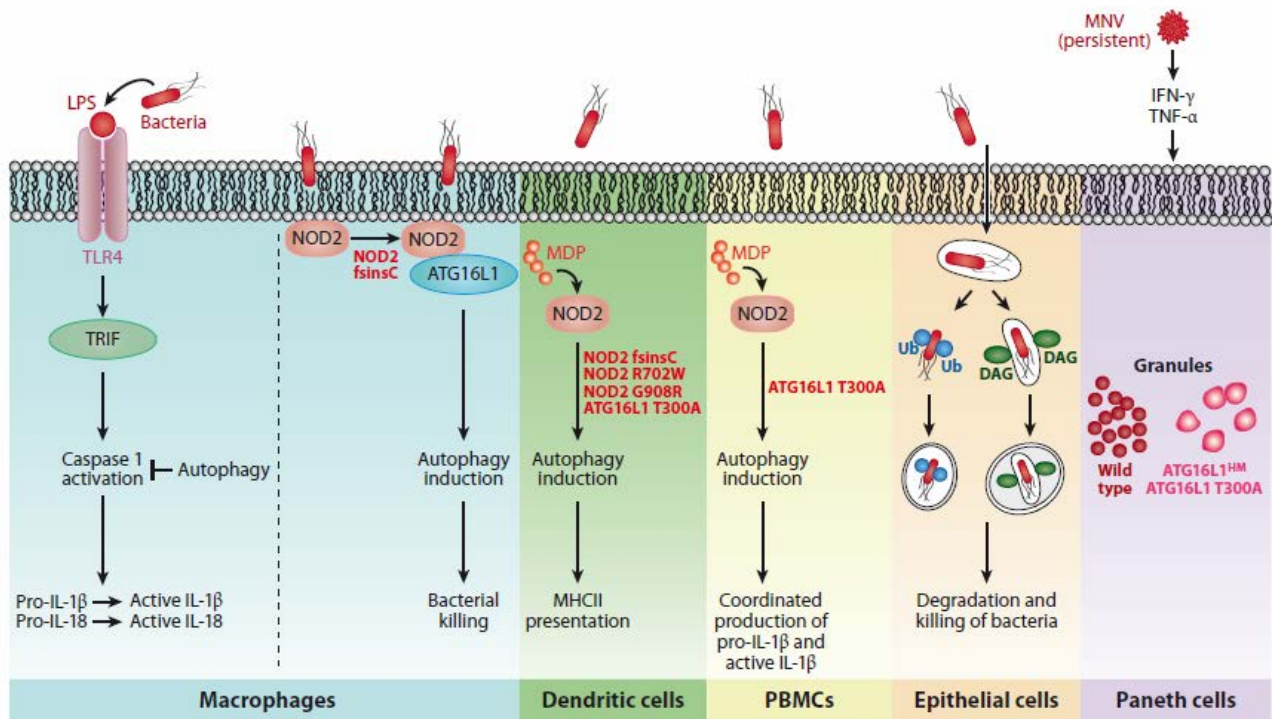
**Figure 15 : Régulation négative de la voie des TLR par Nod2 [228].**

Chez les cellules présentatrices d'antigènes Nod2 induit l'expression de régulateurs de la voie de signalisation des TLR tel que IRF4. Cette régulation négative contribuerait au maintien d'une réponse pro-inflammatoire faible en vue de maintenir l'homéostasie intestinale (Partie gauche du schéma). La régulation de la voie des TLR ne serait pas effective si Nod2 est muté pouvant provoquer une réponse inflammatoire conduite par les TLR en réponse au microbiote intestinal (Partie droite du schéma).

### Autophagie

L'autophagie étant un mécanisme important pour l'élimination des pathogènes intracellulaires [232], une déficience dans un de ses régulateurs pourrait conduire à la persistance des micro-organismes et à une inflammation. Deux polymorphismes de gènes impliqués dans l'autophagie sont associés à la MC, ATG16L1 et IRGM. Les souris déficientes pour IRGM sont incapables d'éliminer les pathogènes intracellulaires tels que *Listeria monocytogenes* et *Toxoplasma gondii* [233]. Récemment un troisième gène, dont les polymorphismes sont déjà connus pour leur implication dans la MC, a été relié à l'autophagie : Nod2. NOD2 participe à l'autophagie des bactéries invasives en recrutant la protéine ATG16L1 au site d'entrée de la bactérie [88]. Ce lien entre deux gènes de susceptibilité à la MC suggère qu'une dérégulation de l'axe NOD2/ATG16L1 pourrait favoriser l'apparition de la maladie.





**Figure 16 : Rôle des mutations de Nod2 et Atg16l1 dans l'autophagie [234].**

L'autophagie contrôle l'inflammation en participant par exemple à la maturation de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 chez les macrophages. En présence de mutations de Nod2 et/ou d'Atg16l1 l'autophagie est diminuée pouvant conduire à un défaut d'élimination des pathogènes et des virus, à un défaut de présentation antigénique par le CMH de classe II et à un défaut de production et d'activation de l'IL-1 $\beta$ .

#### 1.4.4. Le microbiote dans le développement de la MC

L'implication du microbiote dans l'établissement de la MC est confortée par l'utilisation de traitements antibiotiques montrant un effet bénéfique chez les patients [235]. D'autre part, les régions de l'intestin présentant de fortes densités bactériennes comme le côlon présentent des lésions inflammatoires plus prononcées. Au contraire, des traitements à base de probiotiques (*E.coli* Nissle [236], *Saccharomyces boulardii* [237]) peuvent améliorer la colite.

Des modèles murins expérimentaux appuient également cette hypothèse puisque l'absence de flore empêche l'apparition de colite chez les souris déficiente pour l'IL10 présentant habituellement des colites spontanées [238]. Chez ces souris l'introduction de *Lactobacillus sp* prévient l'apparition de colites alors que la monoassociation de souris IL10 KO avec *E.faecalis* ou *E.coli* [239, 240] entraîne une colite.

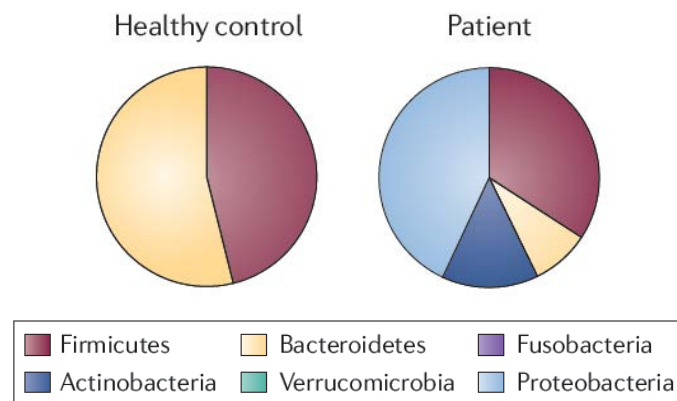
Le développement de la MC semble donc associé à une modification de la flore intestinale. Bien que l'implication d'un agent pathogène particulier dans le

développement de la MC soit peu probable, un déséquilibre qualitatif et quantitatif du microbiote intestinal, appelé dysbiose, pourrait intervenir.

#### 1.4.4.1. Dysbiose chez les patients atteints de MC

Les études du microbiote intestinal chez les patients atteints de MICI ont montré une perte de diversité microbienne ainsi qu'un nombre accru de bactéries associées aux muqueuses en comparaison avec des individus sains [241]. Les patients atteints de MC montrent une perte de diversité bactérienne au niveau de la muqueuse consécutive d'une diminution des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes* (Figure 17) en particulier les *Lachnospiraceae* et d'un enrichissement en *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Bacillus* [242]. On note une réduction de bactéries ayant des propriétés anti-inflammatoires et une augmentation des bactéries pro-inflammatoires. Une réduction de l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*, présentant des propriétés anti-inflammatoires, a également pu être observée chez les patients Crohn [243]. Au contraire, l'abondance des *Enterobacteriaceae* est augmentée chez les patients durant les phases actives de la maladie, et en particulier la souche *Escherichia coli* entéroinvasive, associée à la muqueuse intestinale [244].

Les souris déficientes pour Nod2 ainsi que les patients porteurs d'une mutation du gène Nod2 présentent une composition altérée de leur microbiote intestinal et des quantités élevées de bactéries au niveau de leurs muqueuses iléales et de leurs fèces [245]. Cette altération microbienne supporte l'hypothèse qu'un dysfonctionnement de Nod2 pourrait conduire à une dysbiose responsable de la rupture de l'homéostasie et prédisposant à une inflammation.



**Figure 17 : Dysbiose chez les patients atteints de la MC [246].**

Répartition des phyla bactériens chez des individus sains et chez des patients atteints de la MC.

De plus, la transmission de bactéries commensales colitogènes peut déclencher une colite. Ainsi, les souris déficientes pour les gènes *Rag-2* (Recombination activating gene 2 codant une enzyme permettant la synthèse des récepteurs de cellules T et d'Ig) et T-bet (T-box transcription factor) présentent une dysbiose et développent des colites spontanées [247]. Cette colite peut être transmise par la mère à des souriceaux WT suggérant une transmission par l'intermédiaire du microbiote intestinal [248].

#### **1.4.4.2. Facteurs de l'hôte affectant la composition du microbiote favorisant la MC**

##### Les jonctions serrées dans la MC

La barrière intestinale participe au maintien de l'homéostasie. Par conséquent son intégrité est un facteur important dans la pathogénèse intestinale. Les patients atteints de la MC présentent une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale. Cette perméabilité accrue résulte de la diminution de l'expression des protéines composant les jonctions serrées telles que la E-cadherine, la  $\beta$ -caténine [249] et les claudines [250].

##### La production de mucus dans la MC

Une production de mucus normale ou plus abondante a pu être observée chez les patients atteints de la MC [251, 252]. En effet, cette production accrue de mucus résulterait de l'induction de facteurs de croissance permettant la différenciation des cellules caliciformes du côlon chez les patients durant l'inflammation. De plus, l'expression des gènes *Muc1* et *Muc4*, codant pour les protéines du même nom participant à la formation du gel de mucus présentent une expression accrue dans le côlon des patients [253]. Des changements dans la composition en mucines pourraient affecter la formation du gel de mucus et le rendre incapable de procurer une protection adéquate pour la muqueuse vis-à-vis des bactéries intestinales pathogènes. Pour preuve, les bactéries intestinales retrouvées chez les patients atteints de MICI sont capables de pénétrer dans le mucus plus profondément et pourraient par conséquent envahir plus aisément la muqueuse [254]. Outre sa composition, certaines espèces bactériennes peuvent fragiliser le mucus et sont retrouvées en quantité plus importante chez les patients. C'est le cas de *Ruminococcus gnavus* et *Ruminococcus torques* sécrétant des glycosidases

capables de dégrader les mucines et en particulier MUC2 [255]. Cette fragilisation de la matrice de mucines par *Ruminicoccus* pourrait ainsi faciliter la dégradation du mucus par les autres bactéries.

### La production de peptides antimicrobiens dans la MC

Le nombre important de bactéries retrouvées dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC résulte, en partie, d'un défaut de production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales. Chez ces patients, la production des  $\alpha$ -défensines HD5 et HD6 iléales par les cellules de Paneth est réduite, et d'autant plus si ils sont porteur d'une mutation du gène *Nod2* [82]. L'expression du transgène codant pour HD5 dans un modèle murin peut modifier la composition des bactéries commensales de l'intestin grêle [3], confirmant ainsi l'importance des défensines sur les communautés microbiennes intestinales.

Dans la MC colonique, une diminution de la production des  $\beta$ -défensines HBD1, HBD2, HBD3 et HBD4 ainsi que la cathélicidine LL-37 par les entérocytes a été également rapportée [256, 257]. Dans le cas de HBD1, l'expression de cette défensine serait maintenue dans les cellules épithéliales grâce au récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) [258].

Chez la souris *Nod2* déficiente, a été également observée une diminution des défensines Defcr4 (Defensin-related cryptdin 4) et Defcr-rs10 (Defensin-related cryptdin (Defcr)-related sequence 10) après infection bactérienne. Ceci suggère l'implication de NOD2 dans la production de peptides antimicrobiens, indispensables à la protection contre l'infection [4]. D'autres PRR participent à la production de peptides antimicrobiens, comme Reg3 $\beta$  et Reg3 $\gamma$  dont l'expression a été montrée comme dépendante de MyD88, l'adaptateur principal des TLR, mais indépendante de NOD2 [259].

Outre les récepteurs innés, la production de peptides antimicrobiens peut également être modulée par l'autophagie. Ainsi, la déficience du gène *ATG16L1* chez la souris ou une mutation chez l'Homme résulte en une diminution et une désorganisation des granules des cellules de Paneth contenant les défensines [260]. Les polymorphismes *Nod2* et *Atg16l1* peuvent donc interférer dans la production de défensines.

## La production d'IgA dans la MC

Les IgA maintiennent l'homéostasie entre l'hôte et les bactéries commensales. La production d'IgA est dépendante de la flore. Ainsi, on note une moins forte production d'IgA avec une stimulation par des bactéries Gram positives en comparaison avec des bactéries à Gram négatives. Mais il existe certaines espèces bactériennes qui jouent un rôle plus important dans la production d'IgA. C'est le cas de l'espèce SFB (Segmented Filamentous Bacteria), appartenant aux *Clostridiales* qui est capable d'induire la production d'IgA au niveau muqueux [261].

Malgré le rôle protecteur exercé par les IgA à l'encontre des pathogènes, une production trop importante peut promouvoir l'inflammation en réduisant la quantité des bactéries protectrices intestinales. C'est certainement ce qui peut être observé chez les patients atteints de MICI. En effet, les patients atteints de MICI présentent une augmentation de leurs cellules productrices d'IgA et d'IgG corrélée à la sévérité de l'inflammation [262]. De plus, chez ces patients on retrouve des anticorps dirigés à l'encontre de micro-organismes ou d'antigènes de micro-organismes comme des anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* [263].

## **2. Conséquence aux MICI le cancer colorectal**

### **2.1. Facteurs de risque**

Plus de 1 million de nouveaux cas de cancer colorectal (CCR) sont diagnostiqués chaque année et cette pathologie est la 3<sup>ème</sup> plus commune des cancers en terme de fréquence. Le CCR peut avoir pour causes des facteurs génétiques familiaux, des facteurs environnementaux, la présence d'agents bactériens spécifiques ou encore une inflammation intestinale chronique.

Les patients atteints de MICI présentent un risque accru de développer un CCR. Bien que ce risque soit plus particulièrement corrélé à la colite ulcéraire il a également récemment été associé à la maladie de Crohn. Les patients atteints de la MC présentent un risque augmenté de 2 à 3 fois de développer un CCR en comparaison avec une population standard du même âge. De plus, il semblerait que le CCR apparaisse plus tôt chez les patients atteints de la MC, en moyenne autour de 50 ans, soit 20 ans plus tôt que la population standard [264].

NOD2 étant un des facteurs majeur de prédisposition à la MC, plusieurs études ont cherché à associer les mutations de ce gène avec l'apparition du cancer colorectal.

Malgré des résultats contradictoires entre les différentes populations étudiées, une méta-analyse a pu associer les polymorphismes R702W, G908R et 3020insC avec une augmentation du risque de CCR dans des populations Caucasiennes [265]. Mais le rôle de Nod2 dans l'apparition du cancer colorectal reste ambigu.

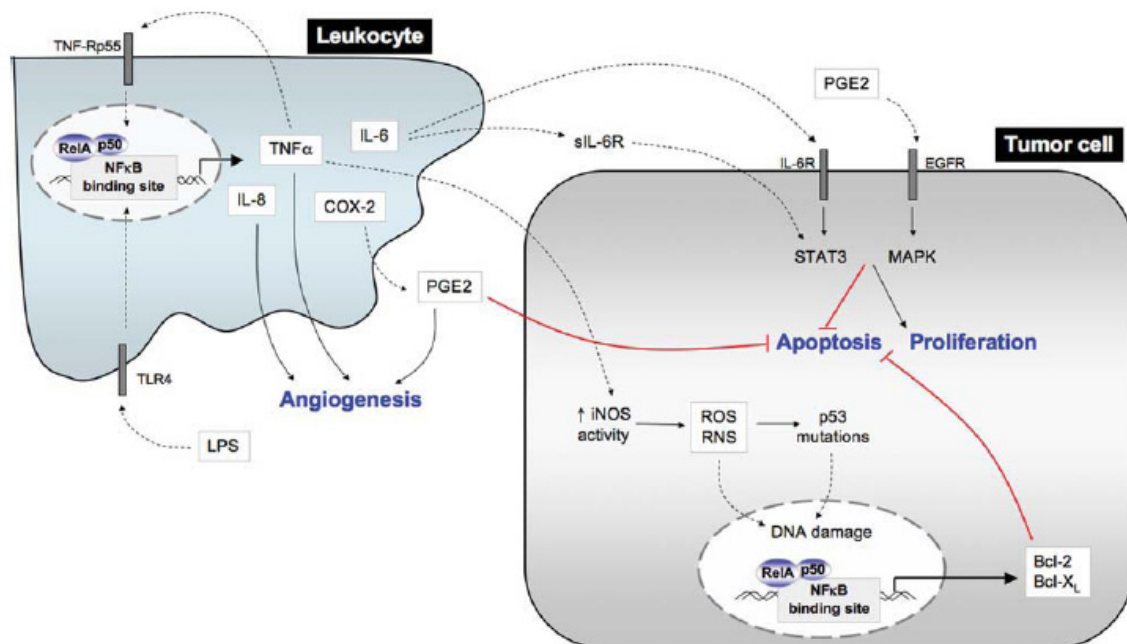
## **2.2. Inflammation et CCR**

Trois étapes importantes dirigent la carcinogénèse : l'initiation tumorale, la promotion tumorale et la progression tumorale. Durant la phase initiatrice des lésions permanentes de l'ADN cellulaire ont lieu en réponse à des mutagènes physiques ou chimiques ayant pour conséquence l'activation d'oncogène ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Puis, durant la promotion tumorale, les cellules génétiquement altérées se multiplient consécutivement à une augmentation de la prolifération ou une réduction de l'apoptose cellulaire pour former une tumeur. Enfin, durant la phase de progression, la tumeur s'étend et peut migrer vers des sites secondaires (formation de métastases) [266].

Certains médiateurs de l'inflammation peuvent contribuer aux différentes étapes de la carcinogénèse. Ainsi, le mécanisme principal pouvant initier la tumorigénèse est le stress oxydatif. Suite à un stimulus pro-inflammatoire, l'expression de l'enzyme iNOS (inductible nitric oxide synthase) par l'intermédiaire de NF $\kappa$ B permet la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) et nitrogénées (RNS) exerçant un effet mutagène sur l'ADN cellulaire [267].

L'ablation de NF $\kappa$ B dans les cellules épithéliales et myéloïdes conduit à une diminution de la tumorigénèse en restaurant la balance entre croissance et apoptose cellulaire [268]. Cette observation supporte une implication importante de la voie de signalisation NF $\kappa$ B dans la tumorigénèse. En effet, NF $\kappa$ B induit la production de Bcl2 et Bcl-X<sub>L</sub> intervenant dans l'inhibition de l'apoptose [269]. De plus, cette voie initie la transcription de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IL-8 et l'IL-6 ainsi que du médiateur inflammatoire COX2, favorisant la survie cellulaire et la croissance de la tumeur [266]. COX2 exerce son effet pro-tumoral par la production de la prostaglandine PGE2 (Prostaglandine E2) qui potentialise l'inflammation et inhibe l'apoptose. Ce médiateur est notamment retrouvé chez des patients atteints de CCR [270]. La progression tumorale est également facilitée grâce à l'angiogénèse favorisée par l'IL-8, l'IL-1, le TNF $\alpha$  et la PGE2 modulant

l'environnement de la tumeur [269]. Enfin, NFκB contribue à la dissémination du cancer en provoquant la synthèse de molécules d'adhésion, de MMP, de protéases et de chimiokines. (Figure 18)



**Figure 18 : Mécanismes de l'inflammation impliqués dans la tumorigenèse [269].**

Au niveau des leucocytes intestinaux, l'activation de NFκB par des signaux pro-inflammatoires provoque la production de facteurs pro-tumoraux comme l'IL-6, le TNFα, l'IL-8 et COX-2 favorisant l'angiogénèse et la survie cellulaire. Au niveau épithélial, la production de ROS et RNS grâce à une augmentation de l'activité de iNOS induit des mutations de l'ADN initiant la tumorigenèse. L'activation de NFκB régule l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> aidant à la progression tumorale.

### 2.3. Microbiote et CCR

Comme nous l'avons déjà vu précédemment le microbiote intestinal peut participer à l'établissement de l'inflammation. Et, une inflammation chronique favorise l'apparition du CCR. Par conséquent la composition bactérienne de l'intestin peut jouer un rôle dans l'établissement du CCR.

Le développement du cancer associé à la colite (CAC) est dépendant de la composition qualitative et quantitative de la flore intestinale [271]. Dans le modèle de CCR chez des souris *I10* KO présensibilisées avec un carcinogène, l'AOM (azoxyméthane), en absence de microbiote, le développement de cancer n'est pas possible [272]. Ces résultats sont en faveur de l'implication de la flore dans le CCR. De plus, certaines souches bactériennes particulières pourraient promouvoir la

tumorigenèse. C'est les cas notamment de *Bacteroides fragilis* enterotoxinogène [273], *Helicobacter spp* [274] et *Enterococcus faecalis* [275]. En plus de son effet inflammatoire favorisant la tumorigenèse, le microbiote pourrait exercer son effet pro-tumoral en provoquant l'activation métabolique de carcinogènes et de mutagènes comme c'est le cas pour l'AOM [276].



## Objectifs du travail de thèse

Chez l'adulte, le tractus gastro-intestinal contient une multitude de bactéries commensales dont le nombre est estimé à  $10^{14}$ . Plusieurs genres bactériens sont retrouvés de façon majoritaire dans le côlon dont *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* [103]. Les phyla les plus représentés étant les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes* et les *Proteobacteria*.

Ces populations bactériennes présentent de nombreux effets bénéfiques pour l'hôte en participant à la régulation des cellules immunitaires [142, 277] et en maintenant l'homéostasie intestinale. Le microbiote constitue également une barrière empêchant l'invasion de la muqueuse par des micro-organismes délétères.

Une perte de l'homéostasie intestinale suite à l'expansion ou la perte de certains composants du microbiote peut entraîner des pathologies chez la souris et chez l'Homme. Une composition altérée de la flore intestinale, aussi appelée dysbiose, est un des facteurs favorisant le développement des MICI.

Des différences de composition de microbiote intestinal ont été mises en évidence chez des patients atteints de MICI [246]. De plus, certaines souches pourraient intervenir de façon protectrice chez ces patients [6] alors que d'autres pourraient exercer un effet pro-colitogène [278].

D'autre part, les patients porteurs d'une mutation du gène *Nod2* prédisposés au développement de MICI, ainsi que les souris déficientes pour *Nod2* présentent des changements dans leur composition et leur charge bactérienne intestinale [245]. De plus, une dysbiose a également été observée chez des patients présentant un cancer colorectal [279], dont le risque de développement est accru chez les patients atteints de MICI.

La flore elle-même aide au maintien de la barrière épithéliale en induisant la production de peptides antimicrobiens comme les défensines [280] et Reg3 $\gamma$  [281] qui permettent l'élimination des bactéries indésirables.

L'immunité innée participe également à la régulation du microbiote intestinal via les TLR et les NLR. NOD2 peut exercer son rôle dans le maintien de l'homéostasie de différentes façons. Tout d'abord, NOD2 est exprimé par les cellules de Paneth dans

l'intestin et permet la production de cryptdines [4], importantes pour lutter contre les bactéries pathogènes et limiter une multiplication trop importante des bactéries commensales. D'autre part, NOD2 est impliqué dans la défense intestinale en participant à la production de cytokines pro-inflammatoires [229]. En régulant le microbiote intestinal, NOD2 participerait donc au maintien de la tolérance.

Dans ce contexte, au cours de mes trois années de doctorat, mes travaux se sont principalement portés sur l'étude des liens entre la régulation de l'inflammation intestinale et le développement de cancers colorectaux dans le modèle de cancer associé à la colite (CAC) combinant un carcinogène, l'azoxyméthane, et une colite chronique induite par du DSS. Je me suis notamment intéressée au rôle de *Nod2*, un facteur génétique connu comme prédisposant à la maladie de Crohn. Ce facteur se situe à l'interface entre le microbiote intestinal, les cellules épithéliales et les cellules immunitaires de l'hôte. Compte tenu du rôle de NOD2 dans la régulation du microbiote, j'ai également pu étudier l'impact de la flore intestinale et plus particulièrement de la dysbiose dans le développement de la colite et de la tumorigenèse.

## Résultats

### **Article 1 : NOD2-dependent licensing of the microbiota intrinsically prevents transmissible intestinal inflammation and tumorigenesis in mice.**

Aurélié Couturier, Thomas Secher, Ateequr Rehman, Robert Haesler, Ludovic Huot, Sylvain Normand, Teddy Grandjean, Aude Bressenot, Anne Delanoye-Crespin, Olivier Gaillot, Stefan Schreiber, Yves Lemoine, Bernhard Ryffel, David Hot, Gabriel Núñez, Grace Chen, Philip Rosenstiel, Mathias Chamaillard.

**Article soumis dans « The Journal of Clinical Investigation »**

#### **Problématique**

Les interactions entre l'hôte et les micro-organismes ont lieu principalement à la surface des muqueuses. La muqueuse intestinale a pour fonction principale d'assurer les échanges entre l'hôte, le microbiote intestinal et le contenu luminal du tube digestif. Le microbiote intestinal exerce des fonctions structurales et métaboliques essentielles à l'hôte et assure la protection de la barrière muqueuse à l'encontre des pathogènes. Cette protection apportée par la flore commensale, nécessite néanmoins une régulation fine afin d'éviter une réaction immunitaire inappropriée vis-à-vis des commensaux en vue de garantir l'homéostasie de la muqueuse intestinale. Cette régulation de l'écosystème bactérien et de ses interactions avec l'hôte est prise en charge par le système immunitaire. NOD2 peut participer à cette régulation par le contrôle de la charge et la composition bactérienne via la production de peptides antimicrobiens. La dysbiose et les mutations de *Nod2* ont pu être associées à la MC mais il reste à déterminer si la dysbiose peut suffire à provoquer la pathologie ou si elle en est la conséquence.

#### **Approche expérimentale et résultats de l'article**

Dans un modèle expérimental de colite et de cancer associé à la colite chez la souris, la déficience en *Nod2*, ou son adaptateur protéique *Rip2*, provoque une susceptibilité importante en comparaison à des animaux WT. De plus, une dysbiose du microbiote intestinal observée chez les animaux déficients peut être transférée par co-hébergement et par la mère. Une fois transférée la dysbiose semble alors

augmenter la susceptibilité d'animaux WT à ces deux modèles d'inflammation intestinale. Une sélection du microbiote intestinal à l'aide d'une antibiothérapie à large spectre ainsi qu'une réduction de l'inflammation par administration d'anti IL-6R est capable de réduire la susceptibilité des animaux à la tumorigenèse. D'autre part, le risque de colite peut être exacerbé chez des animaux WT par l'administration de microbiote intestinal issu de souris déficientes pour *Nod2*. Ces données indiquent la nécessité de la dysbiose pour l'instauration d'un sur-risque.

Par conséquent, NOD2 prend part à la régulation de la composition du microbiote ce qui participerait à la protection de l'intestin à l'encontre de lésions inflammatoires persistantes conduisant à des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

## TITLE PAGE

### **NOD2-dependent licensing of the microbiota intrinsically prevents transmissible intestinal inflammation and tumorigenesis in mice.**

Aurélie Couturier<sup>1,2,3,4,12</sup>, Thomas Secher<sup>5,6,12</sup>, Ateequr Rehman<sup>7,8,12</sup>, Sylvain Normand<sup>1,2,3,4</sup>, Adèle De Arcangelis<sup>9</sup>, Robert Haesler<sup>8</sup>, Ludovic Huot<sup>1,2,3,4</sup>, Teddy Grandjean<sup>1,2,3,4</sup>, Aude Bressenot<sup>10</sup>, Anne Delanoye-Crespin<sup>1,2,3,4</sup>, Olivier Gaillot<sup>1,2,3,4</sup>, Stefan Schreiber<sup>7</sup>, Yves Lemoine<sup>1,2,3,4</sup>, Bernhard Ryffel<sup>5</sup>, David Hot<sup>1,2,3,4</sup>, Gabriel Nùñez<sup>11</sup>, Grace Chen<sup>11</sup>, Philip Rosenstiel<sup>7,13</sup>, Mathias Chamaillard<sup>1,2,3,4,13</sup>.

<sup>1</sup>University Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. <sup>2</sup>Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019 Lille, France. <sup>3</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8204, F-59021 Lille, France. <sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019 Lille, France. <sup>5</sup>CNRS, UMR6218 IEM, Orléans, France. <sup>6</sup>Present address: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1043, F-31024, Toulouse, France. <sup>7</sup>Present address: Universitätsklinikum Freiburg, D-79095, Freiburg, Germany. <sup>8</sup>Institut of Clinical Molecular Biology, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, 24105 Kiel, Germany. <sup>9</sup>IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Department of Development and Stem Cells, Inserm U964, CNRS UMR7104, Université de Strasbourg, Illkirch 67400 France. <sup>10</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U954, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. <sup>11</sup>University of Michigan, Ann Arbor, USA. <sup>12</sup> These authors contributed equally to this work. <sup>13</sup>These authors share senior authorship.

The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Correspondence should be addressed to:** Dr. Mathias Chamaillard, Ph.D.

## ABSTRACT

Instability in the composition of gut bacterial communities, referred as dysbiosis, has been associated with common human intestinal disorders such as Crohn's disease and colorectal cancer. Here, we show that dysbiosis coupled with Nod2 deficiency is sufficient to cause a reversible and communicable risk for colitis and colitis-associated carcinogenesis in mice. Loss of either Nod2 or Rip2 resulted in a pro-inflammatory microenvironment that precipitated epithelial dysplasia upon chemical-induced injury that can be ameliorated by antibiotics or anti-IL-6R treatment. The genotype dependent disease risk was communicable through maternally-transmitted microbiota even to wild-type hosts. Importantly, the enhanced sensitization of the colonic mucosa to chemical insults was intrinsically conferred by fecal dysbiosis of *Nod2*- and *Rip2*-deficient mice even before disease onset. In addition, reciprocal microbiota transplantation rescued *Nod2*<sup>-/-</sup> mice from disease risk and led to long-term changes in intestinal microbial consortia. Conversely, disease risk was enhanced in wild-type hosts that were recolonized with fecal dysbiotic microbiota of *Nod2*<sup>-/-</sup> mice, demonstrating that licensing of dysbiotic microbiota is mandatory for disease risk. Altogether, our results unveil an unexpected function for Nod2 in shaping a protective assembly of gut bacterial communities. Intentional manipulation of disease predisposing genotype-driven dysbiosis may therefore represent a novel therapeutic approach.

## INTRODUCTION

The gut flora is composed of innumerable albeit highly diversified microorganisms that are dominated by *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* (1, 2). The coexistence of resident commensals with a single layer of epithelial cells plays a beneficial role in regulating both energy harvesting from our nutrients and the functionality of our immune system (3, 4). In the absence of commensals, the colonic mucosa displays defects in Goblet cells differentiation (5) and architecture of lymphoid tissues, including isolated lymphoid follicles (6). Importantly, not all commensals have the same potential to maintain such quiescent and protective immunity (7). It has therefore been speculated that disturbances of this balance state, herein referred as dysbiosis, may directly or indirectly contribute to pathogenesis of several immune-mediated intestinal illnesses, such as Crohn's disease (CD) and colitis-associated colorectal carcinoma (CAC).

CD is characterized by relapsing-remitting inflammatory responses that have a tendency to develop where the bacterial load is the highest. As such, short-term antibiotic treatment is used as unspecific therapy in some CD patients (8). Noteworthy, certain *Proteobacteria* are increased whereas the abundance of *Firmicutes* members is decreased in CD that remains one of the major risk factor for CAC (9). Epithelial dysplasia in this setting is thought to result from impaired intestinal barrier function that conjointly depends on a loss of mutualistic communication between a consortium of microorganisms and host molecules, which remain almost entirely unknown. A clear understanding of the functional role of dysbiosis is thus necessary to address the issue if defined dysbiotic state is sufficient to instigate CD and/or CAC and to evaluate the potential preventive interventions targeting the gut microbiota in humans.

The nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2 (NOD2) is thought to play a decisive role in maintaining microbial tolerance at the intestinal barrier (10-13), but its role in inciting innate and adaptive immunity is complex (14-16). NOD2 is composed of a C-terminal leucine-rich repeats region (LRR), a centrally located nucleotide-binding oligomerization domain and a N-terminal tandem of caspase recruitment domains (CARDs) that intracellularly interact with the adaptor Rip2 (17). Within the colonic mucosa, NOD2 is expressed by various cell populations, including epithelial and myeloid cells. In mice, genetic ablation of *Nod2* results in enhanced abundance of both ileal- and fecal-associated Bacteroidaceae (18-20). Likewise, the CD-associated *NOD2* variant L1007fsinsC is associated to enhanced mucosal colonization by numerous microorganisms that belong to either Bacteroidaceae and Enterobacteriaceae in humans (19, 21). However, it remains to be determined whether dysbiotic states caused by this CD-predisposing primary immunodeficiency may be sufficient to instigate disease or may be solely a consequence of the underlying disorder. Herein, our results identified for the first time, to our knowledge, an unexpected function for *Nod2* on the protective assembly of the gut bacterial communities on intestinal homeostasis against intestinal inflammation and tumorigenesis in mice.



## RESULTS

### **Nod2/Rip2 deficiency confers a maternally-transmissible colitis risk to immunocompetent hosts.**

Given that stable composition of commensals is at least in part an inherited trait, we hypothesized that some of the missing heritability in CD could be explained by the transmission of a disease-predisposing bacterial community over the generation and within offsprings. We therefore performed co-housing and cross-fostering experiments with either *Nod2*- or *Rip2*-deficient mice in an experimental model of colitis consisting of either acute or chronic exposure to dextran sodium sulfate (DSS). Briefly, co-housed wild-type mice were left together with *Nod2*- or *Rip2*-deficient mice, referred as CH-WT<sub>*Nod2*<sup>-/-</sup></sub> and CH-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> respectively, or were separated from mutant mice before disruption of the colonic barrier by DSS insults, referred as SCH-WT<sub>*Nod2*<sup>-/-</sup></sub> and SCH-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> respectively (Figure 1, A). Unexpectedly, both CH-WT (Figure 1, B-C) and SCH-WT (Figure 1, D) mice had an increased loss-of-body weight together with a more severe rectal bleeding, diarrhoea and histological score (Figure 1, E-F) when compared with single-housed WT (SH-WT) animals. Likewise, both mortality and morbidity, including weight loss, diarrhea and rectal bleeding, were significantly enhanced during the recovery phase in single-housed mutant mice, referred as SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> and SH-*Rip2*<sup>-/-</sup> respectively, when compared to similarly treated SH-WT animals (Supplementary Figure 1, A-B). These findings therefore demonstrate that the enhanced sensitivity of co-housed WT mice to DSS is more likely a consequence of the inheritance of a disease-predisposing microbiota rather than by the more severe DSS-induced colitis observed in mutant mice. Similar to what was observed with CH-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> mice, loss-of-body weight (Figure 2, A) and colon shortening (Figure 2, B) of WT animals that were reared with

a *Rip2*<sup>-/-</sup> mother since birth, referred as CF-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub>, were more severe than that of WT progeny mice (CF-WT). Consistently, microscopic examinations of H&E- and PAS-stained colonic sections revealed enhanced histopathological changes such as colon crypt loss, immune cells influx and ulceration of the epithelial surface in CF-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> mice than in controls (Figure 2, C). It thereby suggested that vulnerability to colitis in mutant mice across generations may likely arise from the inheritance of a dysbiotic bacterial flora that would sensitize the colonic mucosa to chemical insults.

### **Dysbiosis coupled to *Nod2* deficiency spontaneously sensitizes the colonic mucosa to chemical injury.**

We next aimed to specify downstream mechanisms whereby the disease-predisposing microbiota of *Nod2*-deficient mice may sensitize to colitis the colonic mucosa of CH-WT animals in response to chemical injury. To do so, WT animals were either single-housed or co-housed for 4 weeks with either *Nod2*- or *Rip2*-deficient mice. Gene expression analysis was performed on extracted RNA from isolated colon of either SH-WT and CH-WT<sub>*Nod2*<sup>-/-</sup></sub> animals (Figure 3, A and Supplementary table, 1). Validation of gene expression changes by qRT-PCR analysis revealed an enhanced expression of Claudin-5 (*Cldn-5*) in CH-WT<sub>*Nod2*<sup>-/-</sup></sub> and CH-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> animals when compared to single-housed control animals (Figure 3, B). Likewise, transcript level of *Cldn-5* was found up-regulated in both disease-at-risk SCH-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> and CF-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> upon injury by DSS (Figure 3, B). In addition, gene ontology analyses revealed an enhanced representation of molecules involved in apoptosis, necrosis and tumorigenesis (Figure 3, C-D and Supplementary table, 2). Collectively, our results suggest that components of the microbiota from either *Nod2*-

or *Rip2*-deficient mice may per se predispose to colitis by failing to coordinate expression of molecules involved in the integrity of the colonic epithelium.

### **A communicable risk for colitis-associated colorectal cancer in the absence of Nod2 and Rip2.**

Colorectal carcinogenesis remains a dreaded complication of human CD that is thought to result from a complex microbial-driven inflammatory response (22). Furthermore, NOD2 has been shown to predispose to colorectal cancer as well as to gastric lymphoma in humans (23, 24). We therefore assessed whether the communicable risk for colitis in *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice may accelerate CAC development in CH-WT mice. To do so, single-housed and co-housed mice were next subjected to a well-characterized experimental model of CAC (25). Under these conditions, tumor load was enhanced at the distal gut of both CH-WT<sub>*Nod2*<sup>-/-</sup></sub> and CH-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> when compared to SH-WT animals (Figure 4, A-C). Similarly, genetic ablation of Nod2 or Rip2 enhanced CAC-associated mortality and morbidity in two independent Specific-Pathogen Free (SPF) environments (Figure 4, D-E and Supplementary Figure 2, A-B). Moreover, higher tumor burden (Figure 4, D-E) and growth (Figure 4, F) in SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> mice was preceded with enhanced epithelial proliferation as determined by BrDU incorporation in vivo (Figure 4, G). Taken together, these results demonstrate that Nod2 or Rip2 deficiency engendered a maternally-transmissible set of microorganisms that may sensitize the intestinal mucosa to both colitis and CAC even in a non-genetically predisposed host.

### **Broad-spectrum antibiotic treatment improves disease severity, bacterial burden and immune cells trafficking in *Nod2*-deficient mice upon injury.**

The unexpected transmission of disease-predisposing microorganisms coupled to either *Nod2* or *Rip2* deficiency suggested to us that manipulation by antibiotics may limit the development of dysplasia arising from a pro-inflammatory colonic habitat. Under a broad-spectrum antibiotic combination therapy, the genotype-driven morbidity and mortality were significantly improved when compared to untreated animals. Noteworthy, disease severity was also better in antibiotic treated wild-type animals. This observation pointed to a more general role of bacterial commensals in the pathogenesis of colitis and CAC in the absence of *Nod2* or *Rip2*. Changes in gut microbiota after antibiotics treatment significantly improved body weight loss (Figure 5, A) that coincided with reduced *Bacteroides* load (Figure 5, B) and decreased recruitment of CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> granulocytic cells within the colonic mucosa of *Nod2*-deficient animals (Figure 5, C). In contrast, we failed to observe any changes in the influx of either CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> nor CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>IA/IE<sup>hi</sup> macrophages (Figure 5, D-E). Lastly, tumor growth was significantly lowered in antibiotics-treated mice regardless of the genotype as determined by weight-to-length ratio (Figure 5, F). Taken together, certain bacterial commensals were identified to instigate either individually or in combination an exaggerated inflammatory response that favors intestinal tumorigenesis upon injury.

### **Gene-plus-dysbiosis interaction results in enhanced IL-6-mediated response to injury.**

We therefore aimed to characterize the inflammatory milieu that favors neoplastic transformation in response to bacterial dysbiosis coupled to *Nod2*

deficiency. We first isolated RNA from the terminal colon after one cycle of DSS-AOM. A genome-wide expression analysis revealed a Nod2-dependent transcriptional profiling according to the treatment conditions as illustrated by a Venn diagram (Figure 6, A). Among transcripts with a fold change over 1.5 ( $p < 0.01$ ), a factorial design analysis unveiled distinct expression changes of 94 genes upon antibiotic treatment as a result of Nod2 deficiency (zone 3 in Venn Diagram on Figure 6, A). Differential expression changes for 81 out of 94 genes were observed in opposite directions (Figure 6, B). qRT-PCR analysis confirmed differential expression of several molecules involved in the pathogenesis of both CD and CAC, including interleukin-6 (*Il-6*), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*Ptgs2*) and secreted phosphoprotein 1 (*Spp1*), that is also known as early T lymphocyte activation 1 (Figure 6, A-B, Supplementary Table 3 and Supplementary Figure 3). Similar gene expression changes were also observed in DSS-treated *Nod2*-deficient mice when compared to similarly treated WT animals (Supplementary Figure 1, G). In line with what observed at the transcriptional level, IL-6 secretion was significantly enhanced during the early phase of tumor initiation but not during tumor progression in CH-WT<sub>*Rip2*<sup>-/-</sup></sub> when compared to SH-WT animals (Supplementary Figure 5). Furthermore, immunohistochemical analysis revealed a robust expression of IL-6 in dendritic-like cells and a lower but detectable expression of IL-6 in intestinal epithelial cells upon DSS challenge (Figure 6, C). To further specify which infiltrating cells may express IL-6, we performed double immunofluorescence staining with anti-IL-6 and either anti-CD11b, anti-CD4 or anti-CD8a antibodies. In line with previous findings showing that dendritic cells may be a major source of IL-6 production upon injury by DSS (28), none of the aforementioned subset of CD11b<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> nor CD8<sup>+</sup> cells was found to express detectable IL-6 in either diseased wild-type and *Rip2*-deficient mice

(Supplementary Figure 6). Moreover, expression of both *Reg3 $\beta$*  and *Reg3 $\gamma$*  that are linked to the IL-6-mediated signaling pathway (26, 27) was down-regulated in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice upon injury (Supplementary Figure 3 and Supplementary Table 3). Of this set of 81 genes (Figure 6, B), gene-ontology analysis identified a significant over-representation of molecules involved in the inflammatory response, cell movement, arthritis and proliferation of cells, in general, and of connective tissue cells and lymphocytes, in particular (Figure 6, D-E and Supplementary Table 4). To further define which genes are influenced by the genotype-plus-dysbiosis interaction, a complementary additional microarray analysis was performed between WT and *Nod2*-deficient mice according to treatment in order to identify gene expression changes that were more likely due to disease severity (Supplementary Figure 4 and Supplementary Table 5). Gene ontology analysis on 66 genes that were differentially expressed in different directions between WT and *Nod2*-deficient mice confirmed a differential response to intestinal bacteria in diseased *Nod2*-deficient animals that is related to cell movement and proliferation of lymphocytes (Supplementary figure 4, B and Supplementary Table 6). Given that TNF-alpha is also a key regulator of intestinal inflammation and tumorigenesis in TRUC mice in response to bacterial commensals (29), we next quantified protein levels of Tnf- $\alpha$ . Unlike what observed in TRUC mice, we failed to detect any *Nod2*-dependent changes of Tnf- $\alpha$  secretion over time (Supplementary Figure 5). Likewise, qRT-PCR analysis failed to reveal significant changes in gene expression of *Tnf- $\alpha$* , but also of either *Il-17A*, *Il-17F* nor *Il-22* (Supplementary Figure 3). Furthermore, we failed to observe any *Nod2*-dependent changes in gene expression of both *Il-6* and Tnf- $\alpha$  between germ-free and specific-pathogen free mice before any injury (Supplementary Figure 7).

### **Enhanced IL-6 secretion is required for tumor growth in *Nod2*- and *Rip2*-deficient mice.**

We next tested whether such enhanced early IL-6-mediated response to injury may contribute to the promotion of intestinal tumorigenesis in these mice. To this end, *Nod2*<sup>-/-</sup> mice were treated weekly from day 31 to day 56 with an intraperitoneal injection of a monoclonal anti-IL-6R antibody that was previously shown to suppress Th1 cell-mediated colitis in mice (30). Endoscopic (Figure 7, A) and macroscopic (Figure 7, B) evaluation revealed that anti-IL-6R treatment in *Nod2*- and *Rip2*-deficient mice resulted in a significant decrease in tumor burden as compared to untreated mutant animals. Consistently, IL-6R neutralization resulted in a normalization of transcript levels in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice for the following antibiotic-sensitive molecules, namely *Il-6*, *Ptgs2*, *Spp1*, *Reg3γ* and *Reg3β* (Figure 7, C). This is in accordance with previous findings where genetic ablation of IL-6 reduced tumor load and growth (27), while its hyperactivation promoted tumor progression (31, 32). Collectively, we show that the higher risk for colitis and CAC in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice requires an excessive IL-6-mediated response to certain disease-predisposing bacteria.

### **IL-6-mediated control of disease progression is linked to changes in microbial ecology in the absence of *Nod2*.**

We next asked whether disease progression is linked to any specific *Nod2*-dependent changes in bacterial communities through the IL-6-mediated signaling pathway. A culture-independent analysis of the mucosal-associated microbiota was performed by multiplex pyrosequencing of V1-V2 region amplicons of bacterial 16S rRNA genes. The impact of host genotype, treatment and intestinal tumorigenesis on the composition and structure of microbial communities, was assessed by performing

multivariate Principle coordinate (PCoA) and Canonical Correspondence Analysis (CCA). PCoA plots generated on unifrac distances revealed a clear separation between genotypes in untreated animals, but not following anti-IL-6R treatment (Figure 8, A). CCA was performed to detect interaction between bacterial composition at genera level and other factors that include intestinal tumorigenesis, genotype and IL-6R treatment. This analysis identified Nod2 genotype and IL-6R treatment as major contributing factors for the shifts in the composition of mucosal-associated bacterial communities (Figure 8, B) that primarily include changes in abundance of commensals related to the Bacteroidetes phyla (Figure 8, C) that include *Rikenella* and *Paludibacter* as identified by SIMPER analysis (Figure 8, D). Notably, IL-6R treatment simultaneously leads to enhanced abundance of *Rikenella* in the absence of Nod2 ( $P < 0.02$ ), suggesting that protective assembly of the microbiota may result from specific gene-plus-treatment interaction. In contrast, A lower contribution of tumor growth on dysbiosis was revealed by CCA (Figure 8, B). Hierarchical clustering of species level operational taxonomic units (OTUs) was performed using ranked normalized data (Supplementary Figure 8). The diversity of the consortium of mucosal-associated bacteria was enhanced in both tumoral and chronically inflamed colonic mucosa following anti-IL-6R treatment (Figure 8, E-F). Taken together, neutralization of the IL-6-mediated signaling pathway was identified to restore complex Nod2-dependent control of the colonic-associated microbiota in mice.

### **Colitis risk in *Nod2*-deficient mice is reversible after fecal transplantation.**

Given that the risk for colitis in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice was communicable to *Nod2*-sufficient animals (Figure 1), we formally evaluated whether fecal dysbiosis coupled



to Nod2 deficiency may intrinsically confer disease risk even in the absence of any signs of inflammation. After 4-week colonization with 0.2mL supernatant of fresh fecal homogenate of either non-diseased *Nod2*<sup>-/-</sup> or *Nod2*<sup>+/+</sup> mice that were reared within SPF conditions, recolonized germ-free WT (GF-*Nod2*<sup>+/+</sup>) mice were challenged with one cycle of AOM/DSS. Under this condition, weight loss and histopathological scores of *Nod2*<sup>+/+</sup> mice that were recolonized with fecal flora from *Nod2*<sup>-/-</sup> mice [*Nod2*<sup>-/-</sup>->GF-*Nod2*<sup>+/+</sup>] was significantly higher when compared to that from GF-*Nod2*<sup>+/+</sup> mice that were reconstituted with fecal flora of *Nod2*<sup>+/+</sup> mice [*Nod2*<sup>+/+</sup>->GF-*Nod2*<sup>+/+</sup>] (Figure 9, A). Another characteristic lesion of DSS-induced colitis is the loss of the acid mucin-producing epithelial cells. Only recipients colonized with fecal microbiota from *Nod2*<sup>-/-</sup> mice exhibited a disappearance of PAS+ staining, a feature of mucin-expressing cells (Figure 9, B and E), suggesting that the fecal microbiota of *Nod2*<sup>-/-</sup> mice nascently contribute to disease risk. We next aimed to restore the ecological balance of the intestinal microbiome in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice and asked whether this would decrease their vulnerability to colonic injury. Germ-free *Nod2*<sup>-/-</sup> mice (GF-*Nod2*<sup>-/-</sup>) were generated and were recolonized with 0.2mL supernatant of fresh fecal homogenate of either SPF *Nod2*<sup>-/-</sup> or SPF *Nod2*<sup>+/+</sup> mice. As shown in Figure 9D-F, loss-of-weight, tissue erosions and immune cells influx was lowered in [*Nod2*<sup>+/+</sup>->GF-*Nod2*<sup>-/-</sup>] mice when compared to that in similarly treated [*Nod2*<sup>-/-</sup>->GF-*Nod2*<sup>-/-</sup>] animals. PCoA plot analysis clearly separated the microbiota composition and structure of recipients with an higher risk of colitis, which are [*Nod2*<sup>-/-</sup>->GF-*Nod2*<sup>-/-</sup>] and [*Nod2*<sup>-/-</sup>->GF-*Nod2*<sup>+/+</sup>], from those with a lower risk of colitis (Figure 9, G). Noteworthy, phylodiversity was significantly reduced in both [*Nod2*<sup>-/-</sup>->GF-*Nod2*<sup>-/-</sup>] and [*Nod2*<sup>-/-</sup>->GF-*Nod2*<sup>+/+</sup>] mice compared to [*Nod2*<sup>+/+</sup>->GF-*Nod2*<sup>-/-</sup>] (Figure 9, H). In addition, SIMPER analysis identified *Bacteroides*, *Escherichia/Shigella*,

*Robinsoniella*, *Paludibacter*, *Butyrivibrio* and *Lachnobacterium* as genera that contribute to at least 5% of the shifts in bacterial communities between recipients that are vulnerable and resistant to colitis. Notably, abundance of *Escherichia/Shigella*, *Robinsoniella* and *Paludibacter* was not consistent between [*Nod2*<sup>-/-</sup>->GF-*Nod2*<sup>-/-</sup>] and [*Nod2*<sup>-/-</sup>->GF-*Nod2*<sup>+/+</sup>] even if both group of animals were found at risk for colitis, suggesting that the latter changes did not correlate with disease risk (Supplementary Figure 9 and 10). In contrast, *Bacteroides* was found significantly enhanced in both WT ( $P<0,01$  and  $P<0,01$  respectively) and *Nod2*<sup>-/-</sup> ( $P<0,05$  and  $P<0,05$  respectively) recipients that were recolonized with disease-predisposing microbiota when compared to recipients recolonized with SPF WT microflora. In addition, *Butyrivibrio* and *Lachnobacterium* was significantly less preponderant in either WT ( $P<0,001$  and  $P<0,02$  respectively) and *Nod2*<sup>-/-</sup> ( $P=0,01$  and  $P<0,02$  respectively) recipients upon recolonisation with fecal microbiota of *Nod2*<sup>-/-</sup> donor when compared to [*Nod2*<sup>+/+</sup>->GF-*Nod2*<sup>+/+</sup>]. Collectively, our result demonstrated that the disease-predisposing flora of *Nod2*<sup>-/-</sup> mice intrinsically sensitize the colonic mucosa towards chemical insults before any onset of disease even in wild-type mice. More importantly, reciprocal microbiota transplantation rescued *Nod2*<sup>-/-</sup> mice from disease risk.

## DISCUSSION

Given its intimate relationship with the microbiome throughout the entire life, the intestinal epithelium is likely to coordinate immune homeostasis by fostering stability and resilience of its co-evolved microbiota. Notably, the absence of Rag2 and T-bet or of the Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) was shown to predispose to the emergence of transmissible disease-predisposing commensals in mice (29, 33). Understanding how the gut mucosa discriminates disease-predisposing from those that act as mutualists microorganisms may provide insights to disease onset and tumor progression in genetically predisposed individuals and their relatives. Herein, we identified for the first time an unexpected protective function for the CD-predisposing *Nod2* gene by configuring a concerted protective gut microbial ecology against intestinal inflammation and tumorigenesis in mice. Wild-type mice that were transiently co-housed with *Nod2*<sup>-/-</sup> or *Rip2*<sup>-/-</sup> mice showed indeed an enhanced susceptibility to colitis and colitis-associated colorectal cancer, demonstrating that *Nod2* deficiency created an ecological niche conferring a transmissible disease risk even to wild-type animals. More importantly, abnormal expression of molecules involved in epithelial barrier function was observed in wild-type animals upon co-housing not only during intestinal inflammation, but also before the induction of experimental colitis. This suggests that the microbiota of *Nod2*-deficient mice *bona fide* sensitizes the colonic mucosa towards injury. Noteworthy, an enhanced expression of Claudin-5, which is involved in the pathogenesis of CD (34), was observed in co-housed animals before and after injury. Whereas it could be argued that the observed changes in part were due to the differing inflammatory state, it is important to emphasize that GF animals recolonized with feces from non-diseased *Nod2*<sup>-/-</sup> mice showed enhanced vulnerability to DSS independently of the

recipient's Nod2 status. These observations pointed to a complex imprinting on the barrier function of the colonic mucosa by a transmissible dysbiosis that enhance its vulnerability to injury. Broad-spectrum antibiotic treatment abrogated the increased sensitivity of both wild-type and *Nod2*-deficient mice to DSS-induced intestinal inflammation and tumorigenesis. Consistently, a recent study highlighted a significant role of the CD-associated *NOD2* L1007fsinsC in development of gut microbiota (19, 21). We next detailed changes in the microbial consortia composition by culture-independent approach. Communicable disease risk to wild-type animals was primarily linked to changes in *Bacteroides*, *Butyrivibro* and *Lachnobacterium* that may have importance in the pathogenesis of human diseases (35). Notably, commensal *Bacteroides* species, but not colitis-enriched *Enterobacteriaceae*, were identified as a key determinant of disease risk in conventionally-raised genetically predisposed host (36). Our findings therefore illustrate the need to functionally assess not only a single commensals but rather disease-predisposing abilities of combination of commensals that may fail to negatively regulate inflammation and/or to outcompete with pathobionts even in non-genetically predisposed host. In addition, determining metabolic abilities of disease-predisposing combination of commensals may provide insights into how Nod2 may prevent their expansion and/or adhesion. That paradigm will promote selection of the most efficient combination of probiotic strains independently of the CD-predisposing Nod2 alleles.

In our study, disease severity was linked to an over-exuberant IL-6-mediated response to a dysbiotic microbiota that precipitated the progression of tumors in the absence of Nod2. These results further supports the concept that early changes in the gut microbiota may exert an imprinting on protective immunological responses that can be the premises of colorectal cancer in the context of a primary

immunodeficiency later in life (37, 38). These findings may be indeed of clinical importance as loss-of-function mutations of NOD2 enhanced risk for CD (10, 12) and colorectal cancer (39-41). The colonic mucosa of CD patients is characterized by an increased secretion of IL-6 that correlates with disease severity (42). IL-6 regulates differentiation and survival of epithelial cells by triggering activation of the associated Janus kinases (JAKs) and of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (31, 32). Upon injury, IL-6 is primarily secreted by dendritic cells that continuously inspect the luminal content (28, 32). In line with previous findings (32), we found detectable expression of IL-6 by dendritic-like cells but also by colonocytes upon DSS challenge. IL-6 may either bind its membrane receptor that is restricted to few cellular populations, such as macrophages. Alternatively –after shedding of the IL-6R as a soluble form- IL-6 may bind and trans-signal virtually all cell types through a soluble cytokine-receptor complex (43), as the co-receptor gp130 is expressed ubiquitously (44). Recent studies have also highlighted the key role of IL-6 in progression of tumors from chronically inflamed lesions. More importantly, mice deficient for IL-6 or STAT3 experienced reduced tumor load and growth in a model of colitis-associated cancer (27), while their hyperactivation promotes tumor growth (31, 32). Noteworthy, anti-IL-6R therapy and Nod2 genotype were found to primarily influence complex changes in the global structure of the disease-predisposing mucosa-associated flora. Future clinical and metagenomic studies should now investigate the contribution of the complete set of genetic variants in known CD and CAC risk genes to the overall control of potentially dysbiotic microbial community structures. Such knowledge will advance the development of modulating therapies aimed at restoring a mutualistic interaction between the microbiota and the vulnerable intestinal barrier in CD.

## METHODS

**Colitis, colitis-associated cancer.** Age- and gender-matched animals were housed five or ten per cages for single- and co-housing experiments respectively. Animals had free access to a standard laboratory chow diet in a half-day light cycle exposure and temperature-controlled Specified-Pathogen Free environment as determined by the FELASA recommendations. Experimental models were performed as previously described (45). Briefly, acute colitis was induced with 2% (w/v) DSS (molecular mass 35-40kDA; TdB Consultancy) dissolved in tap water and given *ad libitum* for 7 days followed by normal water. Colitis-associated cancer was induced with intraperitoneal injection of 8 mg/kg of Azoxymethane (Sigma) followed by exposure to 2% (w/v) DSS dissolved in tap water and given *ad libitum* for 4 cycles of 5 days separated by 7-day period of regular water. A cocktail combining streptomycin (Panpharma; 2g/L), gentamicin (Panpharma; 200mg/L), ciprofloxacin (Panpharma; 125µg/L) and bacitracin (Acros organics; 1g/L) was used. Neutralization was performed by giving intraperitoneally 1mg/mice of MR16.1 (Chugai Pharmaceuticals Co Ltd). Mouse endoscopy was performed using Coloview high-resolution system (Karl-Storz).

**Recolonization.** *Nod2*<sup>-/-</sup> GF mice were generated at TAAM-CNRS and were transferred into autoclaved sterile microisolator cages before gavage with 200µl of fecal homogenates as indicated (5 mice/cage). The remaining homogenate was kept frozen until processing for bacterial composition analysis.

**Gene expression.** Microarrays analysis was performed on distal colonic specimens as previously described (Agilent Technologies) (45). Differentially expressed genes (GEO accession number GSE32421 and GSE 36481) were filtered for a *p*-value < 0.01 by using moderated t-statistic with empirical Bayes shrinkage of SE. Statistics were corrected for multiple testing using a false-discovery rate approach. Gene-

ontology analysis was performed on all genes referred in Unigene (46) by using the third hierarchical level of the ontology tree (Ingenuity Pathway Analysis). qRT-PCR analysis was performed as previously described (45).

**Histopathological, Immunohistochemistry and FACS analysis.** Paraffin-embedded 5µm sections of formalin-fixed colon specimens were stained with H&E or PAS. The slides were blindly examined by two investigators with an AxioPlan2 microscope (Zeiss). Colonic lamina propria cells were isolated as previously described (47) and analyzed on a BD Calibur II cytometer. The following primary antibodies were used anti-Ly6G Pe-Cy7 (clone1A8), anti-CD11b PerCP Cy5.5 (clone M1/70), anti-CD11c APC (clone HL3), anti-IA/IE FITC (clone 2G9) and Fc block (anti-CD32/CD16) (BD Pharmingen and R&D Systems).

For immunofluorescence staining, colonic segments were embedded in Cryomatrix (Shandon, Thermo Scientific) and frozen on dry ice. Cryosections (10 µm) were fixed 5 min in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS), washed in PBS-0.05% Tween20 (PBT), incubated for 30 min at room temperature in PBT-5% normal goat serum (saturation buffer), and then overnight at 4°C with primary antibodies diluted in saturation buffer. Sections were washed in PBT and incubated for 1 h with secondary antibodies. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Slides were mounted in Aqua Poly/Mount (PolySciences, Warrington, PA). The following antibodies were used: anti-Il-6 (M-19, sc-1265, Santa Cruz Biotechnology); anti-CD4 (GK1.5); anti-CD8a (53-6.7) and biotin conjugated anti-CD11b (M1/70) (all from BD Pharmingen™). The secondary antibodies used were: Alexa Fluor® 488-conjugated anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 594-conjugated anti-rat (Molecular Probes), and Cy3-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

For immunohistochemistry, 5 µm sections were deparaffinized and processed for antigen retrieval using 10 mM citrate buffer (pH6), washed with PBS, incubated 5 min in PBS-3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, washed in PBT, incubated for 30 min in saturation buffer and then overnight at 4°C with polyclonal anti-IL-6 antibody (M-19, sc-1265, Santa Cruz Biotechnology). Detection was performed with biotinylated secondary antibody, then avidin biotinylated peroxidase complex for 1 h and revealed with 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (Vectastain Elite ABC kit and DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections were counterstained with haematoxylin.

**Q-PCR and Pyrosequencing analysis.** Colonic and fecal samples were collected and stored frozen before DNA extraction for q-PCR analysis by using the Qiaamp DNA stool kit (Qiagen) and Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel) respectively. Absolute numbers of *Bacteroides* were determined by QPCR analysis on a Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) from serial dilutions of plasmid constructs with a reference 16S rDNA sequence. Pyrosequencing of extracted DNA was performed as previously described (19). A total of 1000 high-quality reads were generated from each biological replicates. The specific forward and reverse primers sequences are available upon request. 16S rRNA gene sequences with at least 97% similarity were clustered in to species level OTUs using average neighbour algorithm. Phylogenetic affiliation of each OTU was governed by using RDP taxonomy and template file. To visualize interactions between the microbial composition and structure, the host genotype, the anti-IL-6R treatment and the presence of tumor, Principle coordinate and canonical correspondence analysis were performed. Phylogenetic based (fastunifrac) beta diversity was on phylogenetic tree generated by using FastTree v2.0. Non abundance based unifrac matrices were calculated and visualized using



principal coordinate analysis (PCoA). PAST software was used for data visualization and for performing abundance based PcoA, Canonical correspondence analysis and SIMPER (Similarity percentage) analysis on the bacterial genera observed in pyrosequencing data. Divergence based phylogenetic diversity was calculated by phylo.diversity command implemented in mothur.

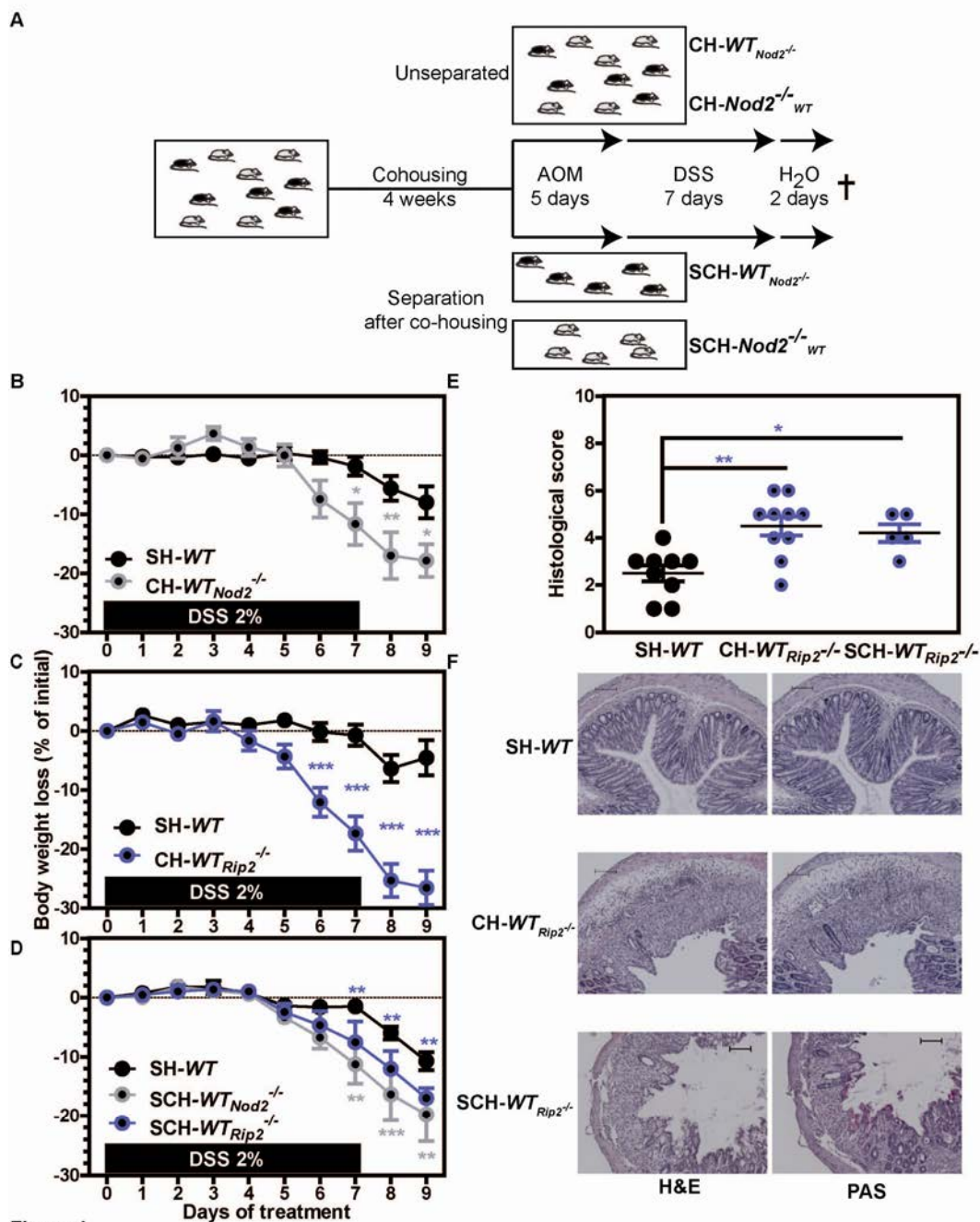
**Cluster generation.** OTUs were selected to contribute to the separation between wild-type and *Nod2*-deficient animals using the mann-whitney u-test with subsequent selection of the 20 best P-values. In parallel, OTUs which were present in less than 50% of all samples were excluded from the cluster analysis. Prior to clustering, OTU abundances were normalized using z-score normalization to make OTUs comparable. Clustering was performed with TIBCO Spotfire Integromics Biomarker Discovery, applying the Unweighted Pair Group Method using Arithmetic means of the pairwise distances as a clustering method and correlation as a distance measure.

**Statistics.** The non-parametric Kruskal-wallis or the parametric one-way ANOVA test with multiple Dunn's comparison test were used (GraphPad Software). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was defined at a level of  $P < 0.05$ .

**Study approval.** All animal studies were approved by the investigational review board of the Nord-Pas de Calais and by the Michigan University's Committee on Use and Care of Animals. All animal experiments were performed in an accredited establishment (N° B59-108) according to the governmental guidelines N°86/609/CEE.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

*Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice were kindly provided by RA. Flavell. We thank Karine Jambou, Estelle Douin and Nathalie Froux for excellent technical assistance in maintaining mice colonies. AC is a recipient of a PhD Fellowship from Inserm and region Nord-Pas-de-Calais. SN is a recipient of a Post-doctoral Fellowship from the Ligue contre le Cancer. This work was supported by grants from the FRM (BR and MC), the ARC (MC), the European Union-FEDER (MC and BR), Le Studium (BR), the DFG Cluster of Excellence Inflammation at Interfaces (SS and PR), the BMBF network Chronic Inflammatory diseases (PR) and DFG Ro 2994-1 (PR).



**Figure 1: The absence of NOD2/RIP2 confers a transmissible risk for colitis even to immunocompetent hosts.**

(A) Five days after AOM administration (at 8 mg/kg), age- and gender-matched SH-WT (black circles, n=5), SCH-WT<sub>Nod2</sub><sup>-/-</sup> (gray circles, n=5), CH-WT<sub>Nod2</sub><sup>-/-</sup> (gray circles, n=5), SCH-WT<sub>Rip2</sub><sup>-/-</sup> (blue circles, n=5) and CH-WT<sub>Rip2</sub><sup>-/-</sup> (blue circles, n=4) mice received ad libitum 2% (w/v) Dextran Sodium Sulfate (DSS; molecular mass 35-40kDa; TdB Consultancy) for 7 days followed by 2 days of regular drinking water. Mutant and WT animals were co-housed at a 3:2 or 1:1 ratio on the same diet for a 4-week period. Wild-type co-housed mice were either left with or separated from mutant mice before being challenged by one cycle of DSS-AOM. SH, SCH and CH refer to “single-housed”, “separated after co-housing” and “co-housed” animals respectively. Changes in body weight of CH-WT<sub>Nod2</sub><sup>-/-</sup> (B), CH-WT<sub>Rip2</sub><sup>-/-</sup> (C), SCH-WT<sub>Nod2</sub><sup>-/-</sup> and SCH-WT<sub>Rip2</sub><sup>-/-</sup> (D) were evaluated daily and compared to that in SH-WT animals. (E) Histological scoring was determined at day 9. (F) Representative H&E and PAS staining of paraffin-embedded longitudinal sections from colon of SH-WT, SCH-WT<sub>Rip2</sub><sup>-/-</sup>, and CH-WT<sub>Rip2</sub><sup>-/-</sup> mice at day 9 were depicted. Scale bar, 100 μm.

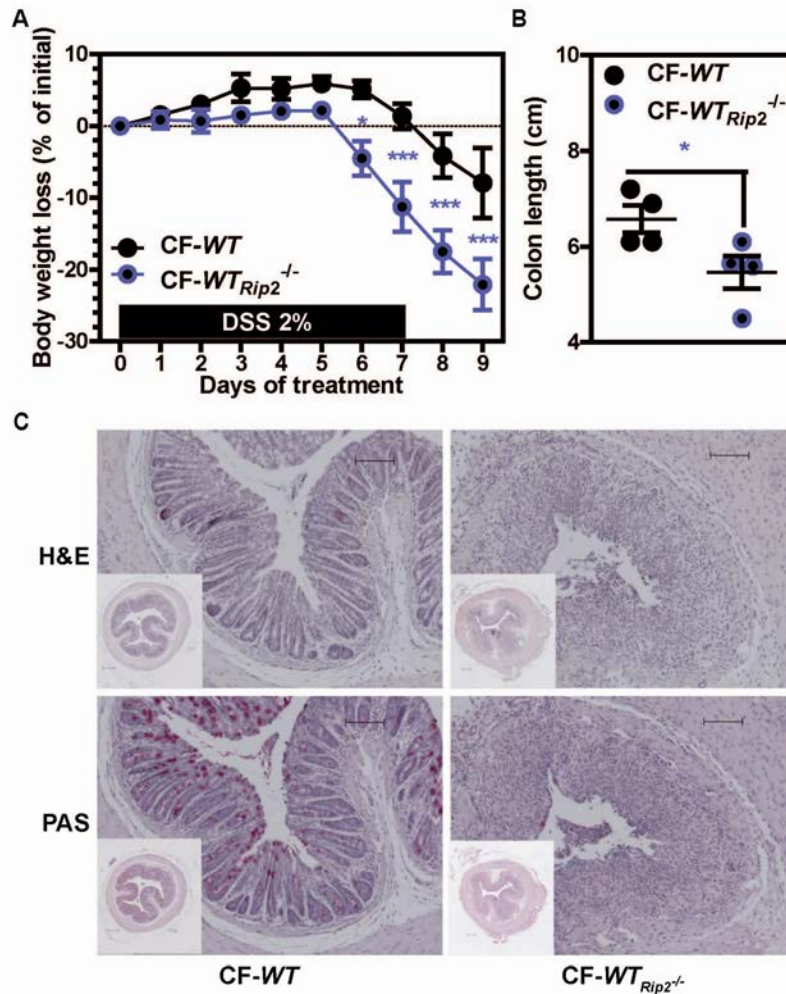


Figure 2

**Figure 2: The risk for colitis in *Rip2*-deficient mice is maternally transmissible.**

WT animals were reared with either a *Rip2*-deficient or -sufficient mother since birth (n=4). 5-weeks old cross-fostered mice were then exposed to one cycle of DSS-AOM as described earlier. Changes in body weight (A) and colon length (B) were evaluated daily. (C) Representative H&E and PAS staining of paraffin-embedded transversal sections from colon of CF-WT and CF-WT<sub>Rip2</sub><sup>-/-</sup> mice at day 9 were depicted. CF refers to cross-fostered animals. Scale bar, 100  $\mu$ m.

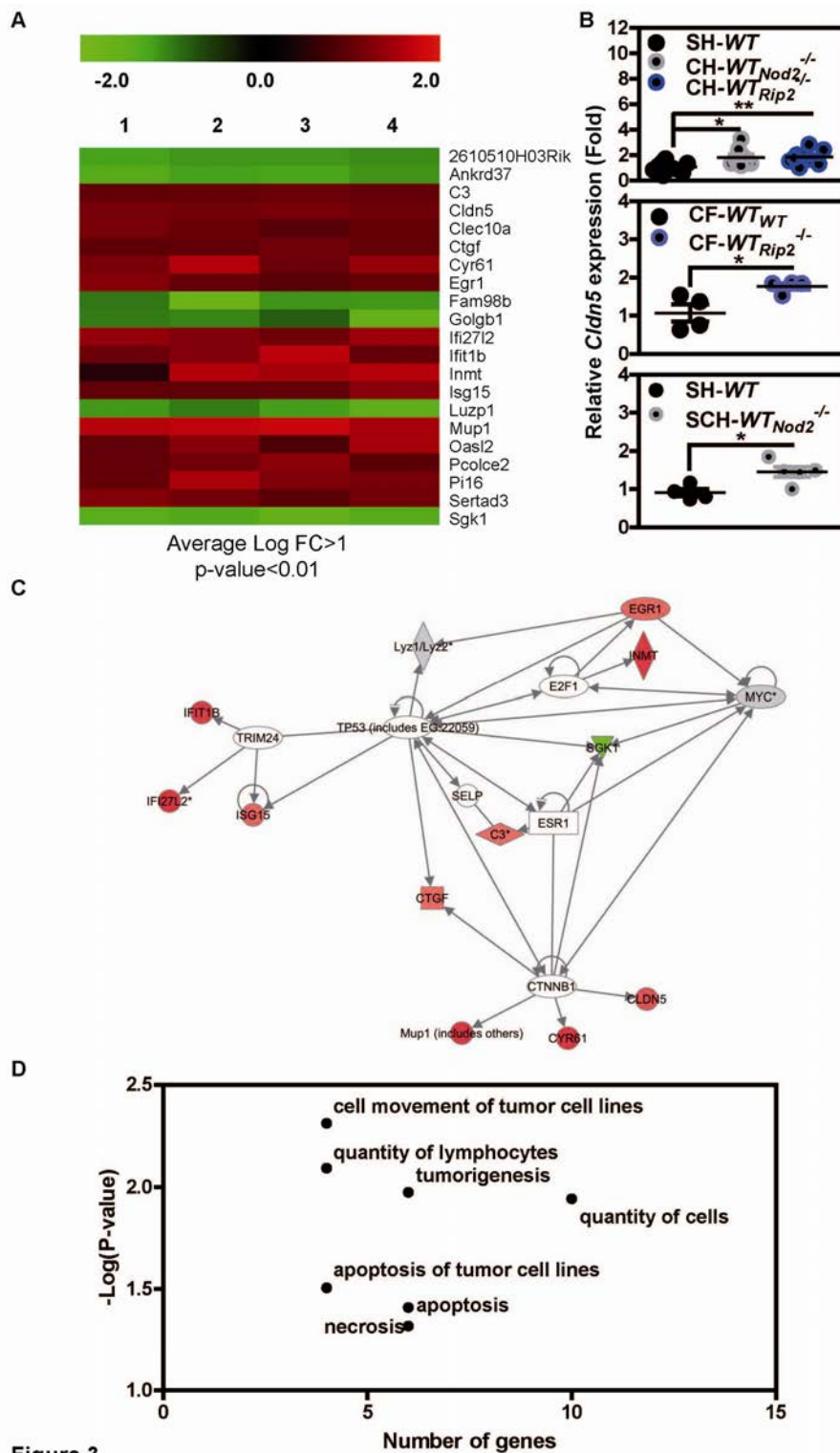


Figure 3

**Figure 3: Colonic response to dysbiosis coupled to *Nod2*-deficiency.**

WT animals were either single-housed (n=5) or co-housed at a 1:1 ratio with *Nod2*-deficient mice (n=5) on the same diet for a 4-week period. Microarray experiment was performed once on extracted RNAs from the colon of single-housed and co-housed WT animals. (A) heat-map, (B) validation of gene expression changes in *Cldn5* by qRT-PCR analysis, (C) functional networking (D) and gene ontology of differentially expressed genes as determined by the Ingenuity Pathway software. Significance is plotted as  $-\log(p \text{ value})$ . Only biological terms with a significant enrichment are displayed as determined by a  $|z\text{-score}| < -2$ .



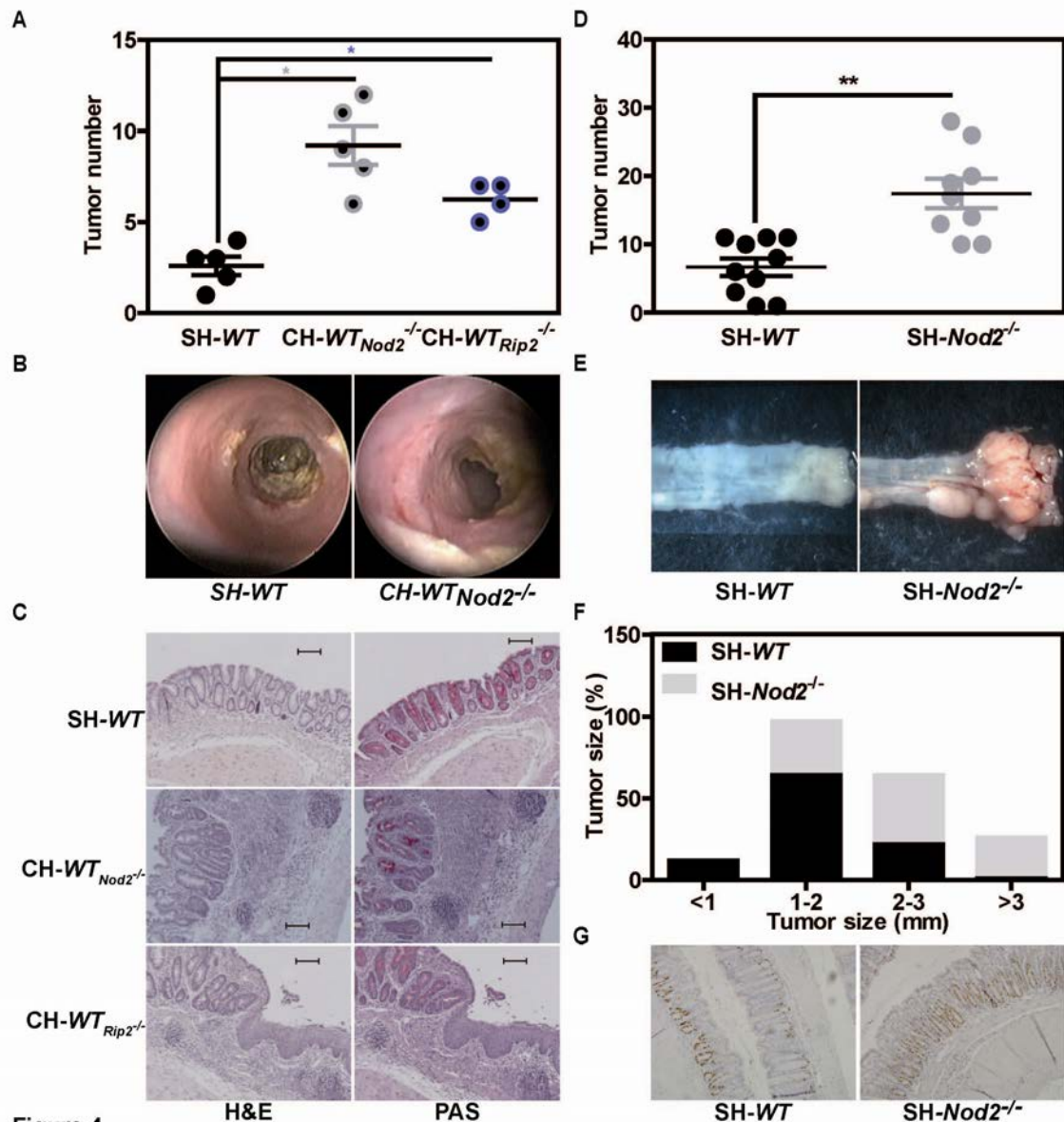
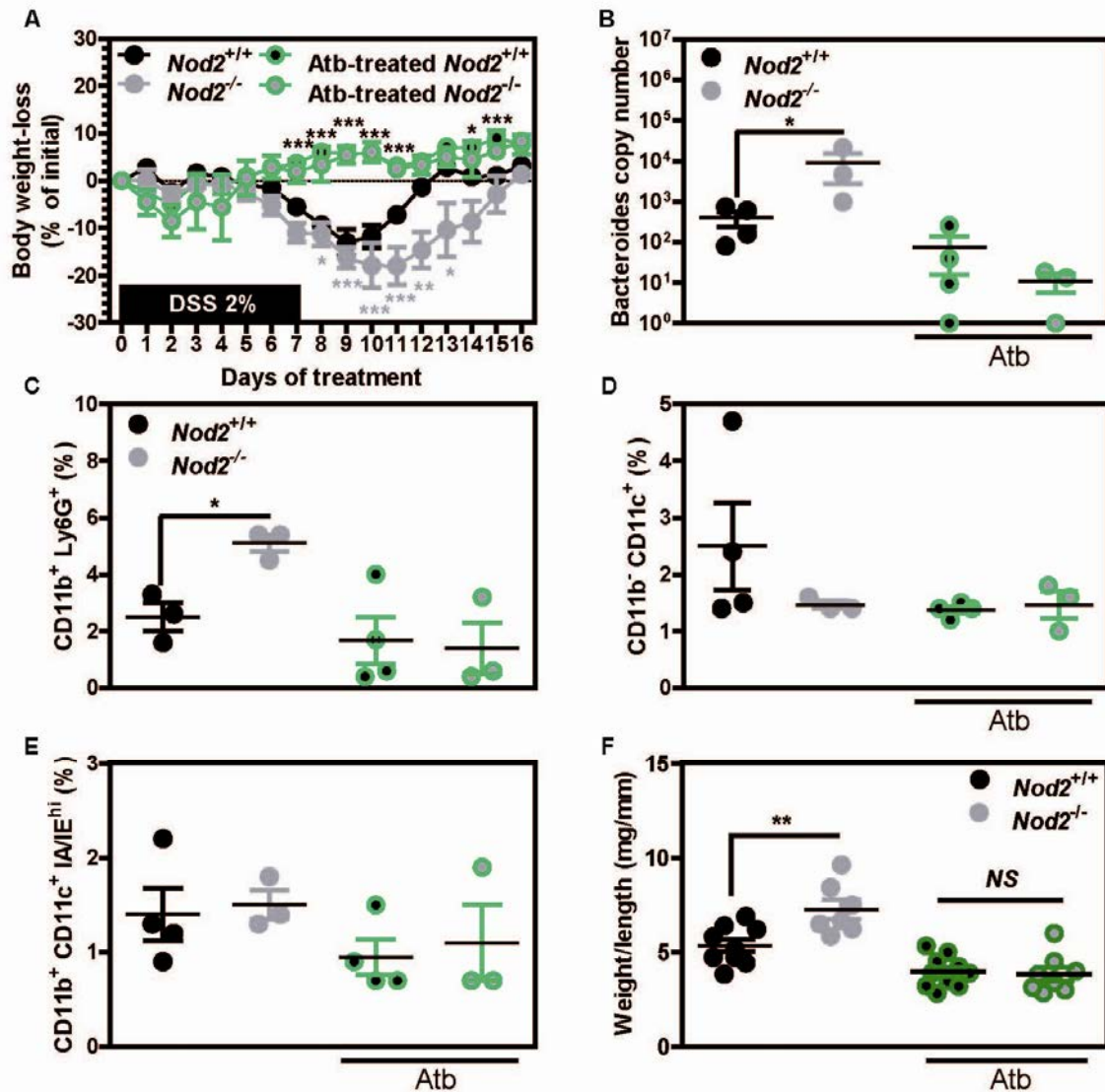


Figure 4

**Figure 4: *Nod2*-driven risk for colitis-associated colorectal cancer is communicable to wild-type host.**

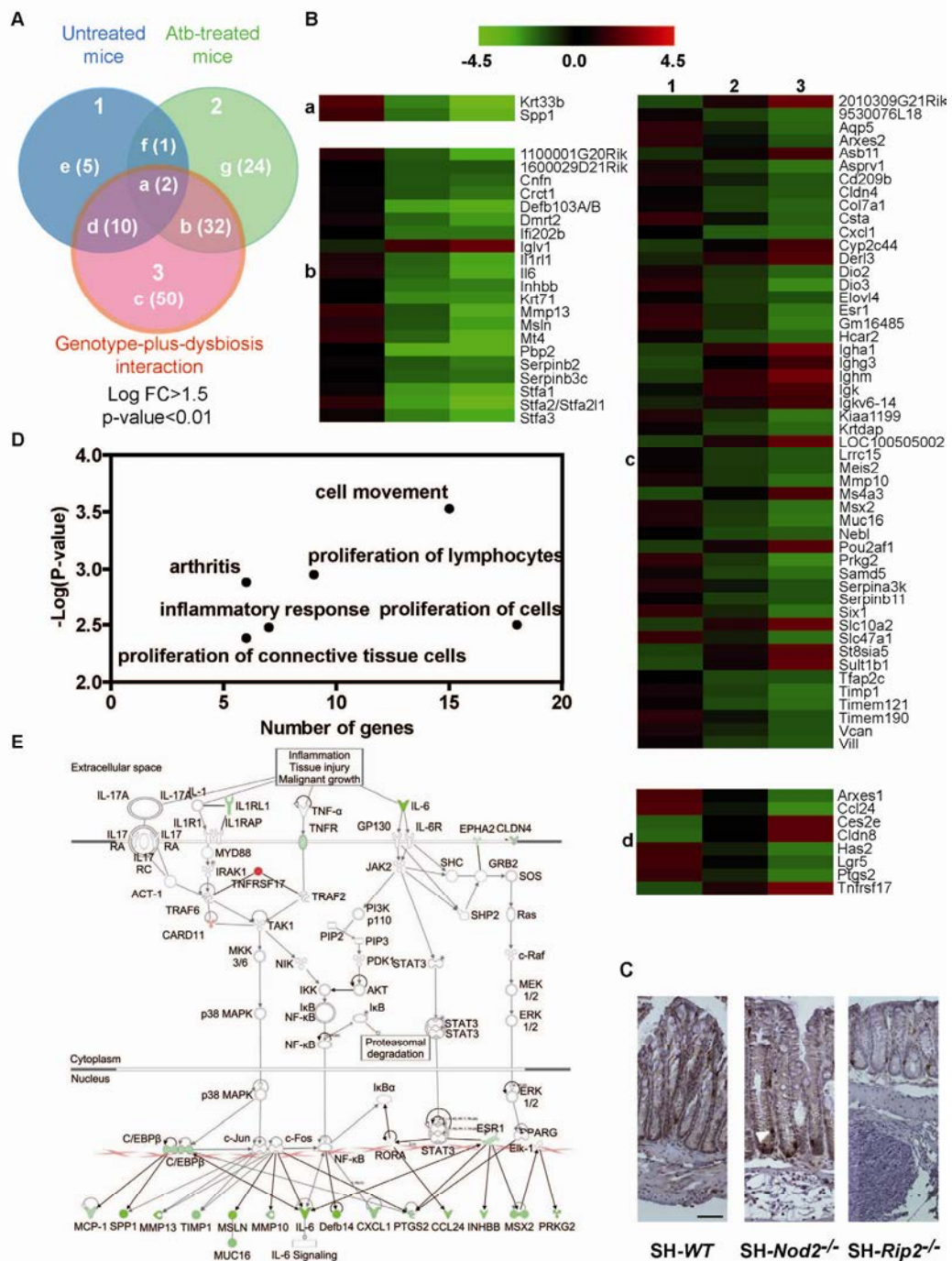
Five days after azoxymethane (AOM) administration (at 8 mg/kg), SH-WT (black circles), CH-WT *Nod2*<sup>-/-</sup> (black circles with gray border), CH-WT *Rip2*<sup>-/-</sup> (black circles with blue border) and SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles) mice were subjected to four rounds of 2% DSS for 5-days interspersed with 7-days access to regular drinking water mice. (A) Macroscopic and (B) endoscopic quantification of colonic tumor burden in SH-WT (n=5), CH-WT *Nod2*<sup>-/-</sup> (n=5) and CH-WT *Rip2*<sup>-/-</sup> (n=4) animals were performed at day 56 and 55 respectively. (C) Representative H&E and PAS staining of paraffin-embedded transversal sections from colon of SH-WT, CH-WT *Nod2*<sup>-/-</sup> and CH-WT *Rip2*<sup>-/-</sup> mice at day 56 were depicted. Scale bar, 100  $\mu$ m (D) Macroscopic quantification of colonic tumor burden in SH-WT (n=10) and SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> (n=10) animals was performed at day 56. (E) Representative photograph of dissected colon of SH-WT and SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> mice at day 56 were depicted. (F) Macroscopic quantification of colonic tumor growth in SH-WT and SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> animals was performed at day 56. (G) BrDU incorporation in vivo. Mean  $\pm$  SEM, are shown. Asterisk, significant difference P<0.05. SH and CH refer to single- and co-housed animals respectively.



**Figure 5**

**Figure 5: Broad-spectrum antibiotics treatment improves intestinal inflammation and tumorigenesis in *Nod2*-deficient mice.**

Five days after AOM administration (at 12 mg/kg), *Nod2*<sup>+/+</sup> (black circles, n=4), *Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles, n=3), Atb-treated WT (black circles with green border, n=4) and Atb-treated *Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles with green border, n=3) mice were subjected to 2% DSS for 7-days interspersed with 9-days access to regular drinking water mice. (A) Changes in body weight were monitored daily. (B) Colonic-associated Bacteroides load was determined by specific Q-PCR analysis at day 16 (C-E) Ly6G, IA/IE, CD11c and CD11b staining of lamina propria cell population in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice treated or not with antibiotics as indicated was quantified by FACS analysis. (F) Colon weight/length ratio quantification on *Nod2*<sup>+/+</sup> (black circles, n=10), *Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles, n=9), Atb-treated *Nod2*<sup>+/+</sup> (black circles with green border, n=10) and Atb-treated *Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles with green border, n=10) mice was performed at day 58.

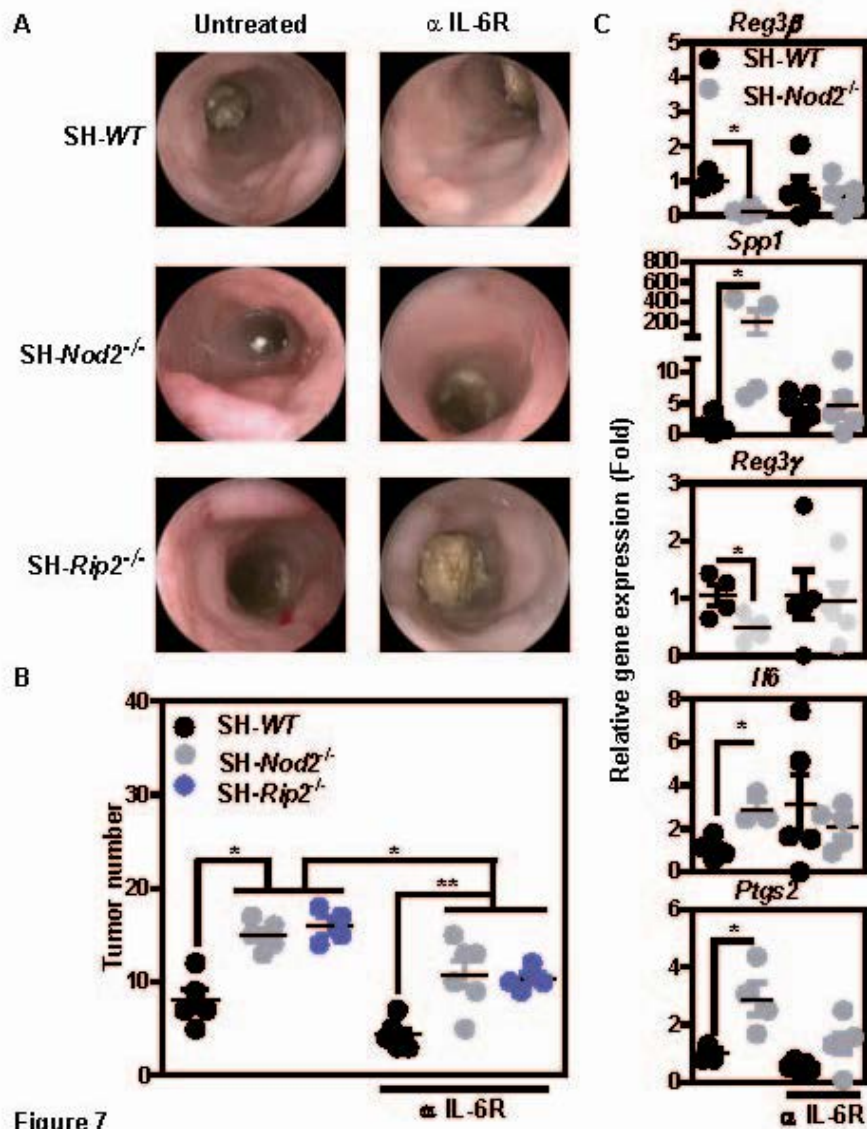


**Figure 6**

**Figure 6: Gene-plus-dysbiosis interaction result in pathological IL-6-mediated response.**

Five days after AOM administration (at 12 mg/kg), mice were exposed to 4 cycles of DSS, including 7 days separated by 10-day period of regular water. A combination of antibiotics (Atb) was given (n=4 wild-type mice and n=3 *Nod2*<sup>-/-</sup> mice) or not (n=3 wild-type mice and n=2 *Nod2*<sup>-/-</sup> mice) to animals. (A) Venn-diagram analysis. (B) Heat-map on NOD2-dependent transcriptional profiling according to treatment. (C) Immunohistochemical detection of IL-6 (brown) on colonic sections of DSS-treated WT, *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mutant mice. Il-6 signal is detected in DC-like cells (arrowhead) and in epithelial cells. Scale bar, 50  $\mu$ m. (D) Gene ontology. Only differentially expressed genes in different directions have been considered for gene ontology analysis. Significance is plotted as  $-\log(p\text{-value})$ . Only biological terms with a significant enrichment are displayed as determined by a  $|z\text{-score}| < -2$ . (E) Schematic overview of the differentially expressed genes involved in acute phase response as determined by Ingenuity Pathway Analysis.





**Figure 7: Enhanced IL-6 drives tumor progression as a result of NOD2 deficiency.** Five days after AOM administration (at 8 mg/kg) SH-WT (black circles, n=5), SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles, n=5), SH-*Rip2*<sup>-/-</sup> (blue circles, n=4) was exposed to 4 cycles of DSS, including 5 days separated by 7-days period of regular water. An IL-6R antibody (1 mg/mice ip) was given once a week from day 31 to 56 or not to AOM-exposed mice. (A) Endoscopic and (B) macroscopic evaluation of mice was performed at day 55 and 56 respectively. (C) Colonic transcript levels in untreated mice (n=4) and IL-6R-treated (n=4) animals of *Reg3 $\beta$* , *Reg3 $\gamma$* , *Il6*, *Ptgs2* and *Spp1* are shown as determined by qPCR evaluation at day 56.

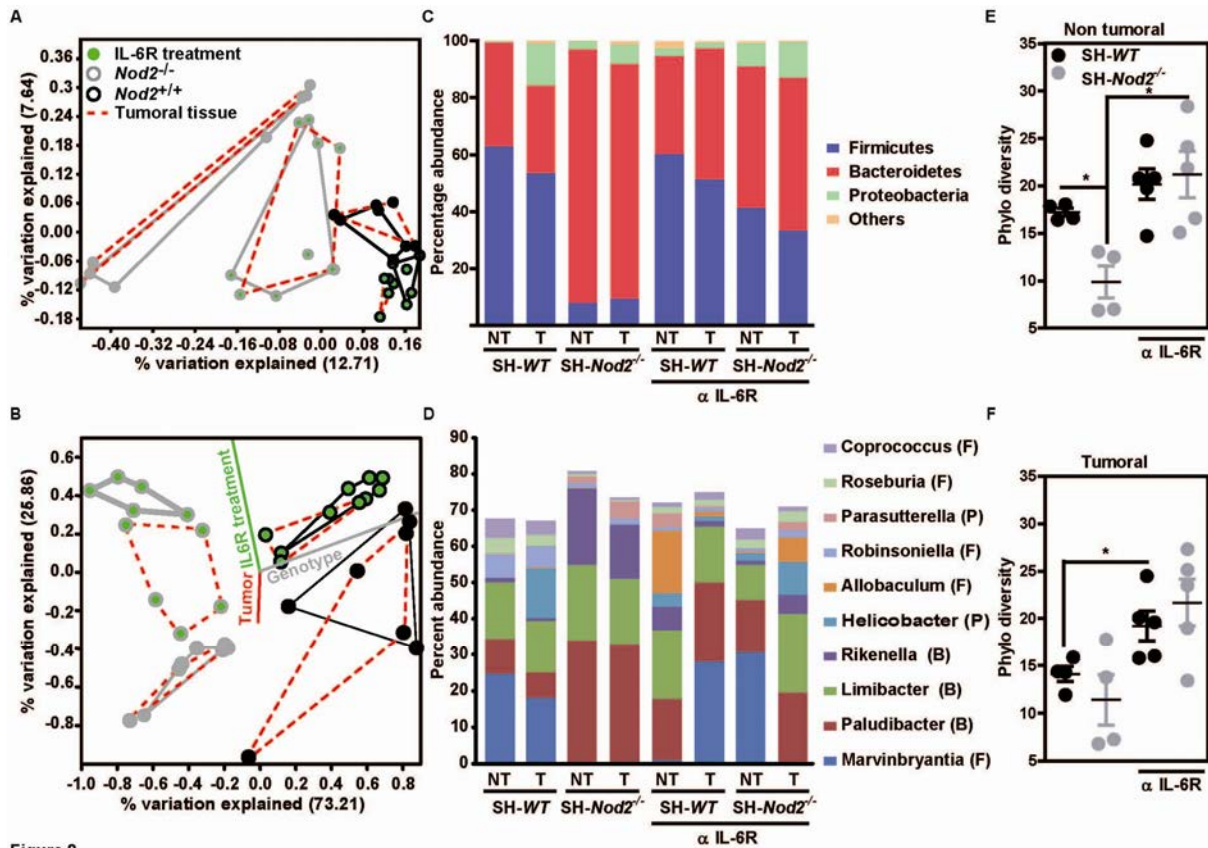
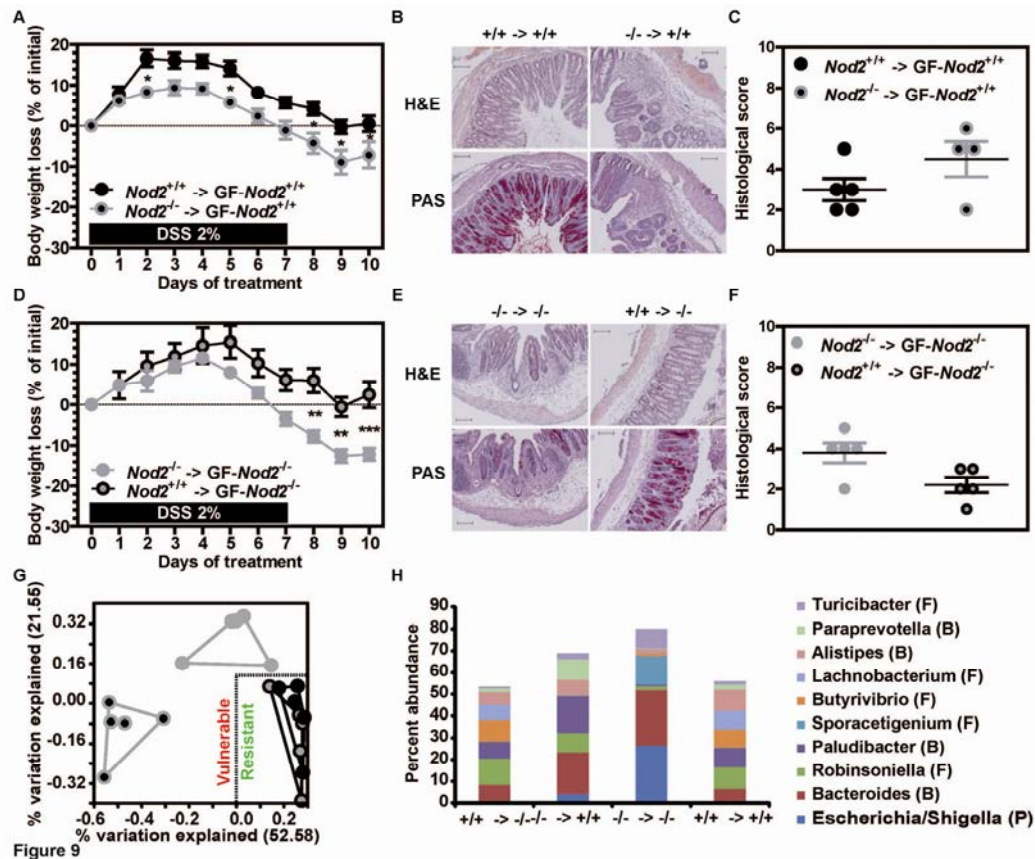


Figure 8

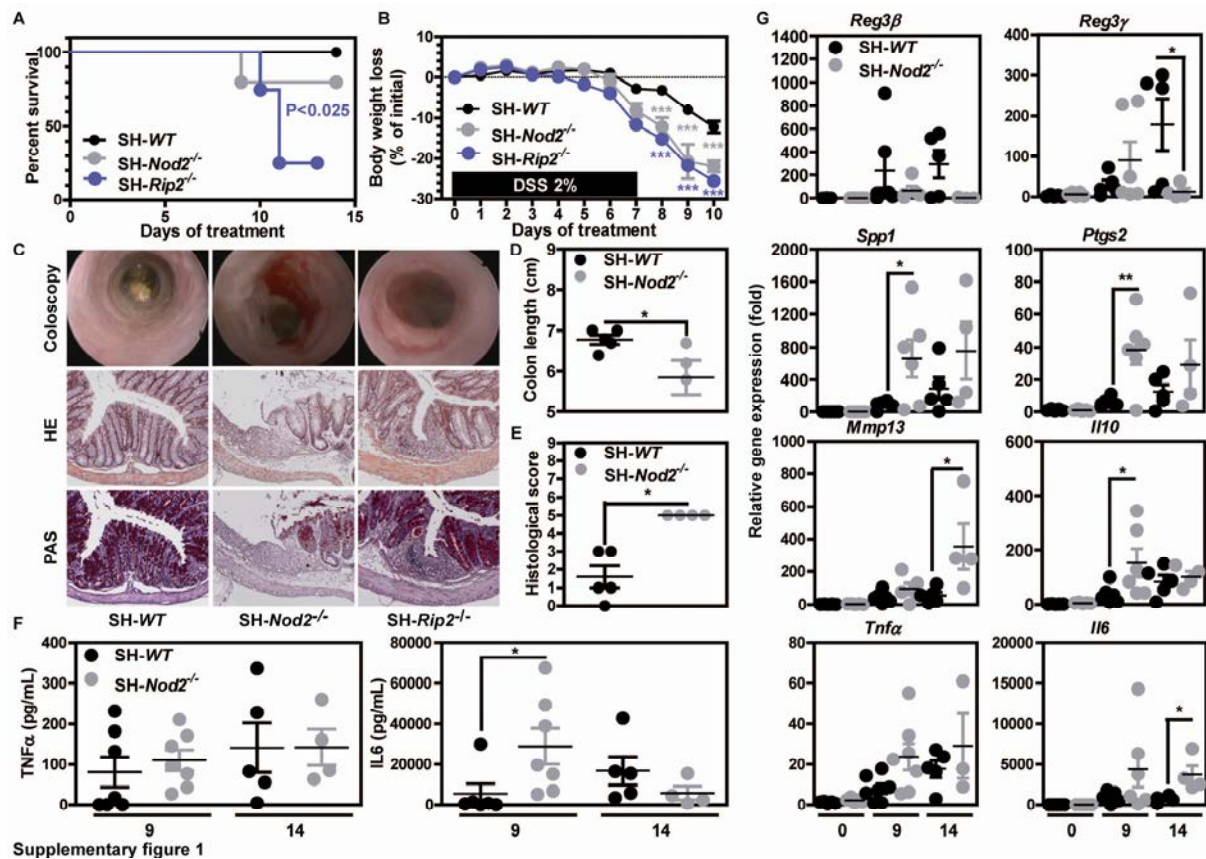
**Figure 8: IL-6-mediated control of disease progression is linked to NOD2-driven dysbiosis in an experimental model of colitis-associated colorectal cancer.**

High-throughput 16S rRNA pyrosequencing was performed on tumoral (T) and chronically inflamed (NT) colonic specimens isolated from WT and *Nod2*<sup>-/-</sup> animals (N=4). P-values were determined by the Mann-Whitney U-test. (A) PCoA plot generated on non abundance based unifracs distance matrices, (B) Canonical correspondence analysis based on observed genera (C-D) percentage of phyla (C) and top 10 genera (D) abundance identified by bray-curtis model of SIMPER analysis. F, B and P refer to Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria. (E-F) Non parametric quantification of microbiota diversity within tumoral (E) and non-tumoral (F) tissues. Mean ± SEM, are shown. Asterisk, significant difference P<0.05.



**Figure 9: Dysbiotic microbial ecology of *Nod2*-deficient mice intrinsically instigates risk for colitis that is corrected by fecal transplantation.**

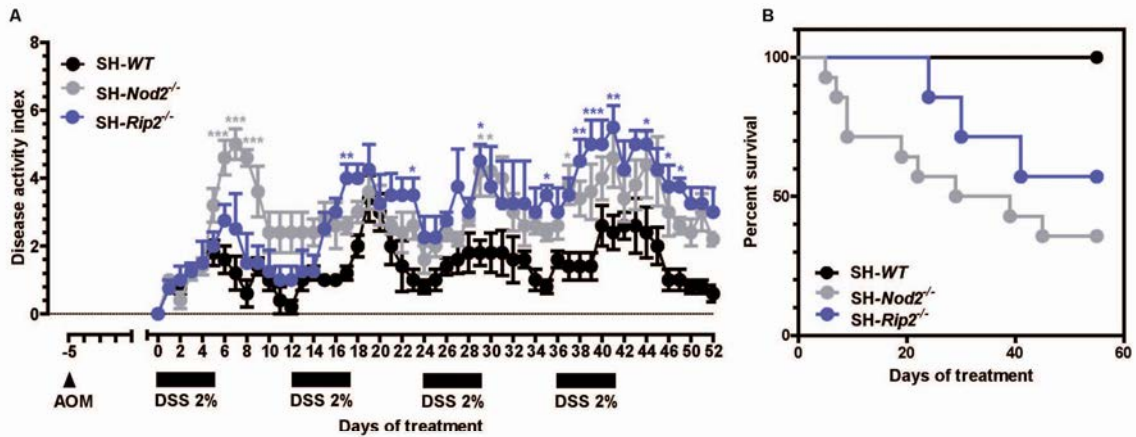
Four weeks before DSS-AOM challenge, GF *Nod2*<sup>-/-</sup> (grey circles, n=5) or GF *Nod2*<sup>+/+</sup> (black circles, n=5) were reconstituted with fecal microbiota from either *Nod2*<sup>+/+</sup> (black border) or *Nod2*<sup>-/-</sup> daily. (B,E) Representative H&E and PAS staining of paraffin-embedded transversal sections at day 10. Scale bar, 100  $\mu$ m. (C,F) Histological scoring was evaluated at day 10. (G-H) High-throughput 16S rRNA pyrosequencing was performed on fecal specimens isolated from all DSS-treated gnotobiotic animals (N=5). (G) PCoA generated on non abundance based unifrac distance matrices (H) Non parametric quantification of microbiota diversity. P-values were determined by the Mann-Whitney U-test and (H) Percentage of phyla abundance on top 10 genera identified by bray-curtis model of SIMPER analysis. F, B and P refer to *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. Mean  $\pm$  SEM, are shown. Asterisk, significant difference P<0.05.



### Supplementary figure 1: *Nod2*- and *Rip2*-deficient mice showed enhanced susceptibility to DSS-induced colitis.

Single-housed wild-type (SH-WT; black circles, n=5), SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles, n=5) and SH-*Rip2*<sup>-/-</sup> (blue circles, n=4) mice received ad libitum 2% DSS for 7 days followed by 7 days of regular water. (A) Survival and (B) changes in body weight were evaluated daily and compared to that in SH-WT animals. (C) Representative coloscopy and paraffin-embedded transversal sections of SH-WT, SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> and SH-*Rip2*<sup>-/-</sup> mice colons at day 14. (D) Colon length and (E) histological scoring were evaluated at day 14. (F) Protein levels of TNF $\alpha$  and IL-6. (G) *Reg3 $\beta$* , *Reg3 $\gamma$* , *Spp1*, *Ptgs2*, *Il10*, *Mmp13*, *TNF $\alpha$*  and *Il6* were determined by qRT-PCR analysis at day 0, 9 and 14. Mean  $\pm$  SEM, are shown. Asterisk, significant difference  $P < 0.05$ .

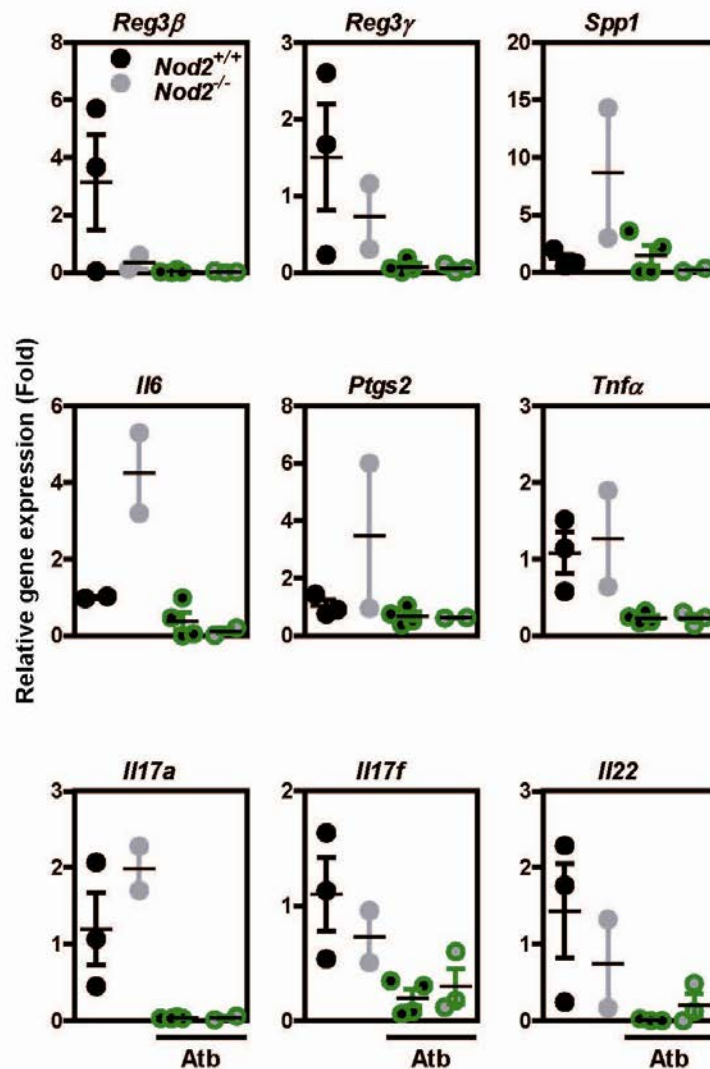




Supplementary figure 2

**Supplementary Figure 2: Enhanced morbidity and mortality of *Nod2*- and *Rip2*-deficient mice in an experimental model of colitis-associated colorectal cancer.**

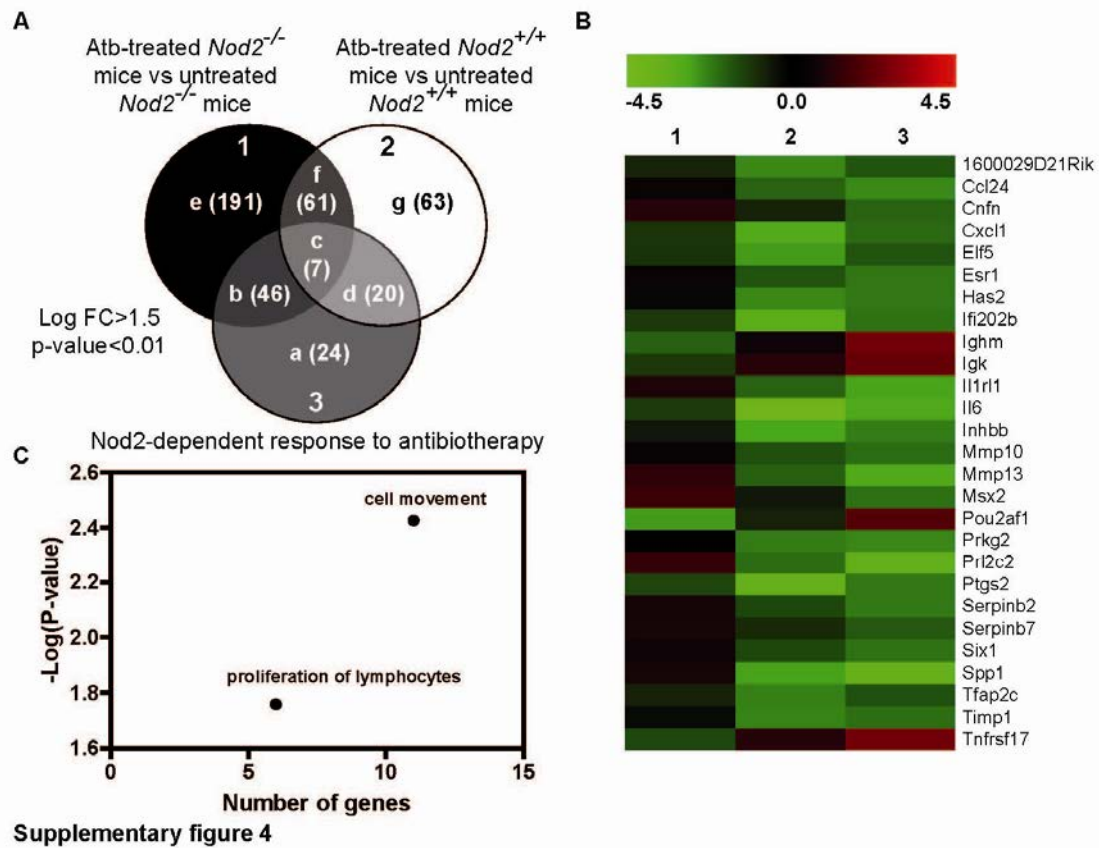
Single-housed wild-type (SH-WT, black circles, n=10), SH-*Nod2*<sup>-/-</sup> (grey circles, n=11) and SH-*Rip2*<sup>-/-</sup> (blue circles, n=11) mice were treated with AOM (8 mg/kg). Five days later, mice received ad libitum 2% DSS in drinking water for 4 cycles of 5 days separated by 7-day period of regular water. (A) Disease activity index and (B) survival were monitored daily.



Supplementary Figure 3

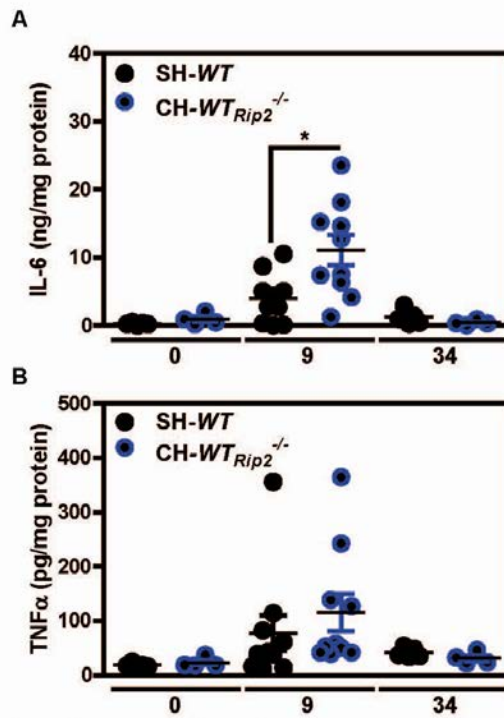
**Supplementary Figure 3: Differential response to antibiotics treatment as a result of *Nod2* deficiency.**

Transcript levels of *Reg3β*, *Reg3γ*, *Spp1*, *Il6*, *Ptgs2*, *Tnfa*, *Il17a*, *Il17f* and *Il22* were determined by qPCR analysis in colons from *Nod2*<sup>+/+</sup> (black circles, n=4), *Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles, n=3), Atb-treated WT (black circles with green border, n=4) and Atb-treated *Nod2*<sup>-/-</sup> (gray circles with green border, n=3) at day 16. Mean ± SEM, are shown.



**Supplementary Figure 4: *Nod2* deficiency results in a distinct colonic responsiveness to bacterial commensals upon injury.**

Five days after AOM administration (12 mg/kg), mice were challenged to one cycle of DSS, that consist in 7 days of 2% DSS followed by a 10-day period of regular water (n=3 wild-type mice and n=2 *Nod2*<sup>-/-</sup> mice). Alternatively, wild-type (n=4) and *Nod2*<sup>-/-</sup> (n=3) mice were similarly treated by DSS/AOM but received also a combination of antibiotics (Atb). (A) Venn-diagram analysis, (B) heat-map on differentially expressed genes between wild-type and *Nod2*-deficient animals according to treatment and (C) gene ontology on the set of 66 differentially expressed genes in different directions. Significance is plotted as  $-\log(p\text{-value})$ . Only biological terms with a significant enrichment are displayed as determined by a  $|z\text{-score}| < -2$  with Ingenuity Pathway Software.

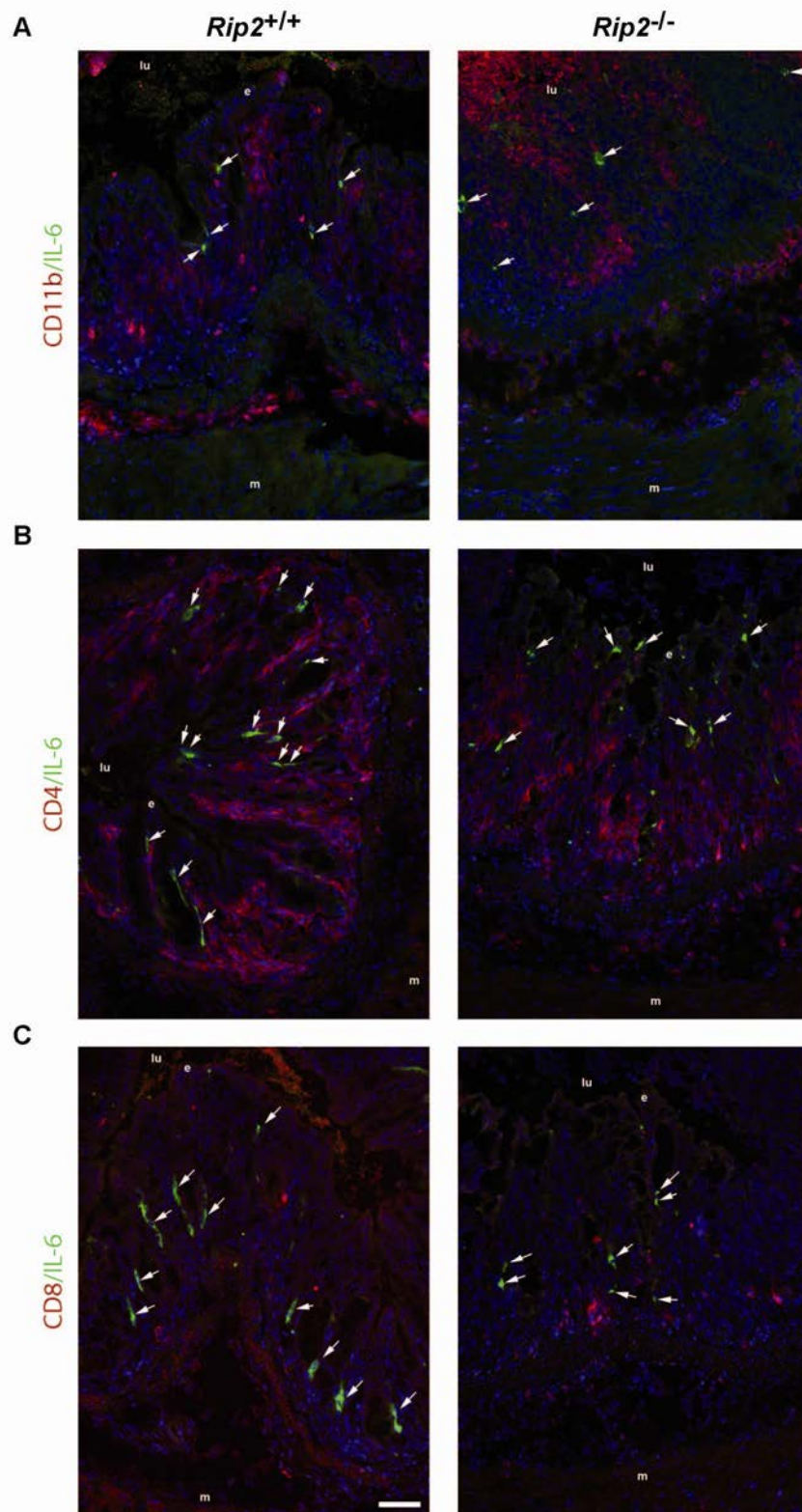


Supplementary figure 5

**Supplementary Figure 5: Enhanced IL-6, but not TNF- $\alpha$ , secretion in co-housed wild-type mice at early stage of intestinal tumorigenesis in an experimental model of colitis-associated colorectal cancer.**

Protein levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were determined at day 9 and 34 by specific ELISA. Mean  $\pm$  SEM, are shown. Asterisk, significant difference  $P < 0.05$ .

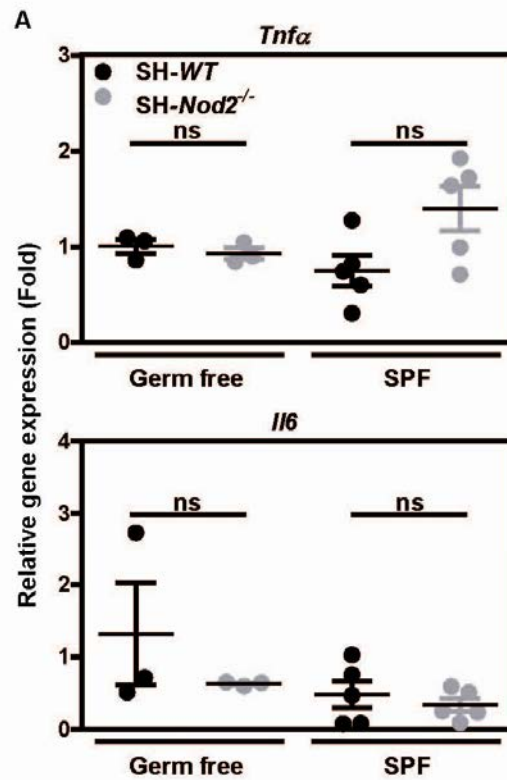




**Supplementary figure 6**

**Supplementary Figure 6: Enhanced IL-6 secretion in DSS-treated *Rip2*-deficient mice failed to co-localize with either CD11b<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> or CD8a<sup>+</sup> cells.**

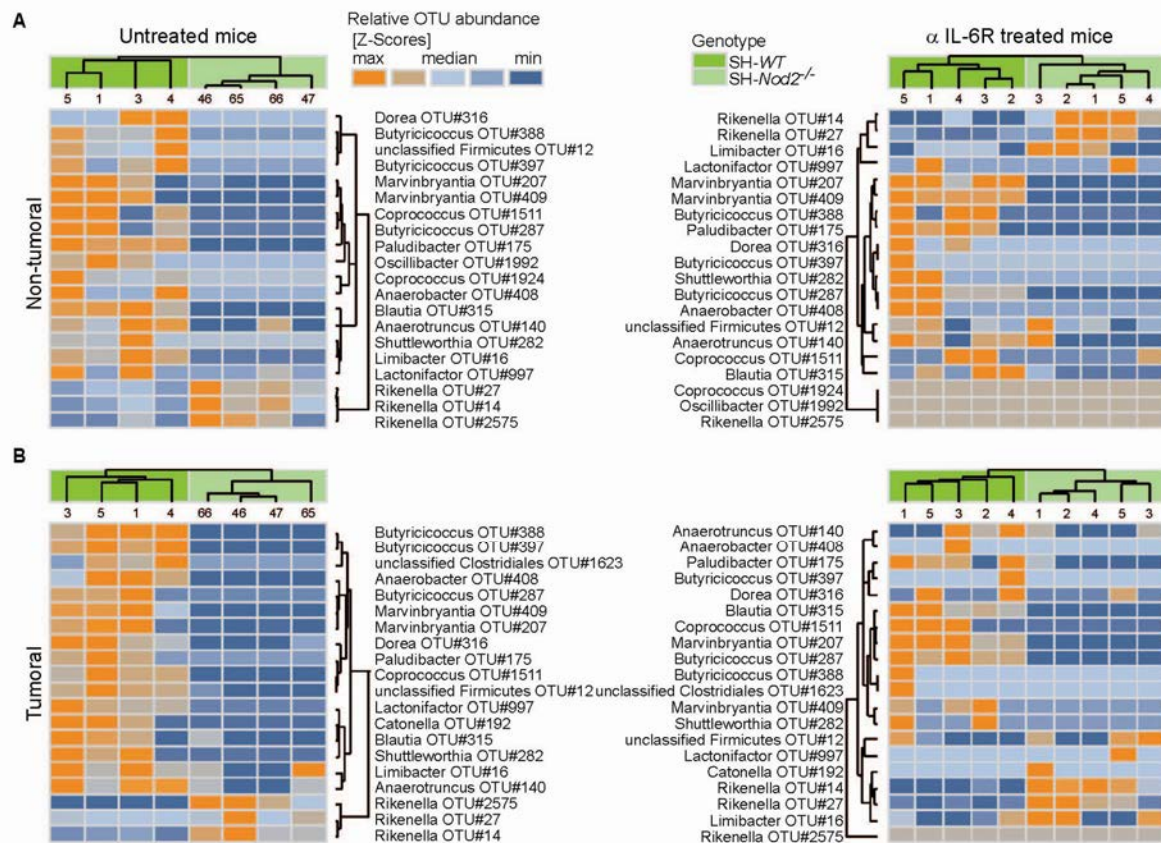
Immunofluorescent stainings of IL-6 (green) and CD11b, CD4 or CD8a (red) on colonic sections of DSS-treated WT and *Rip2*<sup>-/-</sup> mutant mice. Arrows refer to dendritic-like cells that express IL-6. E, lu and m refer to epithelial cells, lumen and muscularis mucosae respectively. Scale bar, 50  $\mu$ m.



Supplementary figure 7

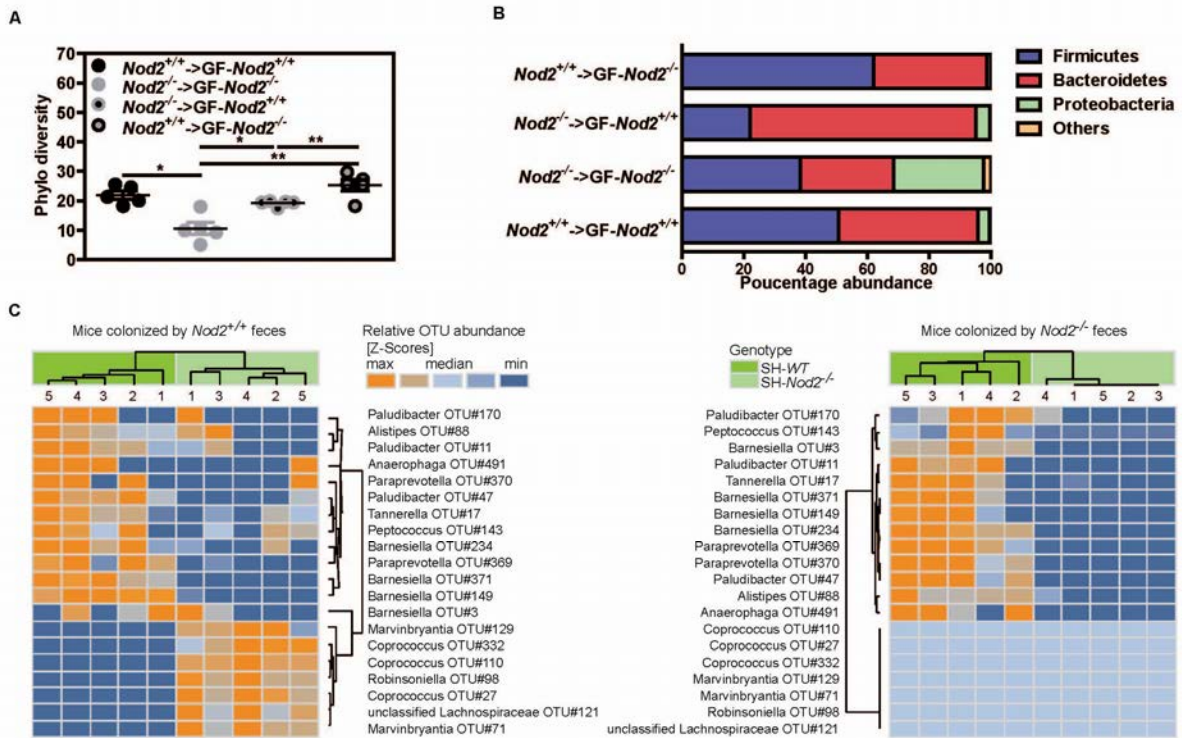
**Supplementary Figure 7: Il-6 and Tnf- $\alpha$  secretion by the colonic mucosa is not influence by *Nod2* and the intestinal microbiota in the absence of colonic injury by DSS.**

Relative colonic transcript levels of TNF $\alpha$  and Il6 in both wild-type and *Nod2*-deficient mice raised under SPF and GF conditions were determined by qRT-PCR analysis. Mean  $\pm$  SEM, are shown. Asterisk, significant difference P<0.05.



**Supplementary Figure 8: Anti-IL6R treatment influences *Nod2*-driven dysbiosis in the DSS-AOM model.**

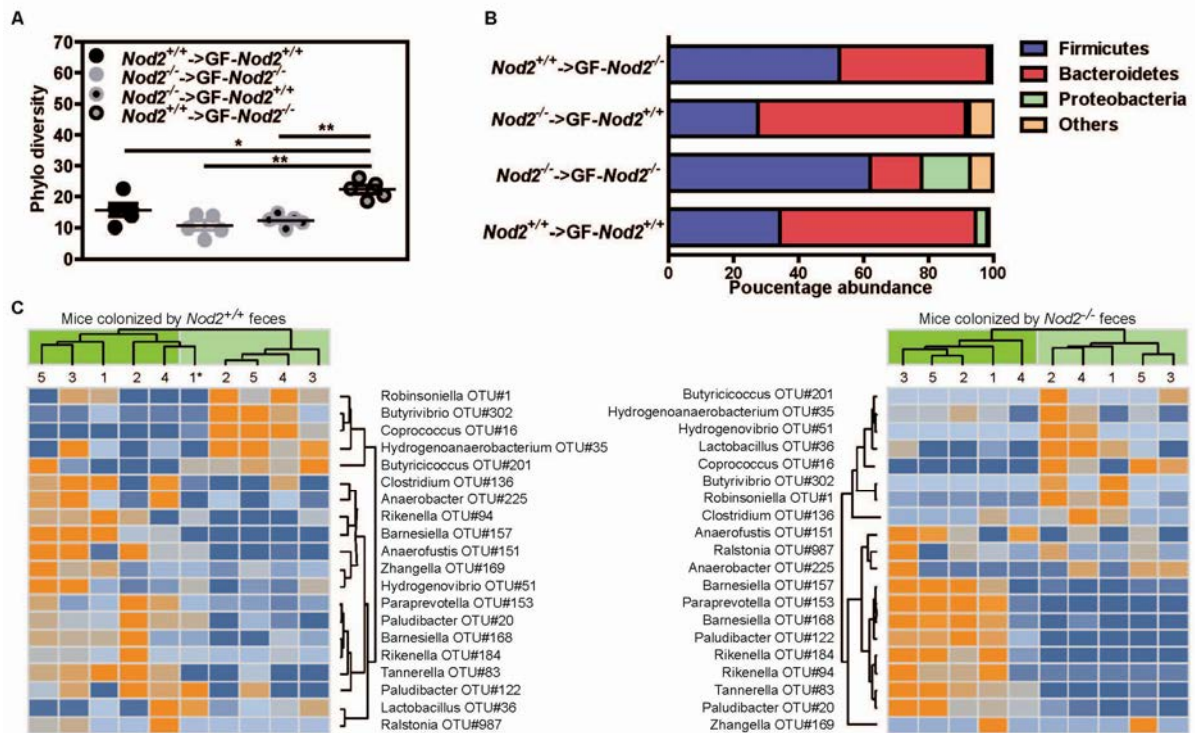
High-throughput 16S rRNA pyrosequencing was performed on chronically inflamed (A) and tumoral (B) colonic specimens isolated from *Nod2*<sup>+/+</sup> and *Nod2*<sup>-/-</sup> animals (N=4). Clusters representing 20 OTUs which primarily contribute to the shift between *Nod2*<sup>+/+</sup> and *Nod2*<sup>-/-</sup> animals were depicted. Corresponding clusters (left and right) are created based on the same OTUs. Z-score normalized OTU abundances are color-coded. Row dendrograms display OTU abundance similarities while column dendrograms display similarities between animals (dark green for *Nod2*<sup>+/+</sup>, light green for *Nod2*<sup>-/-</sup>). Column headers represent animal IDs, which are unique within a given group.



**Supplementary Figure 9: Fecal-associated dysbiosis in *Nod2*-deficient mice is reversible by reciprocal fecal transplantation.**

High-throughput 16S rRNA pyrosequencing was performed on fecal specimens isolated from all gnotobiotic animals upon injury (N=5). (A) Non parametric quantification of microbiota diversity. P-values were determined by the Mann-Whitney U-test. Mean  $\pm$  SEM, are shown. Asterisk, significant difference  $P < 0.05$ . (B) Percentage abundance at the phyla level. (C) Clusters representing 20 OTUs which primarily contribute to the shift between the fecal-associated microbiota were depicted (N=5). Corresponding clusters (left and right) are created based on the same OTUs. Z-score normalized OTU abundances are color-coded. Row dendrograms display OTU abundance similarities while column dendrograms display similarities between animals (dark green for *Nod2*<sup>+/+</sup>, light green for *Nod2*<sup>-/-</sup>). Column headers represent animal IDs, which are unique within a given group.





**Supplementary Figure 10: Mucosal-associated dysbiosis in *Nod2*-deficient mice is reversible by reciprocal fecal transplantation.**

High-throughput 16S rRNA pyrosequencing was performed on colonic specimens isolated from all gnotobiotic animals upon injury (N=5). (A) Non parametric quantification of microbiota diversity. P-values were determined by the Mann-Whitney U-test. Mean  $\pm$  SEM, are shown. Asterisk, significant difference P<0.05. (B) Percentage abundance at the phyla level. (C) Clusters representing 20 OTUs which primarily contribute to the shift between the mucosal-associated microbiota were depicted. Corresponding clusters (left and right) are created based on the same OTUs. Z-score normalized OTU abundances are color-coded. Row dendrograms display OTU abundance similarities while column dendrograms display similarities between animals (dark green for *Nod2*<sup>+/+</sup>, light green for *Nod2*<sup>-/-</sup>). Column headers represent animal IDs, which are unique within a given group.

## REFERENCES

1. 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.
2. 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., et al. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320:1647-1651.
3. 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.
4. Garrett, W.S., Gordon, J.I., and Glimcher, L.H. 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140:859-870.
5. Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M., and Doi, K. 1996. Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp Anim* 45:155-160.
6. 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.
7. 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.
8. Asquith, M., and Powrie, F. 2010. An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer. *J Exp Med* 207:1573-1577.

9. Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138:2101-2114 e2105.
10. 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.
11. Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P.J., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A.J., et al. 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357:1925-1928.
12. 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.
13. Watanabe, T., Asano, N., Murray, P.J., Ozato, K., Tailor, P., Fuss, I.J., Kitani, A., and Strober, W. 2008. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest.*
14. Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R.A. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307:731-734.
15. Geddes, K., Rubino, S.J., Magalhaes, J.G., Streutker, C., Le Bourhis, L., Cho, J.H., Robertson, S.J., Kim, C.J., Kaul, R., Philpott, D.J., et al. 2011. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. *Nat Med* 17:837-844.

16. Kim, Y.G., Park, J.H., Shaw, M.H., Franchi, L., Inohara, N., and Nunez, G. 2008. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity* 28:246-257.
17. Chamaillard, M., Girardin, S.E., Viala, J., and Philpott, D.J. 2003. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 5:581-592.
18. Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y.J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., and Kobayashi, K.S. 2009. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15813-15818.
19. Rehman, A., Sina, C., Gavrilova, O., Hasler, R., Ott, S., Baines, J.F., Schreiber, S., and Rosenstiel, P. 2011. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*.
20. Mondot, S., Barreau, F., Al Nabhani, Z., Dussaillant, M., Le Roux, K., Dore, J., Leclerc, M., Hugot, J.P., and Lepage, P. 2012. Altered gut microbiota composition in immune-impaired Nod2(-/-) mice. *Gut* 61:634-635.
21. Frank, D.N., Robertson, C.E., Hamm, C.M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., Zhu, W., Sartor, R.B., Boedeker, E.C., Harpaz, N., et al. 2011. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 17:179-184.
22. Feagins, L.A., Souza, R.F., and Spechler, S.J. 2009. Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6:297-305.



23. Rosenstiel, P., Hellmig, S., Hampe, J., Ott, S., Till, A., Fischbach, W., Sahly, H., Lucius, R., Folsch, U.R., Philpott, D., et al. 2006. Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Cell Microbiol* 8:1188-1198.
24. Mockelmann, N., von Schonfels, W., Buch, S., von Kampen, O., Sipos, B., Egberts, J.H., Rosenstiel, P., Franke, A., Brosch, M., Hinz, S., et al. 2009. Investigation of innate immunity genes CARD4, CARD8 and CARD15 as germline susceptibility factors for colorectal cancer. *BMC Gastroenterol* 9:79.
25. Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. 2007. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2:1998-2004.
26. Lieu, H.T., Simon, M.T., Nguyen-Khoa, T., Kebede, M., Cortes, A., Tebar, L., Smith, A.J., Bayne, R., Hunt, S.P., Brechot, C., et al. 2006. Reg2 inactivation increases sensitivity to Fas hepatotoxicity and delays liver regeneration post-hepatectomy in mice. *Hepatology* 44:1452-1464.
27. Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., et al. 2009. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 206:1465-1472.
28. 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.

29. Garrett, W.S., Lord, G.M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S.K., Ito, S., Glickman, J.N., and Glimcher, L.H. 2007. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 131:33-45.
30. Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., and Ito, H. 2000. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. In *J Immunol.* 4878-4882.
31. Bollrath, J., Phesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., et al. 2009. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 15:91-102.
32. Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., et al. 2009. IL-6 and stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15:103-113.
33. Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. 2011. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145:745-757.
34. Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D. 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56:61-72.
35. Sartor, R.B. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134:577-594.

36. Bloom, S.M., Bijanki, V.N., Nava, G.M., Sun, L., Malvin, N.P., Donermeyer, D.L., Dunne, W.M., Jr., Allen, P.M., and Stappenbeck, T.S. 2011. Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe* 9:390-403.
37. Secher, T., Gaillot, O., Ryffel, B., and Chamaillard, M. 2010. Remote control of intestinal tumorigenesis by innate immunity. *Cancer Res* 70:1749-1752.
38. Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L., et al. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336:489-493.
39. Kurzawski, G., Suchy, J., Kladny, J., Grabowska, E., Mierzejewski, M., Jakubowska, A., Debniak, T., Cybulski, C., Kowalska, E., Szych, Z., et al. 2004. The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 64:1604-1606.
40. Papaconstantinou, I., Theodoropoulos, G., Gazouli, M., Panoussopoulos, D., Mantzaris, G.J., Felekouras, E., and Bramis, J. 2005. Association between mutations in the CARD15/NOD2 gene and colorectal cancer in a Greek population. *Int J Cancer* 114:433-435.
41. Roberts, R.L., Gearry, R.B., Allington, M.D., Morrin, H.R., Robinson, B.A., and Frizelle, F.A. 2006. Caspase recruitment domain-containing protein 15 mutations in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 66:2532-2535.
42. Simms, L.A., Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E.V., and Radford-Smith, G.L. 2008. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 57:903-910.

43. Jones, S.A., Scheller, J., and Rose-John, S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 121:3375-3383.
44. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58:573-581.
45. Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamillard, M. 2011. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9601-9606.
46. Tavazoie, S., Hughes, J.D., Campbell, M.J., Cho, R.J., and Church, G.M. 1999. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet* 22:281-285.
47. Weigmann, B., Tubbe, I., Seidel, D., Nicolaev, A., Becker, C., and Neurath, M.F. 2007. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat Protoc* 2:2307-2311.

## **Article 2 : A suppressive role of NOD2 on Th2-mediated intestinal inflammation through IL1 $\beta$ -mediated signaling pathway.**

Thomas Secher, **Aurélie Couturier**, Ludovic Huot, Teddy Grandjean, Yves Lemoine, David Hot, Bernhard Ryffel, Mathias Chamaillard

### **Manuscrit en préparation**

#### **Problématique**

Une réponse dérégulée des cellules T intestinales pourrait conduire à un défaut de réponse immunitaire innée en réponse au microbiote des patients atteints de la maladie de Crohn. Une réponse inflammatoire de type Th2 interviendrait lors des phases précoces de la maladie de Crohn. Au contraire, les phases plus tardives seraient caractérisées par une réponse inflammatoire de type Th1. De plus, NOD2 serait impliqué dans la réponse inflammatoire innée et acquise par des mécanismes dépendants de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  et la diminution de la production d'IL-1 $\beta$  pourrait être associée à une augmentation de la susceptibilité de patients atteints de la maladie de Crohn.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail visait à définir le rôle de NOD2 dans les lésions intestinales en réponse à une inflammation de type Th2 et d'identifier le rôle de la voie IL-1 dans la protection à l'encontre de la colite.

#### **Approche expérimentale et résultats de l'article**

Afin d'évaluer la pertinence du rôle de NOD2 dans au cours de la colite Th2 dans un modèle expérimental de MICI, un modèle de colite induite par exposition avec un haptène, l'oxazolone, a été utilisé, en vue d'évaluer la sévérité de la maladie chez des souris déficientes pour Nod2 et Rip2. Après présensibilisation et induction de la colite, une augmentation de la susceptibilité des animaux déficients a pu être observée. Dans ce modèle d'hypersensibilité retardée intestinale, la réponse au MDP a également été étudiée. L'administration de ce ligand de NOD2, semble être capable de réduire la susceptibilité des animaux WT dans ce modèle de colite. Au contraire, chez des animaux déficients pour l'IL1R1 mais pour lesquels NOD2 est intact, le MDP n'exercerait pas de rôle protecteur. Ce résultat suggère que la voie

IL1R1 est nécessaire pour la protection à l'encontre de la colite en réponse à la stimulation de NOD2. La susceptibilité augmentée des animaux IL1R1 déficients en réponse à l'oxazolone semble confirmer ce rôle dans la protection de la colite. Le rôle de NOD2 dans le compartiment hématopoïétique et stromal a ensuite été évalué par génération de souris chimères.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence que NOD2 régulerait l'homéostasie intestinale en réponse à la colite à la fois par les cellules hématopoïétiques et stomales de façon dépendante de la voie IL1R1.

## **A suppressive role of NOD2 on TH2-mediated intestinal inflammation through IL1 $\beta$ -mediated signaling pathway.**

Thomas Secher<sup>1,2,7</sup>, Aurélie Couturier<sup>3,4,5,6,7</sup>, Ludovic Huot<sup>3,4,5,6</sup>, Teddy Grandjean<sup>3,4,5,6</sup>, Yves Lemoine<sup>3,4,5,6</sup>, David Hot<sup>3,4,5,6</sup>, Bernhard Ryffel<sup>1,8</sup>, Mathias Chamaillard<sup>3,4,5,6,8</sup>.

<sup>1</sup>CNRS, UMR6218 IEM, Orléans, France. <sup>2</sup>Present address: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1043, F-31024, Toulouse, France. <sup>3</sup>University Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. <sup>4</sup>Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019 Lille, France. <sup>5</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8204, F-59021 Lille, France. <sup>6</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019 Lille, France. <sup>7</sup>These authors contributed equally to this work. <sup>8</sup>These authors share senior authorship.

**Correspondence should be addressed to: [mathias.chamaillard@inserm.fr](mailto:mathias.chamaillard@inserm.fr)**

**Key words:** Crohn's disease, nucleotide-binding oligomerization domain protein 2, interleukin-1, T cell homeostasis.

## ABSTRACT

The nucleotide-binding oligomerization domain protein 2 (NOD2) controls gut microbial ecology, which is disrupted in Crohn's disease. Herein, we identified a key regulatory role of the NOD2/RIP2/IL1R axis in maintenance of T cell homeostasis in experimental colitis. Notably, genetic ablation of *Nod2* precipitated antigen-mediated colitis upon oxazolone challenge. *Nod2*-deficient mice were characterized by a defective recruitment of splenic regulatory T cells and by an impaired activation of CD4<sup>+</sup> T cells into mesenteric lymph node. Consistently and similar to what observed in Crohn's disease, the expression of NOD2 within both the leukocyte and non-hematopoietic lineage was indispensable. Furthermore, oxazolone-driven colitis was prevented by administration of a cognate NOD2 agonist in immunocompetent animals. In contrast, muramyl dipeptide was inefficient to prevent development of colitis in mice deficient for the interleukin-1 receptor or for RIP2, a cytosolic adaptor of NOD2-mediated signaling pathway.



Crohn's disease (CD) constitutes a major health problem in developed countries (1). A dramatic increase of the incidence of CD has been observed over time in industrialized countries. CD affects about 4 million worldwide and occurs primarily in the second to third decade of life. A high genetic liability has been supported by genome-wide association studies that have identified more than 100 moderate-to-low-risk CD-predisposing genes (2). At the tissular level, CD is referred as relapsing/remitting chronic inflammation involving any part of the gastrointestinal tract. CD patient's mucosa is characterized by defensins deficiencies that are linked to changes in the composition of the gut microbiota, a phenomenon that has been referred as dysbiosis (3). Notably, early CD lesions are primarily characterized by an elevation of Th2 proinflammatory cytokines (4) even if Th1 immune responses are also involved at later time points (5). Lastly, CD patients are thought to be prone to experience deregulated lymphocytic infiltration (4). Overall, both genetic and immunological observations support the notion that CD-associated deregulated T cell function may result in defective innate immune response to CD patient's microbiota.

Intestinal homeostasis results from the permanent dialogue between commensal microorganisms and components of the innate immune system. The nucleotide-binding oligomerisation domain protein 2 (Nod2) is a prototypic member of the family of intracellular Nods-like receptors (NLRs) that share similarities with the resistance protein in plants (6). NOD2 has been shown to recognize a muramyl dipeptide, namely N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin, that is found in both gram-positive and negative peptidoglycan (7). NOD2-dependent signaling pathway involves RIP2 kinase which is required for the terminal activation of NF $\kappa$ B and MAP kinases (8), resulting in the induction of pro-inflammatory genes (9). Genome-wide studies have associated three major loss of function mutations in *NOD2* (R702W,

G908R and 1007fs) with enhanced susceptibility to CD (10). Furthermore, the 1007fs mutation in *NOD2* has been recently linked to an ileal defect in  $\alpha$ -defensin (13). In addition to its central role in shaping the gut bacterial microbiota (14), *NOD2* is thought to be involved in the generation of both innate and acquired immune responses through several mechanisms, including the secretion of Interleukin-1 beta ( $IL1\beta$ ).  $IL1\beta$  is a prototypical pro-inflammatory cytokines involved in experimental intestinal inflammation (16), as well as colonic mucosa (17) and mononuclear cells isolated from IBD patients (18). Nevertheless, recent studies suggest a protective rather than a detrimental role of  $IL-1\beta$  in the development of intestinal damages upon DSS-induced colitis (19). Notably, decreased  $IL-1\beta$  production was correlated with increased susceptibility to CD (20).

Here, our reverse genetic approach using chimeric mice revealed a complex protective interplay between the non-hematopoietic and hematopoietic compartment of the *NOD2/IL1R* axis in an experimental model of colitis.

## Materials and methods

### *Mice*

*Nod2*<sup>-/-</sup>, *Rip2*<sup>-/-</sup> and *Il1r1*<sup>-/-</sup> mice backcrossed to C57BL/6 background for at least 10 generations, described before (8, 9, 21, 22), have been used. Adult females, 9 weeks-old, were housed in specific pathogen-free facility at the Transgenose Institute (Centre National de la Recherche Scientifique, Orleans, France). The animal experiments were approved and complied with the French government's ethical and animal experiment regulations.

### *Generation of bone-marrow chimeric mouse*

Six-week-old C57BL/6J wildtype (WT) or *Nod2*<sup>-/-</sup> recipient mice were irradiated with 8 Gy from a <sup>137</sup>Cs source delivered in 1 dose. BM cells were isolated from 6–8-week-old C57BL/6J or *Nod2*<sup>-/-</sup> donor mice by flushing the bone shafts of the femurs with PBS1X and 2.10e6 BM cells intravenously injected into the recipient mice 12h hours after the irradiation. WT mice were transplanted with *Nod2*<sup>-/-</sup> BM (*Nod2*<sup>-/-</sup>->WT) and *Nod2*<sup>-/-</sup> mice were transplanted with WT BM (WT-> *Nod2*<sup>-/-</sup>). As controls, WT mice were transplanted with WT BM and *Nod2*<sup>-/-</sup> mice transplanted with *Nod2*<sup>-/-</sup> BM. Using congenic C57BL/6-Ly5.1 as donor mice, chimerism was confirmed by examining Ly5.1/Ly5.2 ratio in blood 8 weeks after transplantation by fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis.

### *Oxazolone-induced colitis*

For induction of colitis, mice received a presensibilisation injection of 1% oxazolone s.c. (4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (injection 100 µL in 50% ethanol). Five days later, mice were lightly anesthetized with

Ketamine/Xylazine (1.25 mg/mL/0.5 mg/mL) i.p and oxazolone 1%, was administered intra-rectally via a 3.5 F catheter equipped with a 1-ml syringe. The catheter was inserted so that the tip was 4 cm proximal to the anal verge and the oxazolone was injected with a total volume of 100 ml of a 50% ethanol. To ensure distribution of the oxazolone within the entire colon and cecum, mice were held in a vertical position for 30 s after the injection. For MDP-treatment experiments, 1mg/kg of MDP (Sigma), was injected intraperitoneally at 1, 2 and 3 days before oxazolone challenge.

#### *Determination of histopathological score*

After 24h, the entire colon was removed, photographed and its length measured. Samples were also excised and frozen at -80°C for RNA, MPO and histological analysis. Colon were washed with PBS1X and fixed in 10% buffered formalin (Shandon), dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. Sections (3µM thick) were stained with H&E for evaluation of pathological changes by two independent observers. Histological score was determined according to Tamaki and colleagues (23), as a combination of inflammatory cellular influx and localization, crypt/epithelial damages associated with their respective tissue involvement. Sections (3 µM thick) were stained according to the periodic acid-Schiff method for evaluation of colonic mucus content. Number of PAS+ cells was randomly quantified in four independent fields of each slides.

#### *Flow cytometry*

Spleen and lymph node and colon were collected 24h after the induction of colitis. Spleen and lymph node cells were extracted by passing the organ through a 100µM cell-strainer (Becton Dickinson). Cells were washed once in PBS containing 0.5%

BSA (PBS/BSA) and stained on ice at  $10^6$  cells/100  $\mu$ l with primary Abs: anti-CD4 Pacific blue (clone RPA-T4 ), (clone H35-17.2), anti-CD3 $\epsilon$  PE or PerCP (clone 145-2C11), anti-CD69 PE (clone H1.2F3), anti-Tbet PE (clone 4B10), anti-CD25 FITC (clone 3C7), anti-GATA3 PE (clone L50-823), anti-IFN $\gamma$  FITC (clone XMG1.2) and anti-FoxP3 APC (clone MF23) for 20 min in PBS-BSA containing 1 $\mu$ g/mL of Fc block (anti-CD32/CD16) in the dark. All Abs were from BD Pharmingen (R&D Systems). After washing with PBS/0.5% BSA, cells were analyzed on a BD Calibur II cytometer.

### *Statistical analysis*

Results are shown as the mean  $\pm$  SEM. Differences were evaluated by using analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls post hoc analysis. Results with a  $P < 0.05$  were considered significant. For survival curves, differences between groups were compared using log rank test and considered significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### ***NOD2 axis deficiency leads to worsened clinical parameters and increased mortality during oxazolone-induced colitis***

Rectal administration of the haptening compound oxazolone dissolved in 50% ethanol injures colonic epithelial cells, leading to weight reduction, diarrhea and marked loss of goblet cells and is widely used as an experimental model of UC (24). To study the implication of NOD2-RIP2 axis in oxazolone-induced colitis-, age- and sex-matched *Nod2*<sup>-/-</sup>, *Rip2*<sup>-/-</sup> and wild-type mice were intra-rectally challenged with oxazolone and monitored for signs of colitis. Administration of oxazolone resulted in more important mortality in *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> as compared to WT mice (Figure 1A). Disease severity was then assessed 24h after oxazolone-treatment. The evaluation of colon length, which is a marker of disease severity (25), revealed that colon length of *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice was on average 20% shorter than wild-type controls (Figure 1B). These clinical observations were validated by microscopic examination of hematoxylin-eosin stained representative colon sections. We observed marked histopathological changes in *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice, characterized by infiltration of leukocytes in the lamina propria and submucosa, crypt loss and large epithelial damage with focal effacement (Figure 1D). Semiquantitative scoring of these histological parameters confirmed that oxazolone-induced colitis severity in *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice mice was significantly higher than in wild-type mice (Figure 1C). Loss of goblet cells is another characteristic lesion of oxazolone-induced colitis. As shown in Fig. 1F, *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice exhibited a large reduction of PAS staining. We quantitatively evaluated this histological feature of mucin-producing cells and observed a decreased in the number of colonic PAS+ cells in *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice when compared to WT (Figure 1E).

### ***The NOD2 ligand, MDP, induces protection upon oxazolone-induced colitis***

Because NOD2-RIP2 axis seems to be critical in immune protection during colitis, we asked whether and how the NOD2 ligand, MDP, can actively protect mice. Mice were systematically injected with 1mg/kg of MDP, three days before oxazolone challenge. Clinical symptoms such as colon length and macroscopic appearance were evaluated 24h after the challenge. We observed a significant reduction of colon length impairment as well as presence of blood in stool and mucosa in MDP-treated WT as compared to untreated animals (Figure 2A and 2B). This clinical improvement was correlated to an enhanced survival of MDP-treated WT animals upon oxazolone-induced colitis (Figure 2C). This protective effect of MDP was completely abrogated in *Rip2*<sup>-/-</sup> animals, confirming the relevance of the NOD2-RIP2 pathway and partially abrogated in *Il1r1*<sup>-/-</sup> mice. We then asked whether RIP2 may have an impact on the systemic immune response upon oxazolone-induced colitis. To address this issue, we examined the composition of leukocyte infiltrate in the spleen of *Rip2*<sup>-/-</sup> and wild-type animals, 24h after challenge. Cytometric analysis of spleen revealed a strong reduction of both Th1 and Th2 CD4 T-cells in *Rip2*<sup>-/-</sup> as compared to WT animals (Figure 2D).

### ***Essential role of IL1R1 in protection against oxazolone-induced colitis***

We established earlier a putative contribution of IL-1R1 axis in MDP-mediated protection against oxazolone-induced colitis. To determine whether IL1R1 is directly implicated in protection against colitis, we assessed the response of mice lacking *Il1r1*<sup>-/-</sup>. Similar to *Nod2*<sup>-/-</sup> or *Rip2*<sup>-/-</sup> mice, *Il1r1*<sup>-/-</sup> were highly susceptible to oxazolone-induced colitis with 75% of *Il1r1*<sup>-/-</sup> mice dying 7 days after oxazolone challenge (Figure 3A). As seen with *Nod2*<sup>-/-</sup> mice, *Il1r1*<sup>-/-</sup> mice displayed significant reduction of

colon length (Figure 3B) and mucosal goblet cells (Figure 3D). Finally, as observed for *Nod2*<sup>-/-</sup>, observations of HE stained colon sections of *Il1r1*<sup>-/-</sup> mice revealed an increased incidence of tissular damages (Figure 3C).

***NOD2 expression in mucosa and immune cells is critical for T-cell homeostasis upon oxazolone-induced colitis***

NOD2 is expressed in immune cells as well as in epithelial cells (6, 26). To determine which cell population is critical for NOD2-dependent protections against oxazolone-induced colitis, we generated four groups of bone-marrow chimeras and analysed their T-cell response upon colitis. We first analysed overall CD4-Tcell recruitment in spleen and observed that *Nod2*<sup>-/-</sup> mice receiving both *Nod2*<sup>-/-</sup> or *Nod2*<sup>+/+</sup> bone marrow exhibited increased accumulation of CD4+ T cell suggesting a redundant role of NOD2 signaling in T-cell recruitment (Figure 4A and B). This strong splenic T-cell increase in *Nod2*<sup>+/+</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup> animals was correlated to an enhanced activation. The expression of CD69 – a marker of T cell activation – was enhanced on CD4+ in the spleen of *Nod2*<sup>+/+</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup> animals when compared to controls (Figure 4C). The intestinal immune response is tightly balanced between effector and regulatory responses by regulatory T cells (Tregs) (27). To test whether NOD2 may be involved in the regulation of Treg responses, we assessed the presence of CD4+ CD25+ FoxP3+ Tregs. Tregs in *Nod2*<sup>-/-</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup> was comparable to *Nod2*<sup>+/+</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Nod2*<sup>-/-</sup> → *Nod2*<sup>+/+</sup> and reduced when compared to controls (Figure 4D), suggesting that NOD2 expression in nonhematopoietic as well as hematopoietic cells are important for Tregs homeostasis. We next asked whether Th1 cells accumulation was also dependent on NOD2 signaling and observed that both CD4+ expressing IFN $\gamma$  (Figure 4E) – the



prototypical Th1 like cytokine – or Tbet (Figure 4F) – a Th1 specific transcription factor – are significantly decreased in *Nod2*<sup>+/+</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup>. Overall, these results highlighted a complex role of NOD2 expression in mucosa or immune cells on T-cell homeostasis upon oxazolone-induced colitis.

## Discussion

Several studies support a causative link between NOD2 mutations and chronic inflammation of the gastro-intestinal tract, and the unraveling of inflammatory pathways that contribute to IBD pathogenesis is of critical importance for prevention and treatment. Pathways using IL-1 $\beta$  and its cognate receptor IL1R1 have been recently implicated in the protection in several mouse chemically-induced colitis models. In this paper, we show that in acute Th2 colitis conditions, induced by oxazolone-induced mucosal damage, NOD2 as well as IL-1 has a protective role. As compared to wild-type mice, *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> animals were more sensitive to oxazolone-induced colitis associated severity and mortality. Microscopic evaluation revealed that colonic inflammation was dramatic in *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> with enhanced crypt destruction and goblet cell loss, mucosal erosion and ulceration as compared to WT mice. We next revealed that systemic administration of MDP – the cognate agonist of NOD2 – was able to protect WT mice from experimental oxazolone-colitis in term of macroscopic lesions and mortality. This is in accordance with Watanabe and al. whose revealed a MDP-induced protection against DSS or TNBS-induced colitis through the downregulation of TLR-dependent pathway (28). We extended these results by the observation that *Il1r1*<sup>-/-</sup> mice, where the NOD2-signaling pathway is intact, were, like the *Rip2*<sup>-/-</sup> mice unresponsive to MDP-treatment.

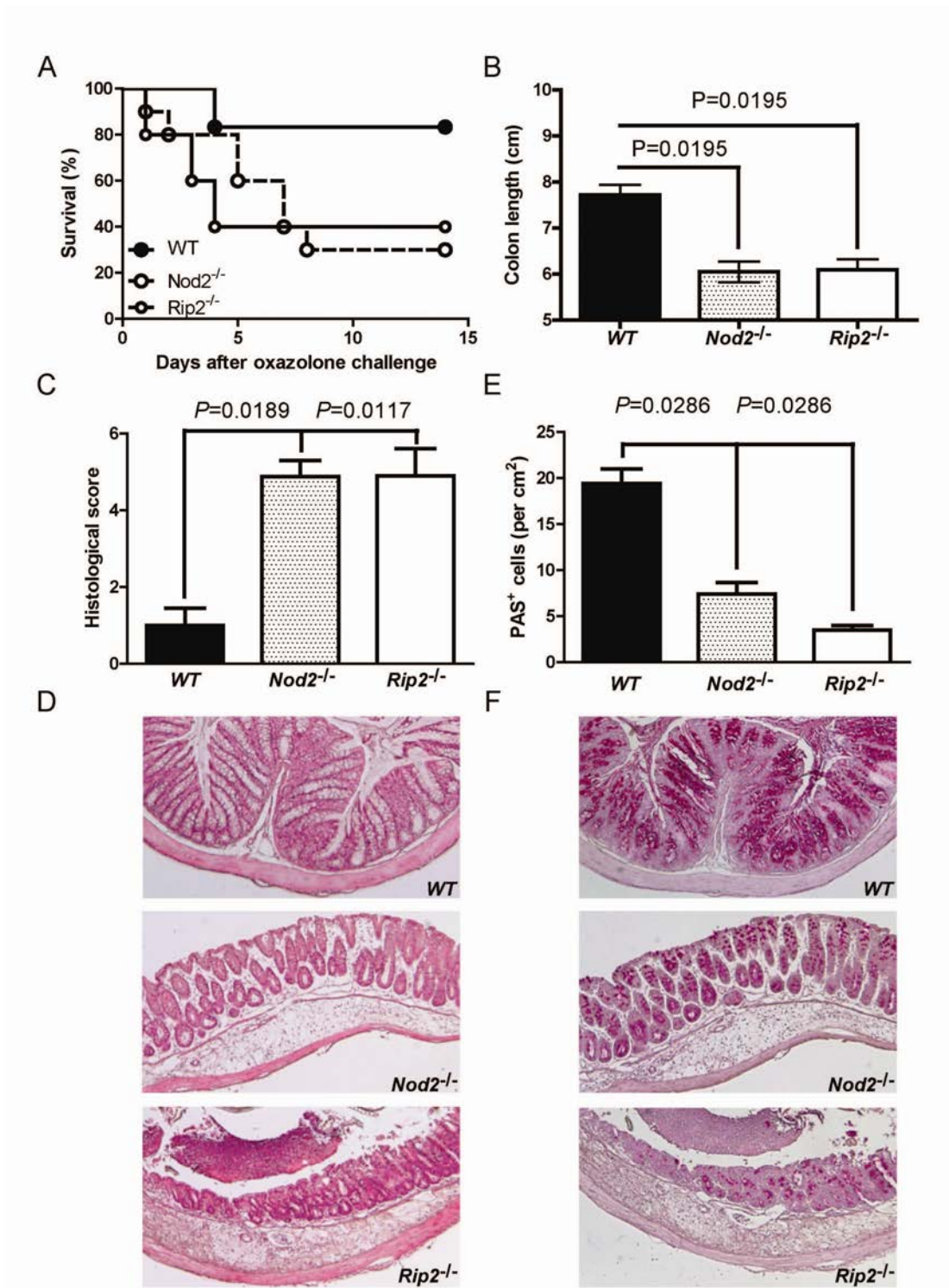
We next wanted to decipher the exact role of IL1R1 signaling pathway in oxazolone-induced colitis and its probable link with NOD2. IL-1 $\beta$ , is expressed predominantly by stimulated macrophages and monocytes (29) as a pro-cytokine that requires processing by caspase-1 the activated inflammasome (30). IL-1 $\beta$  was originally considered as a prototypical pro-inflammatory cytokine. The functions of

IL-1 $\beta$  are complex and its involvement in the physiopathology of IBD was regarded as critical. Indeed, IL-1 $\beta$  expression was detected at both mRNA and protein levels in patients suffering from CD and UC (31), and chemically-induced colitis models (32, 33). Polymorphism in the gene encoding IL1-RN has been recently associated with IBD (30). Recent studies have also associated IL-18, an inflammasome-dependent relative cytokine, as an effector cytokine in IBD (34), suggesting an increasing important role of IL-1 related pathway in IBD. Earlier studies using caspase-1 deficient mice or inhibitor considered IL-1 $\beta$  as detrimental (35, 36). Recently, it has been shown that mice deficient for IL1R1 are very susceptible to *Citrobacter rodentium*-induced colitis and this susceptibility was attributed to a direct role of IL-1 $\beta$  on colonic apoptosis but not on bacterial dissemination, leukocyte recruitment or epithelial reparation (19). The authors also investigated DSS-induced colitis and found that IL1R1 deficient mice were mildly susceptible when compared to controls. In our hands, IL1R1 deficient mice were susceptible to oxazolone-induced colitis and exhibited higher mortality.

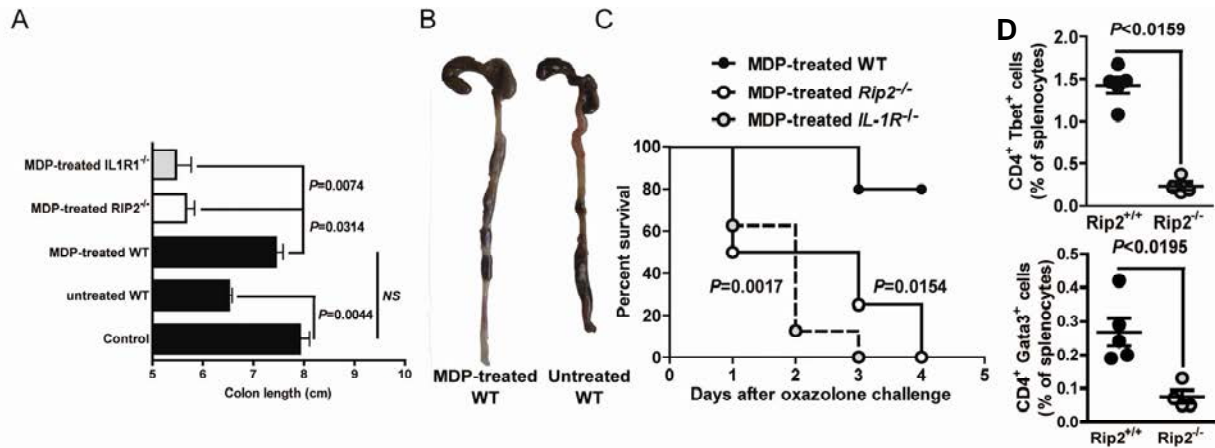
The cytosolic localization of NLRs renders them less accessible to commensal bacteria than TLRs at steady-state. However, in inflammatory conditions, invading pathobionts or derived-molecular patterns may reach the cytosol of both epithelial and myeloid cells and then activate NLR. Furthermore, danger signals generated by cell or tissue damages are also known to activate NLRs, caspase-1 and secretion of IL-1 $\beta$  (37). In addition, Xiao et al recently demonstrated that mice deficient in the negative regulator of Toll/IL-1 receptor signalling, SIGIRR, are highly susceptible to intestinal inflammation (38). These results indicate that tight control of the caspase-1-IL1R axis is critical to maintain gut immune tolerance.

Several former studies reported a link between NOD2 and IL-1 $\beta$  production. The first one highlighted the relative specificity of MDP-induced IL-1 $\beta$  production by macrophages through a NOD2-RIP2-NLRP3 dependent pathway, without demonstrating a clear association between NOD2 and the inflammasome (39). Hsu et al., next demonstrated a direct association between NOD2, through its N-terminal CARD domain with NLRP1 and caspase-1, which in return of (40). Recently, using yeast-two hybrid analysis, Wagner et al. confirmed a possible interaction between NOD2 and NLRP1, NLRP3 and NLRP12 (41).

Finally, our data suggest that NOD2 regulates T-cell homeostasis, upon injury, through the hematopoietic/myeloid and parenchymal compartments.

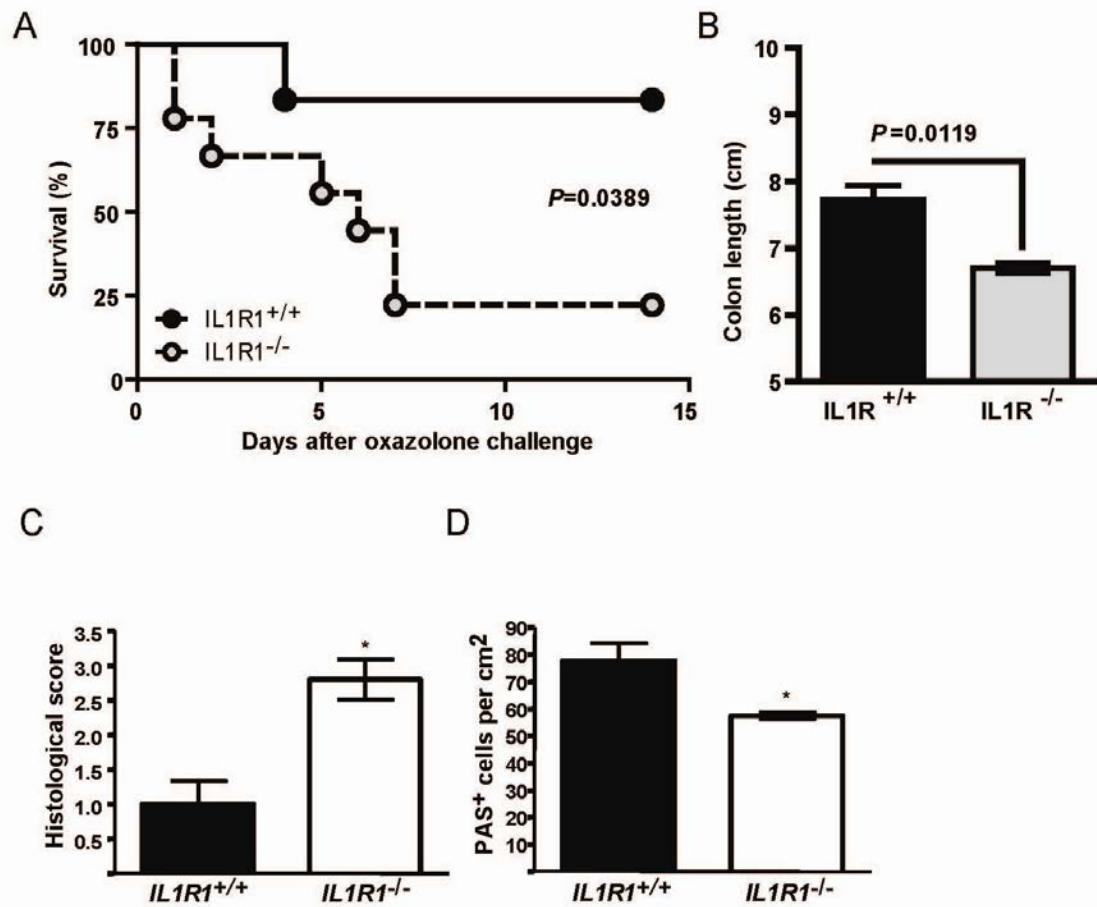


**Figure 1: NOD2 suppresses intestinal inflammation in an experimental model of colitis.** (A) Over a 14-day period, survival was monitored daily for oxazolone-treated wild-type, *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice. (B) Colon length was measured at 24h following intrarectal challenge by oxazolone. (C) Histological scoring is depicted. (D) The integrity of the colonic architecture was evaluated by hematoxylin and eosin staining (magnification, x40). (E) Number of PAS+ cells in *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Rip2*<sup>-/-</sup> colons at 24h following intrarectal challenge by oxazolone. (F) Representative periodic acid-Schiff staining of paraffin-embedded transversal sections (magnification, x40). The results are representative of three independent experiments.

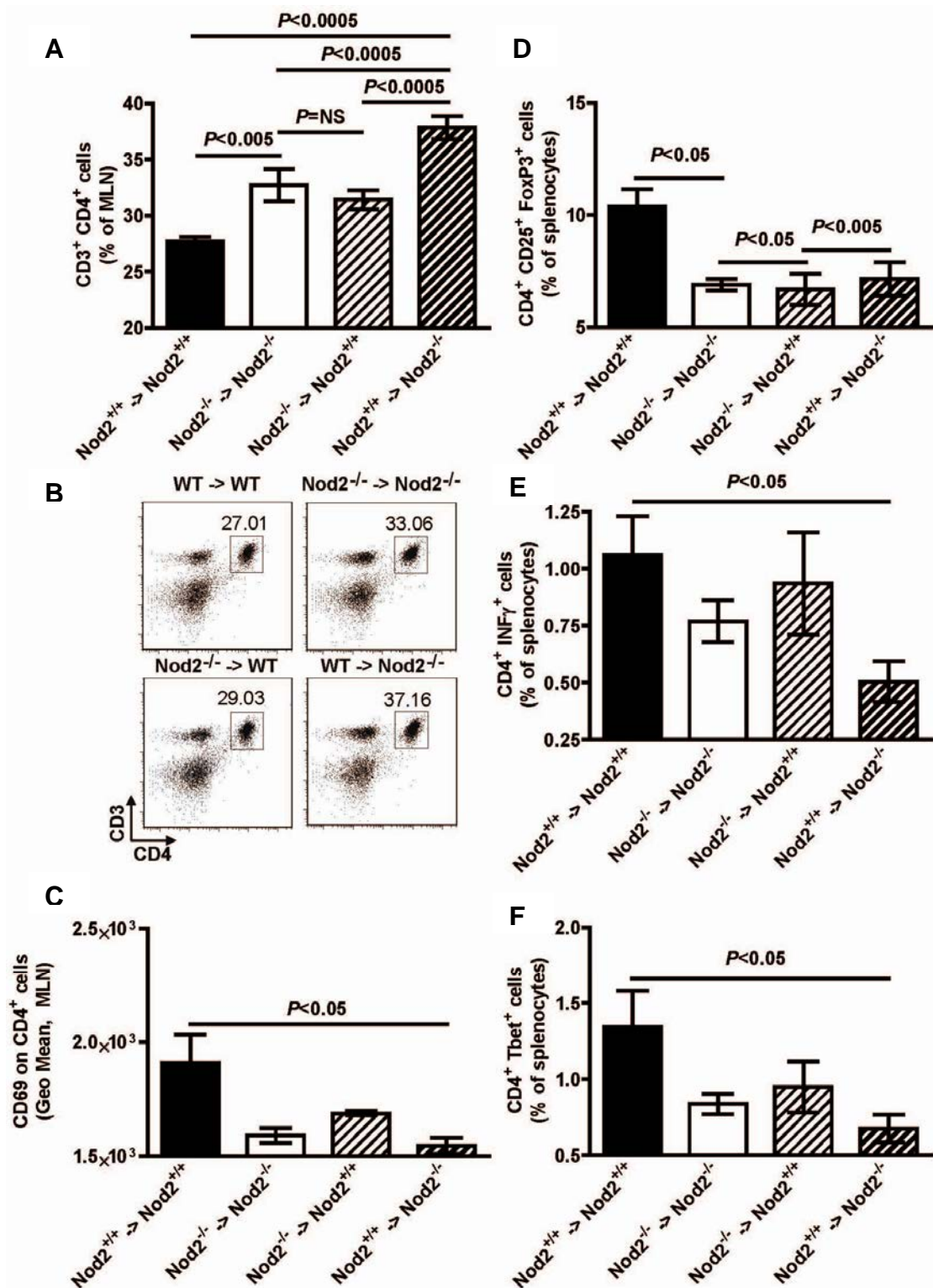


**Figure 2: The NOD2 ligand, MDP, induces protection upon oxazolone-induced colitis.**

After 3 days of MDP administration (1 mg/kg) mice were presensitized and challenged by oxazolone (respectively 1% s.c and i.r in 50% ethanol). (A) Colon length was measured at 24h following intrarectal challenge by oxazolone. (B) Representative colon of MDP-treated and untreated WT mice. (C) Over a 5-day period, survival was monitored daily for MDP-treated wild-type, *Rip2*<sup>-/-</sup> and *Il1r1*<sup>-/-</sup> mice upon oxazolone exposure. (D) Aggregate cytometric analysis of CD4<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> Gata3<sup>+</sup> in spleen of wild-type and *Rip2*<sup>-/-</sup> mice at 24h following intrarectal challenge by oxazolone. Percentage is determined upon CD3<sup>+</sup> splenocytes. The results are representative of two independent experiments.



**Figure 3: NOD2 protects mice from oxazolone-induced colitis through IL1R1.** (A) Over a 14-day period, survival was monitored daily for oxazolone-treated wild-type, *Il1r1*<sup>-/-</sup> and *Il1r1*<sup>+/+</sup> mice. (B) Colon length was measured at 24h following intrarectal challenge by oxazolone. (C) Histological scoring (D) and number of PAS+ cells are depicted.



**Figure 4: Myeloid and epithelial contribution of NOD2 signaling in T cell homeostasis upon oxazolone-induced colitis**

(A) Aggregate and (B) representative cytometric analysis of CD4<sup>+</sup> in lymph node of *Nod2*<sup>+/+</sup> → *Nod2*<sup>+/+</sup>, *Nod2*<sup>-/-</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup>, *Nod2*<sup>+/+</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Nod2*<sup>-/-</sup> → *Nod2*<sup>+/+</sup> mice. Percentage is determined upon CD3<sup>+</sup> lymphocytes. (C) Aggregate analysis of CD69 expression on CD4<sup>+</sup> in mesenteric lymph node. (D) Aggregate analysis of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells, (E) CD4<sup>+</sup> INF $\gamma$ <sup>+</sup> cells, (F) CD4<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> cells in splenocytes of *Nod2*<sup>+/+</sup> → *Nod2*<sup>+/+</sup>, *Nod2*<sup>-/-</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup>, *Nod2*<sup>+/+</sup> → *Nod2*<sup>-/-</sup> and *Nod2*<sup>-/-</sup> → *Nod2*<sup>+/+</sup> mice.



## References

1. Fiocchi, C. (1998) *Gastroenterology* **115**, 182-205.
2. Cho, J. H. & Weaver, C. T. (2007) *Gastroenterology* **133**, 1327-39.
3. Packey, C. D. & Sartor, R. B. (2009) *Curr Opin Infect Dis* **22**, 292-301.
4. Strober, W., Fuss, I. J. & Blumberg, R. S. (2002) *Annu Rev Immunol* **20**, 495-549.
5. Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. & Neurath, M. F. (2007) *Nat Protoc* **2**, 541-6.
6. Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S. & Nunez, G. (2001) *J Biol Chem* **276**, 4812-8.
7. Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L. & Nunez, G. (2003) *J Biol Chem* **278**, 5509-12.
8. Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2002) *Nature* **416**, 194-9.
9. Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G. & Flavell, R. A. (2005) *Science* **307**, 731-4.
10. Cho, J. H. (2008) *Nat Rev Immunol* **8**, 458-66.
11. Gasche, C. & Grundtner, P. (2005) *Gut* **54**, 162-7.
12. Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R. W., Chu, H., Lima, H., Jr., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E. F. & Bevins, C. L. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18129-34.
13. Bevins, C. L., Stange, E. F. & Wehkamp, J. (2009) *Gut* **58**, 882-3; discussion 883-4.

14. Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y. J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H. & Kobayashi, K. S. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15813-8.
15. Sartor, R. B. (1994) *Gastroenterology* **106**, 533-9.
16. McCall, R. D., Haskill, S., Zimmermann, E. M., Lund, P. K., Thompson, R. C. & Sartor, R. B. (1994) *Gastroenterology* **106**, 960-72.
17. Ligumsky, M., Simon, P. L., Karmeli, F. & Rachmilewitz, D. (1990) *Gut* **31**, 686-9.
18. Mahida, Y. R. & Jewell, D. P. (1990) *Gut* **31**, 1086-7.
19. Lebeis, S. L., Powell, K. R., Merlin, D., Sherman, M. A. & Kalman, D. (2009) *Infect Immun* **77**, 604-14.
20. Villani, A. C., Lemire, M., Louis, E., Silverberg, M. S., Collette, C., Fortin, G., Nimmo, E. R., Renaud, Y., Brunet, S., Libioulle, C., Belaiche, J., Bitton, A., Gaudet, D., Cohen, A., Langelier, D., Rioux, J. D., Arnott, I. D., Wild, G. E., Rutgeerts, P., Satsangi, J., Vermeire, S., Hudson, T. J. & Franchimont, D. (2009) *PLoS One* **4**, e7154.
21. Labow, M., Shuster, D., Zetterstrom, M., Nunes, P., Terry, R., Cullinan, E. B., Bartfai, T., Solorzano, C., Moldawer, L. L., Chizzonite, R. & McIntyre, K. W. (1997) *J Immunol* **159**, 2452-61.
22. Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J. & Ouyang, W. (2007) *Nature* **445**, 648-51.
23. Tamaki, H., Nakamura, H., Nishio, A., Nakase, H., Ueno, S., Uza, N., Kido, M., Inoue, S., Mikami, S., Asada, M., Kiriya, K., Kitamura, H., Ohashi, S., Fukui, T., Kawasaki, K., Matsuura, M., Ishii, Y., Okazaki, K., Yodoi, J. & Chiba, T. (2006) *Gastroenterology* **131**, 1110-21.

24. Boirivant, M., Fuss, I. J., Chu, A. & Strober, W. (1998) *J Exp Med* **188**, 1929-39.
25. Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. & Nakaya, R. (1990) *Gastroenterology* **98**, 694-702.
26. Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T. A., Chen, F. F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J. H., Hart, J., Greenson, J. K., Keshav, S. & Nunez, G. (2003) *Gut* **52**, 1591-7.
27. Boden, E. K. & Snapper, S. B. (2008) *Curr Opin Gastroenterol* **24**, 733-41.
28. Watanabe, T., Asano, N., Murray, P. J., Ozato, K., Taylor, P., Fuss, I. J., Kitani, A. & Strober, W. (2008) *J Clin Invest* **118**, 545-59.
29. March, C. J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D. P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C. S., Kronheim, S. R., Grabstein, K. & et al. (1985) *Nature* **315**, 641-7.
30. Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R. & Nunez, G. (2009) *Nat Immunol* **10**, 241-7.
31. Cappello, M., Keshav, S., Prince, C., Jewell, D. P. & Gordon, S. (1992) *Gut* **33**, 1214-9.
32. Villegas, I., Alarcon de la Lastra, C., Orjales, A. & La Casa, C. (2003) *Int Immunopharmacol* **3**, 1731-41.
33. Tsune, I., Ikejima, K., Hirose, M., Yoshikawa, M., Enomoto, N., Takei, Y. & Sato, N. (2003) *Gastroenterology* **125**, 775-85.
34. Dinarello, C. A. (2007) *Semin Nephrol* **27**, 98-114.
35. Siegmund, B., Lehr, H. A., Fantuzzi, G. & Dinarello, C. A. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13249-54.

36. Loher, F., Bauer, C., Landauer, N., Schmall, K., Siegmund, B., Lehr, H. A., Dauer, M., Schoenharting, M., Endres, S. & Eigler, A. (2004) *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 583-90.
37. Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D. A. & Tschopp, J. (2007) *Curr Opin Immunol* **19**, 615-22.
38. Xiao, H., Gulen, M. F., Qin, J., Yao, J., Bulek, K., Kish, D., Altuntas, C. Z., Wald, D., Ma, C., Zhou, H., Tuohy, V. K., Fairchild, R. L., de la Motte, C., Cua, D., Vallance, B. A. & Li, X. (2007) *Immunity* **26**, 461-75.
39. Pan, Q., Mathison, J., Fearn, C., Kravchenko, V. V., Da Silva Correia, J., Hoffman, H. M., Kobayashi, K. S., Bertin, J., Grant, E. P., Coyle, A. J., Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Flavell, R. A. & Ulevitch, R. J. (2007) *J Leukoc Biol* **82**, 177-83.
40. Hsu, L. C., Ali, S. R., McGillivray, S., Tseng, P. H., Mariathasan, S., Humke, E. W., Eckmann, L., Powell, J. J., Nizet, V., Dixit, V. M. & Karin, M. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7803-8.
41. Wagner, R. N., Proell, M., Kufer, T. A. & Schwarzenbacher, R. (2009) *PLoS One* **4**, e4931.

## Résultats complémentaires

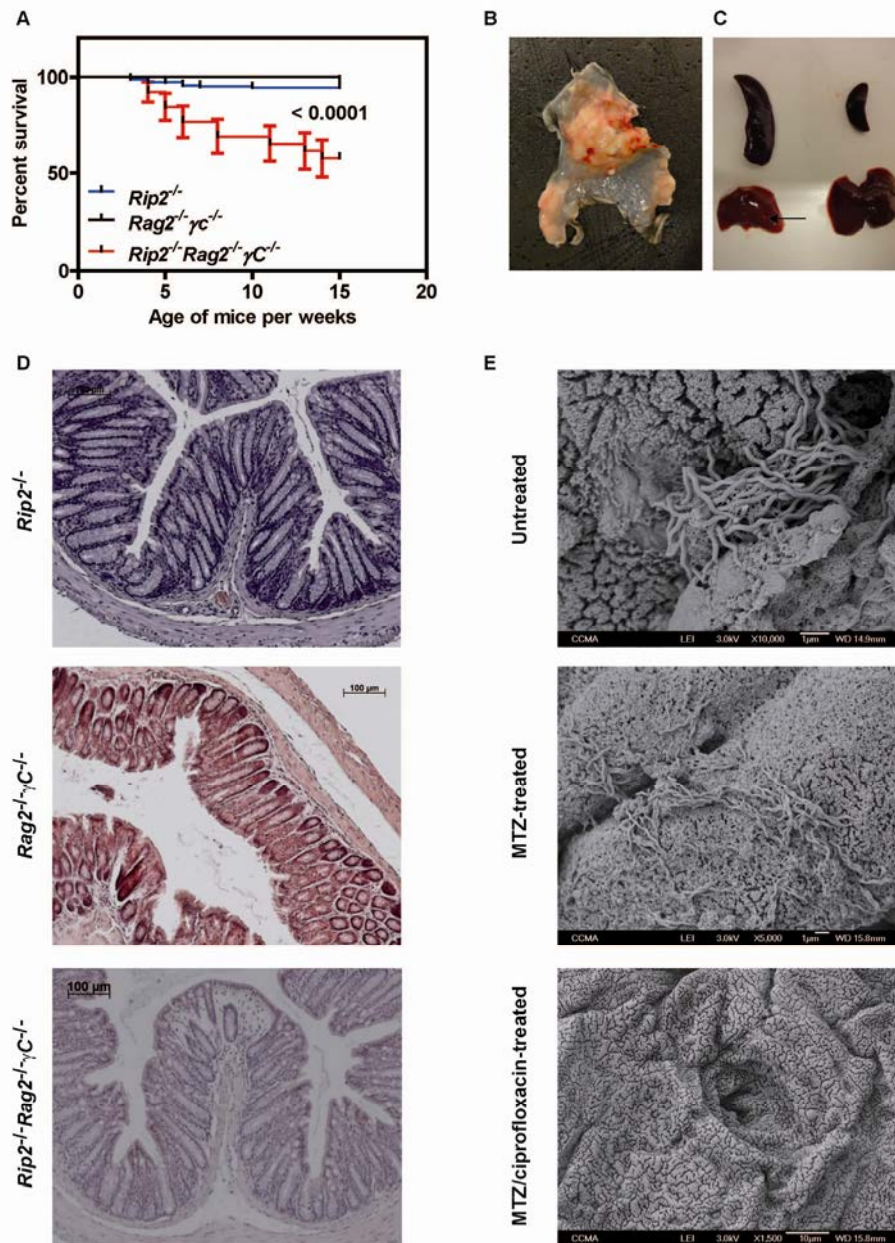
### La déficience en Rip2 et Rag2 $\gamma$ C provoque l'apparition d'abcès spontanés et de lésions intestinales.

En vue d'étudier l'éventuel rôle compensateur de RIP2 sur l'immunité adaptative un modèle de souris dépourvu de cellules immunitaires adaptatives et de certaines cellules innées telles que les cellules NK (Natural Killer) ou les ILC (Innate Lymphoid cells) a été mis en place par croisement de souris *Rip2*<sup>-/-</sup> et *Rag2*<sup>-/-</sup> $\gamma$ C<sup>-/-</sup>. RAG2 est une des enzymes permettant le réarrangement et la recombinaison des gènes VDJ codant pour les fragments composant les immunoglobulines, ainsi que les BCR (B cell receptors) et TCR (T cell receptors) présents respectivement à la surface des lymphocytes B et T. L'absence du gène *Rag2* codant cette enzyme conduira donc à la production de lymphocytes non fonctionnels. D'autre part, la chaîne  $\gamma$ C est une sous-unité commune à plusieurs récepteurs de cytokines telles que l'IL-2, 4, 7, 9, 15 et 21 et dirige la croissance et la maturation des cellules NK ainsi que des lymphocytes T et B.

Rapidement les animaux *Rip2*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup> $\gamma$ C<sup>-/-</sup> ainsi générés ont montré une mortalité importante en comparaison avec des animaux *Rip2*<sup>-/-</sup> ou *Rag2*<sup>-/-</sup> $\gamma$ C<sup>-/-</sup> (Figure 19A). Mortalité, souvent observée suite à l'apparition d'abcès cutanés spontanés pouvant être localisés au niveau axillaire et au niveau du museau des souris (Figure 19B). De plus, l'autopsie a pu révéler une splénomégalie et la présence de zones de nécrose dans le foie chez les animaux présentant des abcès (Figure 19C). Une analyse histologique du foie et de la rate a permis de confirmer une nécrose hépatique mais aucune anomalie au niveau splénique n'a pu être caractérisée en comparaison avec des animaux *Rag2*<sup>-/-</sup> $\gamma$ C<sup>-/-</sup> (Non montré).

Les coupes histologiques de côlons issus d'animaux *Rip2*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup> $\gamma$ C<sup>-/-</sup> ont montré la présence de foyers lésés contenant des cellules mononucléées alors qu'aucune lésion inflammatoire n'est observée chez les animaux *Rip2*<sup>-/-</sup> ni chez les animaux *Rag2*<sup>-/-</sup> $\gamma$ C<sup>-/-</sup> (Figure 19D). Afin d'identifier un éventuel pathogène pouvant induire ces lésions, une analyse de la muqueuse du côlon par microscopie électronique sur des animaux *Rip2*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup> $\gamma$ C<sup>-/-</sup> non traités ou suite à un traitement antibiotique par du

métronidazole (MTZ) ou un cocktail MTZ et ciprofloxacine a été réalisée. En effet, l'analyse par microscopie permet d'observer tous les micro-organismes présents à la surface muqueuse en s'affranchissant de leurs conditions de culture.



**Figure 19 : La déficience en *Rip2* et *Rag2γC* provoque l'apparition d'abcès spontanés et de lésions intestinales.**

(A) survie des animaux *Rip2*<sup>-/-</sup> (ligne bleue), *Rag2*<sup>-/-</sup>*γC*<sup>-/-</sup> (ligne noire) et *Rip2*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>*γC*<sup>-/-</sup> (ligne rouge). (B) Observation macroscopique d'un abcès cutané après autopsie d'une souris *Rip2*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>*γC*<sup>-/-</sup>. (C) Observation macroscopique de la rate et du foie d'une souris *Rip2*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>*γC*<sup>-/-</sup> présentant un abcès cutané (panel de gauche) ou ne présentant pas de lésion cutanée (panel de droite). La flèche indique la présence d'une zone de nécrose. (D) Coupe histologique transversale de côlon après coloration par de l'hématoxyline et de l'éosine. (E) Des souris *Rip2*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>*γC*<sup>-/-</sup> ont été traitées dans leur eau de boisson par du métronidazole (MTZ : 2,5 g/L), un cocktail contenant du métronidazole (2,5 g/L) et de la ciprofloxacine (0,6 mg/mL) ou non traitées pendant 27 jours. Après autopsie la muqueuse intestinale du côlon a été fixée par un tampon phosphate 0,1M contenant 2% glutaraldéhyde puis analysée par microscopie électronique.

Les observations de microscopie électronique ont pu révéler la présence de bactéries spiralées de 3 à 4 µm de long chez les animaux non traités et traités au métronidazole, alors que le cocktail MTZ/ciprofloxacine a éliminé la quasi-totalité des micro-organismes de la muqueuse (Figure 19E). Un pyroséquençage du mucus du côlon a permis d'identifier *Helicobacter hepaticus* (*H.h*), largement représenté dans notre modèle. En accord, *H.h* est une bactérie à Gram-négatif spiralée, microaérophile, de 1,5 à 5 µm de long, sensible à la ciprofloxacine pouvant coloniser le tractus gastrointestinal de la souris.

Le pyroséquençage du mucus du côlon a également mis en évidence la présence de norovirus (ou MNV) montré comme capable de potentialiser une inflammation bactérienne de façon dépendante de NOD1/NOD2 et RIP2 [282].

## Discussion et perspectives

### Effet de la déficience en *Nod2* dans la colite et le cancer colorectal

Le modèle murin de colite chimique utilisant le DSS, premièrement décrit par Okayasu [283], a été depuis largement caractérisé par l'apparition de signes cliniques semblables aux MICI comme la perte de poids, l'apparition de diarrhées, la présence de sang dans les selles. De même, l'aspect histologique des côlons révélant des dommages épithéliaux avec une perte de l'architecture des cryptes intestinales, la présence d'ulcérations ainsi que l'infiltrat de cellules immunitaires dont des neutrophiles après traitement par du DSS, est également comparable à ces pathologies [284].

Une étude récente montre que la déficience en *Nod2* n'a pas d'impact sur la sévérité de la colite induite par le DSS [285] alors que nous avons mis en évidence que ces animaux présentaient une perte de poids, une mortalité et un score histologique augmentés ainsi qu'une réduction de la taille de leur côlon en comparaison avec des animaux sauvages. Cette contradiction souligne l'importance à la fois du génotype et du microbiote dans la susceptibilité des souris *Nod2*<sup>-/-</sup>. En effet, ce travail utilise les animaux WT et *Nod2*<sup>-/-</sup> d'une même portée pour leurs expériences. Comme nous l'avons montré, un transfert de flore a pu avoir lieu par la mère ou par les congénères d'une même cage augmentant la susceptibilité des souris WT dans le modèle de colite DSS.

L'administration de DSS de façon chronique est capable d'induire des dommages de l'ADN, ayant pour conséquence l'apparition limitée d'adénomes au niveau de la muqueuse du côlon. Cette apparition d'adénomes peut être accélérée par administration préalable d'azoxyméthane, un pro-carcinogène [276, 286].

Différentes études ont mis en évidence l'association de variants de *Nod2* avec le CCR [287-290] alors que d'autres études dans des populations différentes n'ont pas confirmé cette observation [291-293]. Aux vues de ces résultats, l'implication du gène *Nod2* dans la survenue du CAC a été étudiée chez la souris dans le modèle DSS/AOM.

Nous avons vu qu'en présence d'une déficience génétique en *Nod2*, une inflammation intestinale médiée par le DSS pouvait se mettre en place et que suite à l'administration d'AOM et dans un contexte chronique cette inflammation favorisait la



tumorigenèse. De la même façon, Il avait été montré que la déficience en *Nod1* favorisait l'accroissement des tumeurs dans ce modèle de CAC [294] pouvant rendre compte de la susceptibilité accrue à la fois à la colite et au CAC des animaux *Rip2*<sup>-/-</sup> en comparaison aux animaux *Nod2*<sup>-/-</sup>. Effectivement, NOD1 et NOD2 empruntent tous deux le même adaptateur protéique, RIP2, et le sur-risque observé chez les animaux *Rip2*<sup>-/-</sup> pourrait résulter du blocage simultané de ces deux voies.

Par conséquent, nos résultats confirment un rôle protecteur de *Nod2* et *Rip2* sur l'apparition de CAC chez la souris. Les perspectives de notre étude pourraient permettre de comprendre comment le récepteur NOD2 prévient de la tumorigenèse en réponse à la flore commensale.

### **La dysbiose dans la MC et le CCR**

Comme ce qui a été observé pour les animaux *Nod1*<sup>-/-</sup> [294], un traitement antibiotique à large spectre réduit la sensibilité accrue à l'inflammation intestinale induite par le DSS ainsi que la tumorigenèse à la fois chez des animaux WT et déficients pour *Nod2* suggérant une implication bactérienne.

De nombreuses études ont tenté de mettre en cause des pathogènes tels que *Clostridium difficile*, *Listeria*, *E. coli* ou *Mycobacterium paratuberculosis* comme étant responsables de la maladie de Crohn [241]. Mais il est difficile d'incriminer un seul pathogène. En effet, le microbiote regroupe une multitude d'espèces bactériennes pouvant interagir entre elles par l'intermédiaire de relations favorables (commensalisme, symbiose, synergie) ou défavorables (parasitisme, antagonisme), formant ainsi une communauté microbienne complexe. L'élimination d'une espèce pourrait alors perturber la structure de toute la communauté. Dans ce cas, la dysbiose mise en place pourrait participer à l'apparition de l'inflammation intestinale. Au contraire, la dysbiose pourrait résulter d'une inflammation chronique perturbant la réponse inflammatoire et conduisant à la perte de la reconnaissance des bactéries commensales. Il est donc encore difficile de comprendre si la dysbiose est une cause ou une conséquence des MICI.

Bien que la susceptibilité à la colite et au CAC des animaux *Nod2*<sup>-/-</sup> soit plus importante que pour les animaux WT, les changements observés pourraient provenir de statuts inflammatoires différents. Mais, nous avons observé que des animaux axéniques WT montraient une vulnérabilité accrue au DSS après recolonisation par des fèces de souris naïves déficientes pour *Nod2*. De plus, les animaux WT qui ont

été co-hébergés transitoirement avec des animaux *Nod2*<sup>-/-</sup> ou *Rip2*<sup>-/-</sup> avant l'administration du DSS ont également montré une susceptibilité accrue à la colite expérimentale. D'autre part, Les souris *Nod2*<sup>-/-</sup> présentent une dysbiose [295] et nous avons observé que cette flore pouvait être transmise chez l'adulte et le nouveau-né WT.

Nos données démontrent que la déficience en *Nod2* crée une niche écologique qui confère un risque de transmissibilité pour l'inflammation intestinale et la carcinogenèse. Ces observations suggèrent que la dysbiose présente chez les animaux *Nod2*<sup>-/-</sup> soit à l'origine du sur-risque de colite après la provocation de lésions de la barrière muqueuse par le DSS. Ceci met en évidence le rôle complexe de la fonction barrière de la muqueuse colique lors d'une dysbiose dans un contexte déficient en *Nod2* ou *Rip2*.

Nous pouvons alors nous demander comment la dysbiose peut prendre part à l'apparition de colites et de tumeurs. La dysbiose pourrait contribuer aux MICI par l'émergence et/ou l'expansion de bactéries colitogènes [278, 296] ou la réduction de souches protectrices [6]. La déficience en *Nod2* pourrait également induire l'émergence de pathobiontes transmissibles comme ce qui a pu être observé en l'absence de *Rag2* et *T-bet* [247] ainsi que chez les animaux *Nlrp6*<sup>-/-</sup> [10]. Dans un contexte où la flore intestinale ne jouerait pas son rôle de barrière, l'implantation de bactéries commensales pourrait être observée. La translocation de ces bactéries à travers l'épithélium pourrait alors entraîner une pathologie chez l'hôte. Ou encore, cette déficience pourrait permettre l'implantation de pathogènes dans l'intestin qui orienterait le système immunitaire vers une réponse pro-inflammatoire. Malgré un maintien des animaux en zone d'élevage SPF (Specific Pathogen Free), des pathogènes pourraient être présents. En effet, dans ce type de zone d'élevage seul une liste restreinte de pathogènes est contrôlée.

Nos résultats ont mis en évidence l'expression augmentée de la claudine 5 chez des souris WT après transfert de flore d'animaux déficients pour *Nod2* ou *Rip2*. La Claudine 5 est une protéine membranaire impliquée dans la formation des jonctions serrées. Dans la MC, la structure et le nombre des jonctions serrées entre les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale sont modifiés ayant pour conséquence d'augmenter la perméabilité intestinale et donc de favoriser le passage

bactérien à travers la muqueuse participant à l'inflammation. Une diminution de l'expression ainsi qu'une redistribution des claudines 5 et 8 contribueraient aux changements observés dans les jonctions serrées [250].

Nos résultats indiquent, qu'au contraire, le microbiote issu de souris déficientes pour *Nod2* conduirait à l'induction de l'expression de la claudine 5 chez des animaux WT.

De nombreux cancers humains présentent une expression anormalement élevée des claudines entrant dans la composition des jonctions serrées entre les cellules. Il faut noter que la claudine 5 serait plus particulièrement exprimée dans les cellules endothéliales mais aussi dans les tumeurs épithéliales [297].

Suite à une rupture de la barrière intestinale induite par le DSS, le microbiote dysbiotique des souris *Nod2*<sup>-/-</sup> pourrait donc favoriser la tumorigenèse en surexprimant la claudine 5 en maintenant les jonctions serrées entre les cellules épithéliales mais également en favorisant l'angiogenèse. Il reste tout de même à déterminer si les transcrits de la claudine 5, dont le nombre est augmenté, conduisent à la production de protéines fonctionnelles localisées au niveau des jonctions intercellulaires afin d'étayer cette hypothèse.

### **Régulation de la composition du microbiote par NOD2**

Chez l'Homme et chez la souris, NOD2 est impliqué dans la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth dans l'iléon et par les cellules épithéliales au niveau du côlon [298]. La production de ces molécules est un moyen de défense innée contre les micro-organismes. De plus, la flore elle-même aide au maintien de la production de peptides antimicrobiens comme Reg3β qui permettrait la séquestration de la flore commensale et l'élimination de bactéries pathogènes [281]. Par conséquent, les molécules antimicrobiennes pourraient participer à l'établissement de la dysbiose observée chez les souris déficientes pour *Nod2*. En effet, nous avons pu observer une diminution de la production de la lectine de type C Reg3β chez les souris *Nod2*<sup>-/-</sup>. Il reste à déterminer si l'absence de Reg3β suffit à rendre compte de la dysbiose et de la prédisposition à la colite observée en absence de *Nod2*.

Hormis la compréhension des mécanismes conduisant à la dysbiose, sa caractérisation qualitative et quantitative semble importante en vue d'appréhender quelles bactéries entrent en jeu dans les MICI et dans le CAC. Ceci pourrait aider à restaurer les interactions entre le microbiote et la muqueuse intestinale afin

d'élaborer des thérapies pour les patients. L'utilisation d'antibiotiques et de probiotiques pour le traitement des MICI va dans ce sens mais l'application de ces traitements à tous les patients est difficile étant donné la grande variabilité microbienne et génétique existante entre les individus.

### **Détection du microbiote en absence de NOD2 et implication dans la tumorigenèse**

Une augmentation de la susceptibilité à la colite et à au CAC a été observée chez les souris déficientes en *Nod2* et pourrait être liée à la dysbiose présente chez ces animaux. En absence de NOD2 quels récepteurs pourraient alors permettre la reconnaissance de ce microbiote ?

Jusqu'à lors, le rôle de NOD2 dans la tumorigenèse restait indéterminé. Au contraire, de nombreux TLR, NLR et de certains de leurs adaptateurs protéiques, médiant leur signalisation, ont déjà pu être mis en évidence comme participant à cette pathologie. TLR2 [299] et son adaptateur MyD88 [300], NOD1 [294], NLRP6 [301, 302] ainsi NLRP3 et ses adaptateurs ASC et Caspase 1 [303, 304] exerceraient un rôle protecteur à l'encontre de la tumorigenèse alors que TLR4 exercerait une fonction délétère [305]. TLR4 pourrait par conséquent participer à la reconnaissance du microbiote lorsque NOD2 est absent. D'autant plus qu'un dialogue semble exister entre NOD2 et TLR4. En effet, les souris déficientes pour *Nod2* présentent une augmentation de la transcription de TLR4 [231] et NOD2 pourrait médier une tolérance à l'encontre des bactéries en inhibant la voie TLR4 [306, 307]. Une fois la tolérance levée, en absence de NOD2, TLR4 pourrait donc prendre le relais et induire une réponse inflammatoire excessive en réponse au microbiote intestinal qui, à long terme, pourrait conduire à une tumorigenèse.

### **La cytokine IL-6 acteur principal dans les lésions inflammatoires chroniques et la progression tumorale**

La dysbiose chez les animaux *Nod2* déficients a été identifiée comme un déterminant clé pour une réponse inflammatoire exacerbée de l'épithélium intestinal. Dans notre étude, la sévérité de la maladie a été liée à une réponse médiée par l'IL-6 accélérant ainsi la progression tumorale.

En effet, la signalisation de l'IL-6 via ses récepteurs l'IL-6R et le gp130Fc participerait non seulement au développement de colites [308, 309] mais également à l'initiation

et la progression tumorale [310]. Il semblerait que l'IL-6 favorise la prolifération et la survie des entérocytes par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription STAT3 [311, 312]. Une étude récente suggère que l'IL-6 soit produite en réponse à des dommages de l'ADN [313] par l'intermédiaire de la voie STAT3/IL-6 pouvant expliquer son implication dans de nombreux cancers humains.

Dans les modèles de colite et de CAC nous avons observé une augmentation de l'IL-6. Il reste désormais à déterminer si l'IL-6 est nécessaire et suffisante à la réponse de la muqueuse intestinale à la flore colitogène chez les souris *Nod2*<sup>-/-</sup>.

Alors que les souris *Nod2*<sup>-/-</sup> présentaient un nombre de tumeurs plus important et une diversité microbienne réduite en comparaison aux souris WT, la thérapie anti IL-6R a permis de réduire la tumorigenèse et de restaurer la diversité microbienne. Après ce traitement, la structure globale du microbiote ainsi que les proportions des *Bacteroidetes* et *Firmicutes* ont pu être rééquilibrées. Par conséquent, la carcinogenèse médiée par l'IL-6 a été identifiée comme conduisant à des changements du microbiote associé au côlon de façon dépendante de *Nod2*.

### **Cellules orchestrant l'inflammation**

Différents types cellulaires pourraient participer à l'établissement de l'inflammation chez les animaux déficients pour *Nod2* et *Rip2*. Nos résultats ont pu montrer une augmentation des neutrophiles chez les souris *Nod2*<sup>-/-</sup> en comparaison aux WT alors que nous n'avons pas mis en évidence de changement dans le nombre de macrophages et de DC entre les deux génotypes. Mais il semblerait que le recrutement de neutrophiles soit lié à l'inflammation médiée par le microbiote intestinal puisque le traitement antibiotique est capable de réduire leur nombre.

Nous avons vu que NOD2 pourrait exercer son effet protecteur de la colite en maintenant la composition du microbiote grâce à la production de peptides antimicrobiens. Mais NOD2 pourrait également réduire l'inflammation en réponse au microbiote par l'intermédiaire des lymphocytes. En vue de déterminer si les lymphocytes peuvent médier l'inflammation chez les animaux *Nod2*<sup>-/-</sup> et *Rip2*<sup>-/-</sup> un modèle de souris triple KO *Rip2*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>*γC*<sup>-/-</sup> a été élaboré.

De manière inattendue, ces animaux ont présenté une inflammation du côlon qui semble résulter d'une infection par *Helicobacter hepaticus* (*H.h*). En effet, les cellules du système immunitaire inné sont capables de conduire au développement d'une inflammation intestinale [311] ainsi qu'au développement de carcinomes [314] chez

des souris *Rag2*<sup>-/-</sup> suite à une infection par *H.h.* Le transfert adoptif de lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> pourrait alors inhiber l'inflammation induite par cette bactérie [311, 314] suggérant que l'inflammation soit médiée par les cellules immunitaires innées et contrôlée par les cellules régulatrices de l'immunité acquise.

D'autre part, *Nod2* et *Rip2* pourraient limiter la colonisation iléale par *H.h.* [309, 315] et l'expression d'un transgène codant la défensine HD5 chez des animaux *Nod2*<sup>-/-</sup> est capable de réduire l'inflammation induite par cette bactérie [315].

Cette observation renforce l'idée que l'immunité innée et acquise agissent de manière concertée pour limiter l'inflammation. D'une part l'immunité innée détecte et limite l'invasion de la muqueuse par les micro-organismes indésirables par exemple en produisant des peptides antimicrobiens et en déclenchant l'immunité acquise qui pourra alors éliminer les pathogènes si l'immunité innée a échoué et/ou limiter une inflammation excessive par la production de cellules régulatrices.

Pour conclure sur notre étude, dans un contexte déficient pour *Nod2*, une réponse inflammatoire à la flore intestinale dépendante de l'IL-6 favoriserait la mise en place d'une flore colitogène qui prédisposerait au CAC. Le caractère transmissible de cette flore colitogène représente en soi un outil pour l'étude des interactions avec le système immunitaire inné et adaptatif. Enfin, la caractérisation du microbiote colitogène, permettra la mise au point de thérapies ciblées en vue de réduire la tumorigenèse associée à une inflammation persistante chez ces patients.

### **Rôle de *Nod2* et de la voie IL-1 dans un modèle de colite Th2.**

Dans l'article 2, nous avons montré que les animaux déficients pour *Nod2* et *Rip2* présentaient une susceptibilité accrue à la colite de type Th2 induite par un haptène, l'oxazolone. Cette augmentation de la susceptibilité est accompagnée d'une réduction des populations Th1 et Th2 spléniques.

Le MDP est motif minimum du peptidoglycane bactérien capable de stimulé spécifiquement NOD2. L'utilisation de ce ligand, dans le modèle oxazolone, a tendance à réduire la susceptibilité des animaux WT alors que les souris déficientes en *Rip2* et en *Il1r1* conservent une susceptibilité importante. De plus les animaux *Il1r1* déficients présentent une susceptibilité à la colite Th2 augmentée, suggérant un rôle protecteur de la voie IL1R1 dans ce modèle. NOD2, son adaptateur RIP2 ainsi que NLRP3 sont requis pour la production et la maturation d'IL-1 $\beta$  en réponse au

MDP [316]. De plus la signalisation IL-1R exerce un effet protecteur à l'encontre de la colite induite par *Citrobacter rodentium* [317]. Une étude récente suggère que le blocage de l'IL-1 $\beta$  inhibe la production de cytokines inflammatoires induite par le MDP chez les macrophages. Cette étude met en évidence un rôle de l'IL-1 $\beta$  dans la sécrétion autocrine de cytokines inflammatoire chez les macrophages en réponse à une stimulation de NOD2 par du MDP. Cette boucle de régulation autocrine serait également responsable de l'activation des MAPK, JNK et p38 par le MDP [318]. Cette IL-1 autocrine pourrait donc exercer son effet protecteur en régulant la production de cytokines pro-inflammatoire induite par NOD2 en réponse au MDP.

Pour conclure, ces résultats suggèrent que les mutations de NOD2 pourraient entraîner des défauts à la fois d'immunité innée et d'immunité adaptative en réponse à la dysbiose ce qui participerait à l'établissement de la maladie de Crohn et à la carcinogénèse.

## Références bibliographiques

1. *small intestine: cell types*. 11 Jan. 2012, Art. *Encyclopædia Britannica Online Web*.
2. Chamailard, M., et al., *Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(6): p. 3455-60.
3. Wehkamp, J., et al., *Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(50): p. 18129-34.
4. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. *Science*, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
5. Nenci, A., et al., *Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation*. *Nature*, 2007. **446**(7135): p. 557-61.
6. Sokol, H., 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**(43): p. 16731-6.
7. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. *Cell*, 2004. **118**(2): p. 229-41.
8. Rakoff-Nahoum, S., L. Hao, and R. Medzhitov, *Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis*. *Immunity*, 2006. **25**(2): p. 319-29.
9. Watanabe, T., et al., *Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(2): p. 545-59.
10. Elinav, E., et al., *NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis*. *Cell*, 2011. **145**(5): p. 745-57.
11. Heath, J.W., A. Stevens, and B. Young, *Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather*. De Boeck ed. 2008.
12. van der Flier, L.G. and H. Clevers, *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium*. *Annu Rev Physiol*, 2009. **71**: p. 241-60.
13. Noah, T.K., B. Donahue, and N.F. Shroyer, *Intestinal development and differentiation*. *Exp Cell Res*, 2011. **317**(19): p. 2702-10.
14. Neutra, M.R., *Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(5 Pt 1): p. G785-91.
15. Lorenz, R.G. and R.D. Newberry, *Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1029**: p. 44-57.
16. Eberl, G., *Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway?* *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(5): p. 413-20.
17. Heel, K.A., et al., *Review: Peyer's patches*. *J Gastroenterol Hepatol*, 1997. **12**(2): p. 122-36.
18. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 745-56.
19. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(1): p. 45-65.
20. Mukhopadhyay, S., J.R. Hoidal, and T.K. Mukherjee, *Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology*. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 125.



21. Faustman, D. and M. Davis, *TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(6): p. 482-93.
22. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
23. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 519-50.
24. Kobayashi, Y., et al., *Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5548-52.
25. Black, R.A., et al., *A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta*. J Biol Chem, 1989. **264**(10): p. 5323-6.
26. Gu, Y., et al., *Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme*. Science, 1997. **275**(5297): p. 206-9.
27. Colotta, F., et al., *Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4*. Science, 1993. **261**(5120): p. 472-5.
28. Naka, T., N. Nishimoto, and T. Kishimoto, *The paradigm of IL-6: from basic science to medicine*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S233-42.
29. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334 ( Pt 2)**: p. 297-314.
30. Kopf, M., M.F. Bachmann, and B.J. Marsland, *Averting inflammation by targeting the cytokine environment*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(9): p. 703-18.
31. Scheller, J. and S. Rose-John, *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Med Microbiol Immunol, 2006. **195**(4): p. 173-83.
32. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
33. Libert, C., et al., *Response of interleukin-6-deficient mice to tumor necrosis factor-induced metabolic changes and lethality*. Eur J Immunol, 1994. **24**(9): p. 2237-42.
34. Barton, B.E., *IL-6: insights into novel biological activities*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **85**(1): p. 16-20.
35. Opal, S.M. and V.A. DePalo, *Anti-inflammatory cytokines*. Chest, 2000. **117**(4): p. 1162-72.
36. Sabat, R., *IL-10 family of cytokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(5): p. 315-24.
37. Sabat, R., et al., *Biology of interleukin-10*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(5): p. 331-44.
38. Dickensheets, H.L., et al., *Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes*. Blood, 1997. **90**(10): p. 4162-71.
39. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
40. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
41. Dubois, C.M., et al., *Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10618-24.
42. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal transduction by the TGF-beta superfamily*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1646-7.
43. Adams, D.H. and A.R. Lloyd, *Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines*. Lancet, 1997. **349**(9050): p. 490-5.

44. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
45. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
46. Anderson, K.V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product*. Cell, 1985. **42**(3): p. 791-8.
47. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
48. Kumagai, Y., O. Takeuchi, and S. Akira, *Pathogen recognition by innate receptors*. J Infect Chemother, 2008. **14**(2): p. 86-92.
49. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
50. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
51. West, A.P., A.A. Koblansky, and S. Ghosh, *Recognition and signaling by toll-like receptors*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 409-37.
52. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
53. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
54. Horng, T., G.M. Barton, and R. Medzhitov, *TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 835-41.
55. Oshiumi, H., et al., *TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 161-7.
56. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
57. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.
58. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
59. Yamamoto, M., et al., *TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1144-50.
60. Sato, S., et al., *Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 4304-10.
61. Franchi, L., et al., *Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 106-28.
62. Chen, G., et al., *NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 365-98.
63. Yeretssian, G., *Effector functions of NLRs in the intestine: innate sensing, cell death, and disease*. Immunol Res, 2012.

64. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
65. Agostini, L., et al., *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 319-25.
66. Bryant, C. and K.A. Fitzgerald, *Molecular mechanisms involved in inflammasome activation*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(9): p. 455-64.
67. Inohara, N., et al., *Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14560-7.
68. Gutierrez, O., et al., *Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41701-5.
69. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
70. Ogura, Y., et al., *Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis*. Gut, 2003. **52**(11): p. 1591-7.
71. Inohara, N., et al., *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
72. Clarke, T.B. and J.N. Weiser, *Intracellular sensors of extracellular bacteria*. Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 9-25.
73. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
74. Girardin, S.E., et al., *Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41702-8.
75. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
76. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 702-7.
77. Benko, S., D.J. Philpott, and S.E. Girardin, *The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 368-73.
78. Sabbah, A., et al., *Activation of innate immune antiviral responses by Nod2*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1073-80.
79. da Silva Correia, J., et al., *Regulation of Nod1-mediated signaling pathways*. Cell Death Differ, 2007. **14**(4): p. 830-9.
80. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 9-20.
81. Inohara, et al., *NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 355-83.
82. Wehkamp, J., et al., *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
83. Voss, E., et al., *NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2*. J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2005-11.
84. Boughan, P.K., et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during Helicobacter pylori infection*. J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 11637-48.

85. Hamanaka, Y., et al., *Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in Helicobacter pylori induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against Helicobacter pylori*. Gut, 2001. **49**(4): p. 481-7.
86. Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin, *Autophagy in immunity and inflammation*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 323-35.
87. Deretic, V., *Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 92-104.
88. Travassos, L.H., et al., *Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 55-62.
89. Cooney, R., et al., *NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation*. Nat Med, 2010. **16**(1): p. 90-7.
90. Backhed, F., *Programming of host metabolism by the gut microbiota*. Ann Nutr Metab. **58 Suppl 2**: p. 44-52.
91. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
92. Scanlan, P.D. and J.R. Marchesi, *Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces*. ISME J, 2008. **2**(12): p. 1183-93.
93. Scupham, A.J., et al., *Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(1): p. 793-801.
94. Breitbart, M., et al., *Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces*. J Bacteriol, 2003. **185**(20): p. 6220-3.
95. Breitbart, M., et al., *Viral diversity and dynamics in an infant gut*. Res Microbiol, 2008. **159**(5): p. 367-73.
96. Zhang, T., et al., *RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses*. PLoS Biol, 2006. **4**(1): p. e3.
97. Willner, D., et al., *Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7370.
98. Horz, H.P. and G. Conrads, *The discussion goes on: What is the role of Euryarchaeota in humans?* Archaea, 2010. **2010**: p. 967271.
99. Dridi, B., D. Raoult, and M. Drancourt, *Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes*. Anaerobe, 2011. **17**(2): p. 56-63.
100. Dridi, B., *Laboratory tools for detection of archaea in humans*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(9): p. 825-33.
101. Berg, R.D., *The indigenous gastrointestinal microflora*. Trends Microbiol, 1996. **4**(11): p. 430-5.
102. Hooper, L.V. and J.I. Gordon, *Commensal host-bacterial relationships in the gut*. Science, 2001. **292**(5519): p. 1115-8.
103. Wang, M., et al., *Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes*. FEMS Microbiol Ecol, 2005. **54**(2): p. 219-31.
104. Turnbaugh, P.J., et al., *The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice*. Sci Transl Med, 2009. **1**(6): p. 6ra14.
105. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 688-93.

106. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
107. Tiihonen, K., A.C. Ouwehand, and N. Rautonen, *Human intestinal microbiota and healthy ageing*. Ageing Res Rev, 2010. **9**(2): p. 107-16.
108. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
109. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
110. Turnbaugh, P.J., et al., *The human microbiome project*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 804-10.
111. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
112. Hooper, L.V., *Do symbiotic bacteria subvert host immunity?* Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 367-74.
113. Conly, J.M., et al., *The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K*. Am J Gastroenterol, 1994. **89**(6): p. 915-23.
114. Guarner, F. and J.R. Malagelada, *Gut flora in health and disease*. Lancet, 2003. **361**(9356): p. 512-9.
115. Vanhoutvin, S.A., et al., *Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6759.
116. Hosseini, E., et al., *Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut*. Nutr Rev, 2011. **69**(5): p. 245-58.
117. Schaubert, J., et al., *Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways*. Gut, 2003. **52**(5): p. 735-41.
118. Reid, G., J. Howard, and B.S. Gan, *Can bacterial interference prevent infection?* Trends Microbiol, 2001. **9**(9): p. 424-8.
119. Smith, K., K.D. McCoy, and A.J. Macpherson, *Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota*. Semin Immunol, 2007. **19**(2): p. 59-69.
120. Kuss, S.K., et al., *Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis*. Science, 2011. **334**(6053): p. 249-52.
121. Que, J.U. and D.J. Hentges, *Effect of streptomycin administration on colonization resistance to Salmonella typhimurium in mice*. Infect Immun, 1985. **48**(1): p. 169-74.
122. Barthel, M., et al., *Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host*. Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2839-58.
123. Riley, M.A., *Molecular mechanisms of bacteriocin evolution*. Annu Rev Genet, 1998. **32**: p. 255-78.
124. Makras, L., et al., *Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds*. Res Microbiol, 2006. **157**(3): p. 241-7.
125. Servin, A.L., *Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens*. FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(4): p. 405-40.
126. Lievin-Le Moal, V. and A.L. Servin, *The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(2): p. 315-37.

127. Zyrek, A.A., et al., *Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherichia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair*. Cell Microbiol, 2007. **9**(3): p. 804-16.
128. Karczewski, J., et al., *Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(6): p. G851-9.
129. Mennigen, R., et al., *Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(5): p. G1140-9.
130. Stappenbeck, T.S., L.V. Hooper, and J.I. Gordon, *Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15451-5.
131. Hamer, H.M., et al., *Review article: the role of butyrate on colonic function*. Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(2): p. 104-19.
132. Daly, K. and S.P. Shirazi-Beechey, *Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells*. DNA Cell Biol, 2006. **25**(1): p. 49-62.
133. Hague, A., et al., *Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer*. Int J Cancer, 1993. **55**(3): p. 498-505.
134. Falk, P.G., et al., *Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1157-70.
135. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 478-85.
136. Pollard, M. and N. Sharon, *Responses of the Peyer's Patches in Germ-Free Mice to Antigenic Stimulation*. Infect Immun, 1970. **2**(1): p. 96-100.
137. Lundin, A., et al., *Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine*. Cell Microbiol, 2008. **10**(5): p. 1093-103.
138. Matsumoto, S., H. Setoyama, and Y. Umesaki, *Differential induction of major histocompatibility complex molecules on mouse intestine by bacterial colonization*. Gastroenterology, 1992. **103**(6): p. 1777-82.
139. Imaoka, A., et al., *Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice*. Eur J Immunol, 1996. **26**(4): p. 945-8.
140. Niess, J.H., et al., *Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 559-68.
141. Bouskra, D., et al., *Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 507-10.
142. Ivanov, I.I., et al., *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. Cell, 2009. **139**(3): p. 485-98.
143. Gaboriau-Routhiau, V., et al., *The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses*. Immunity, 2009. **31**(4): p. 677-89.

144. Talham, G.L., et al., *Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system*. Infect Immun, 1999. **67**(4): p. 1992-2000.
145. Umesaki, Y., et al., *Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system*. Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3504-11.
146. Clarke, T.B., et al., *Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity*. Nat Med, 2010. **16**(2): p. 228-31.
147. Noverr, M.C. and G.B. Huffnagle, *Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?* Trends Microbiol, 2004. **12**(12): p. 562-8.
148. Mazmanian, S.K., et al., *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system*. Cell, 2005. **122**(1): p. 107-18.
149. Bauer, H., et al., *The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice*. Am J Pathol, 1963. **42**: p. 471-83.
150. Penders, J., et al., *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy*. Pediatrics, 2006. **118**(2): p. 511-21.
151. Perez, P.F., et al., *Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells?* Pediatrics, 2007. **119**(3): p. e724-32.
152. Maukonen, J., et al., *Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 5): p. 625-33.
153. Mariat, D., et al., *The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 123.
154. Hopkins, M.J., R. Sharp, and G.T. Macfarlane, *Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles*. Gut, 2001. **48**(2): p. 198-205.
155. Dethlefsen, L., et al., *Assembly of the human intestinal microbiota*. Trends Ecol Evol, 2006. **21**(9): p. 517-23.
156. Bezirtzoglou, E., *The intestinal microflora during the first weeks of life*. Anaerobe, 1997. **3**(2-3): p. 173-7.
157. Harmsen, H.J., et al., *Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **30**(1): p. 61-7.
158. De Filippo, C., et al., *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14691-6.
159. Lupton, J.R., *Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy*. J Nutr, 2004. **134**(2): p. 479-82.
160. Bouhnik, Y., et al., *Lactulose ingestion increases faecal bifidobacterial counts: a randomised double-blind study in healthy humans*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(3): p. 462-6.
161. Bouhnik, Y., et al., *The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6): p. 1658-64.
162. Ramirez-Farias, C., et al., *Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii*. Br J Nutr, 2009. **101**(4): p. 541-50.

163. Zoetendal, E.G., et al., *The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract*. Microbial Ecology in Health and Disease, 2001. **13**: p. 129-134.
164. Khachatryan, Z.A., et al., *Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e3064.
165. Benson, A.K., et al., *Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(44): p. 18933-8.
166. Vijay-Kumar, M., et al., *Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5*. Science, 2010. **328**(5975): p. 228-31.
167. Albert, E.J., et al., *The gut microbiota of toll-like receptor 2-deficient mice exhibits lineage-specific modifications*. Environmental Microbiology Reports, 2009. **1**(1): p. 65-70.
168. Thompson, C.L., et al., *Community dynamics in the mouse gut microbiota: a possible role for IRF9-regulated genes in community homeostasis*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10335.
169. Sullivan, A., C. Edlund, and C.E. Nord, *Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(2): p. 101-14.
170. Bartosch, S., et al., *Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(6): p. 3575-81.
171. Bonnemaïson, E., et al., *Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection*. Biol Neonate, 2003. **84**(4): p. 304-10.
172. Jernberg, C., et al., *Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota*. ISME J, 2007. **1**(1): p. 56-66.
173. Lofmark, S., et al., *Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant Bacteroides spp. and resistance genes*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(6): p. 1160-7.
174. Antonopoulos, D.A., et al., *Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation*. Infect Immun, 2009. **77**(6): p. 2367-75.
175. Schmidt, B., et al., *Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28284.
176. Deplancke, B. and H.R. Gaskins, *Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(6): p. 1131S-1141S.
177. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
178. Swidsinski, A., et al., *Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(8): p. 963-70.
179. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(1): p. 27-55.
180. Mukherjee, S., S. Vaishnava, and L.V. Hooper, *Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(19): p. 3019-27.



181. Otte, J.M., K. Kiehne, and K.H. Herzig, *Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine*. J Gastroenterol, 2003. **38**(8): p. 717-26.
182. Huttner, K.M., M.E. Selsted, and A.J. Ouellette, *Structure and diversity of the murine cryptdin gene family*. Genomics, 1994. **19**(3): p. 448-53.
183. Ouellette, A.J., et al., *Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms*. Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 5040-7.
184. Ouellette, A.J. and J.C. Lualdi, *A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides. Regulation in small intestine and cells of myeloid origin*. J Biol Chem, 1990. **265**(17): p. 9831-7.
185. Huttner, K.M. and A.J. Ouellette, *A family of defensin-like genes codes for diverse cysteine-rich peptides in mouse Paneth cells*. Genomics, 1994. **24**(1): p. 99-109.
186. Yang, D., et al., *Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 181-215.
187. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. Science, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
188. Ayabe, T., et al., *Activation of Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5219-28.
189. Cunliffe, R.N. and Y.R. Mahida, *Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(1): p. 49-58.
190. Sorensen, O.E., et al., *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3951-9.
191. Lehotzky, R.E., et al., *Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(17): p. 7722-7.
192. Mukherjee, S., et al., *Regulation of C-type lectin antimicrobial activity by a flexible N-terminal prosegment*. J Biol Chem, 2009. **284**(8): p. 4881-8.
193. Cash, H.L., et al., *Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1126-30.
194. Brandl, K., et al., *Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 804-7.
195. Brandl, K., et al., *MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal Listeria monocytogenes infection*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1891-900.
196. Dessein, R., et al., *Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3 beta expression and intestinal clearance of Yersinia pseudotuberculosis*. Gut, 2009. **58**(6): p. 771-6.
197. Suzuki, K., et al., *Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1981-6.
198. Macpherson, A.J., et al., *A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria*. Science, 2000. **288**(5474): p. 2222-6.
199. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.
200. Van Limbergen, J., D.C. Wilson, and J. Satsangi, *The genetics of Crohn's disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. **10**: p. 89-116.

201. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(1): p. 46-54 e42; quiz e30.
202. Cosnes, J., et al., *Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(6): p. 1785-94.
203. Declercq, C., et al., *Mapping of inflammatory bowel disease in northern France: spatial variations and relation to affluence*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **16**(5): p. 807-12.
204. Cottone, M., et al., *Medical management of Crohn's disease*. *Expert Opin Pharmacother*, 2011. **12**(16): p. 2505-25.
205. Kaser, A., S. Zeissig, and R.S. Blumberg, *Inflammatory bowel disease*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 573-621.
206. Monsen, U., et al., *Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1991. **26**(3): p. 302-6.
207. Russel, M.G., et al., *Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1997. **223**: p. 88-91.
208. Thompson, N.P., et al., *Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study*. *BMJ*, 1996. **312**(7023): p. 95-6.
209. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. *Gut*, 1988. **29**(7): p. 990-6.
210. Orholm, M., et al., *Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study*. *Scand J Gastroenterol*, 2000. **35**(10): p. 1075-81.
211. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. *Nat Genet*, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
212. Khor, B., A. Gardet, and R.J. Xavier, *Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2011. **474**(7351): p. 307-17.
213. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
214. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
215. Pauleau, A.L. and P.J. Murray, *Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7531-9.
216. Calkins, B.M., *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease*. *Dig Dis Sci*, 1989. **34**(12): p. 1841-54.
217. Cosnes, J., et al., *Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(2): p. 424-31.
218. Cosnes, J., et al., *Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study*. *Gastroenterology*, 2001. **120**(5): p. 1093-9.
219. Garcia Rodriguez, L.A., et al., *Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. **22**(4): p. 309-15.
220. Kaplan, G.G., et al., *The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis*. *Am J Gastroenterol*, 2008. **103**(11): p. 2925-31.
221. Hou, J.K., B. Abraham, and H. El-Serag, *Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature*. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(4): p. 563-73.

222. Card, T., et al., *Antibiotic use and the development of Crohn's disease*. Gut, 2004. **53**(2): p. 246-50.
223. Hviid, A., H. Svanstrom, and M. Frisch, *Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood*. Gut, 2011. **60**(1): p. 49-54.
224. Hildebrand, H., et al., *Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(8): p. 961-6.
225. Godet, P.G., G.R. May, and L.R. Sutherland, *Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease*. Gut, 1995. **37**(5): p. 668-73.
226. Nerich, V., et al., *Low exposure to sunlight is a risk factor for Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2011. **33**(8): p. 940-5.
227. Abraham, C. and J.H. Cho, *Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(7): p. 641-50.
228. Strober, W. and T. Watanabe, *NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(5): p. 484-95.
229. Watanabe, T., et al., *NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(8): p. 800-8.
230. Yang, Z., et al., *NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction*. Gastroenterology, 2007. **133**(5): p. 1510-21.
231. Barreau, F., et al., *Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches*. Gut, 2010. **59**(2): p. 207-17.
232. Amano, A., I. Nakagawa, and T. Yoshimori, *Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria*. J Biochem, 2006. **140**(2): p. 161-6.
233. Collazo, C.M., et al., *Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 181-8.
234. Kuballa, P., et al., *Autophagy and the immune system*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 611-46.
235. Khan, K.J., et al., *Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 661-73.
236. Malchow, H.A., *Crohn's disease and Escherichia coli. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?* J Clin Gastroenterol, 1997. **25**(4): p. 653-8.
237. Guslandi, M., et al., *Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 2000. **45**(7): p. 1462-4.
238. Sellon, R.K., et al., *Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5224-31.
239. Kim, S.C., et al., *Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria*. Gastroenterology, 2005. **128**(4): p. 891-906.
240. Kim, S.C., et al., *Dual-association of gnotobiotic IL-10-/- mice with 2 nonpathogenic commensal bacteria induces aggressive pancolitis*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(12): p. 1457-66.

241. Marteau, P., *Bacterial flora in inflammatory bowel disease*. Dig Dis, 2009. **27 Suppl 1**: p. 99-103.
242. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
243. Sokol, H., et al., *Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(8): p. 1183-9.
244. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
245. Rehman, A., et al., *Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities*. Gut, 2011. **60**(10): p. 1354-62.
246. Spor, A., O. Koren, and R. Ley, *Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 279-90.
247. Garrett, W.S., et al., *Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system*. Cell, 2007. **131**(1): p. 33-45.
248. Garrett, W.S., et al., *Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(3): p. 292-300.
249. Gassler, N., et al., *Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(1): p. G216-28.
250. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. Gut, 2007. **56**(1): p. 61-72.
251. Pullan, R.D., et al., *Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis*. Gut, 1994. **35**(3): p. 353-9.
252. McCormick, D.A., L.W. Horton, and A.S. Mee, *Mucin depletion in inflammatory bowel disease*. J Clin Pathol, 1990. **43**(2): p. 143-6.
253. Gersemann, M., et al., *Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis*. Differentiation, 2009. **77**(1): p. 84-94.
254. Schultsz, C., et al., *The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls*. Gastroenterology, 1999. **117**(5): p. 1089-97.
255. Png, C.W., et al., *Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(11): p. 2420-8.
256. Gersemann, M., J. Wehkamp, and E.F. Stange, *Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease*. J Intern Med, 2012.
257. Jager, S., E.F. Stange, and J. Wehkamp, *Antimicrobial peptides in gastrointestinal inflammation*. Int J Inflam, 2010. **2010**: p. 910283.
258. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(19): p. 8772-7.
259. Vaishnava, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20858-63.

260. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
261. Klaasen, H.L., et al., *Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice*. Infect Immun, 1993. **61**(1): p. 303-6.
262. Brandtzaeg, P., *Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(6): p. 554-63.
263. Giaffer, M.H., A. Clark, and C.D. Holdsworth, *Antibodies to Saccharomyces cerevisiae in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance*. Gut, 1992. **33**(8): p. 1071-5.
264. Laukoetter, M.G., et al., *Intestinal cancer risk in Crohn's disease: a meta-analysis*. J Gastrointest Surg, 2011. **15**(4): p. 576-83.
265. Tian, Y., et al., *Differential effects of NOD2 polymorphisms on colorectal cancer risk: a meta-analysis*. Int J Colorectal Dis, 2010. **25**(2): p. 161-8.
266. Karin, M. and F.R. Greten, *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 749-59.
267. Hussain, S.P., L.J. Hofseth, and C.C. Harris, *Radical causes of cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 276-85.
268. Greten, F.R., et al., *IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer*. Cell, 2004. **118**(3): p. 285-96.
269. O'Connor, P.M., et al., *Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(8): p. 1411-20.
270. Sheehan, K.M., et al., *The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer*. JAMA, 1999. **282**(13): p. 1254-7.
271. Gueimonde, M., et al., *Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(29): p. 3985-9.
272. Uronis, J.M., et al., *Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6026.
273. Wu, S., et al., *A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1016-22.
274. Chichlowski, M., et al., *Helicobacter typhlonius and Helicobacter rodentium differentially affect the severity of colon inflammation and inflammation-associated neoplasia in IL10-deficient mice*. Comp Med, 2008. **58**(6): p. 534-41.
275. Huycke, M.M., V. Abrams, and D.R. Moore, *Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA*. Carcinogenesis, 2002. **23**(3): p. 529-36.
276. Neufert, C., C. Becker, and M.F. Neurath, *An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression*. Nat Protoc, 2007. **2**(8): p. 1998-2004.
277. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.

278. Darfeuille-Michaud, A., et al., *High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease*. Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 412-21.
279. Sobhani, I., et al., *Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16393.
280. Ayabe, T., et al., *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 113-8.
281. Ogawa, H., et al., *Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model*. Inflamm Bowel Dis, 2003. **9**(3): p. 162-70.
282. Kim, Y.G., et al., *Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections*. Cell Host Microbe, 2011. **9**(6): p. 496-507.
283. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
284. Yan, Y., et al., *Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6073.
285. Smith, P., et al., *Host genetics and environmental factors regulate ecological succession of the mouse colon tissue-associated microbiota*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30273.
286. Meira, L.B., et al., *DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2516-25.
287. Kurzawski, G., et al., *The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(5): p. 1604-6.
288. Papaconstantinou, I., et al., *Association between mutations in the CARD15/NOD2 gene and colorectal cancer in a Greek population*. Int J Cancer, 2005. **114**(3): p. 433-5.
289. Roberts, R.L., et al., *Caspase recruitment domain-containing protein 15 mutations in patients with colorectal cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2532-5.
290. Freire, P., et al., *CARD15 mutations and colorectal cancer in a South European country*. Int J Colorectal Dis. **25**(10): p. 1211-9.
291. Alhopuro, P., et al., *NOD2 3020insC alone is not sufficient for colorectal cancer predisposition*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7245-7.
292. Tuupanen, S., et al., *No evidence for association of NOD2 R702W and G908R with colorectal cancer*. Int J Cancer, 2007. **121**(1): p. 76-9.
293. Lakatos, P.L., et al., *Common NOD2/CARD15 variants are not associated with susceptibility or the clinicopathologic characteristics of sporadic colorectal cancer in Hungarian patients*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 54.
294. Chen, G.Y., et al., *The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10060-7.
295. Rehman, A., et al., *Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities*. Gut. **60**(10): p. 1354-62.
296. Garrett, W.S., J.I. Gordon, and L.H. Glimcher, *Homeostasis and inflammation in the intestine*. Cell. **140**(6): p. 859-70.
297. Soini, Y., *Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours*. Histopathology, 2005. **46**(5): p. 551-60.

298. Wehkamp, J., et al., *Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease*. *Mucosal Immunol*, 2008. **1 Suppl 1**: p. S67-74.
299. Lowe, E.L., et al., *Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer*. *PLoS One*, 2010. **5(9)**: p. e13027.
300. Salcedo, R., et al., *MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18*. *J Exp Med*, 2010. **207(8)**: p. 1625-36.
301. Normand, S., et al., *Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108(23)**: p. 9601-6.
302. Chen, G.Y., et al., *A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis*. *J Immunol*, 2011. **186(12)**: p. 7187-94.
303. Allen, I.C., et al., *The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer*. *J Exp Med*, 2010. **207(5)**: p. 1045-56.
304. Dupaul-Chicoine, J., et al., *Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases*. *Immunity*, 2010. **32(3)**: p. 367-78.
305. Fukata, M., et al., *Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors*. *Gastroenterology*, 2007. **133(6)**: p. 1869-81.
306. Kullberg, B.J., et al., *Crohn's disease patients homozygous for the 3020insC NOD2 mutation have a defective NOD2/TLR4 cross-tolerance to intestinal stimuli*. *Immunology*, 2008. **123(4)**: p. 600-5.
307. Hedl, M., et al., *Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104(49)**: p. 19440-5.
308. Stuhlmuller, B., et al., *Detection of oncofetal h19 RNA in rheumatoid arthritis synovial tissue*. *Am J Pathol*, 2003. **163(3)**: p. 901-11.
309. Petnicki-Ocwieja, T., et al., *Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106(37)**: p. 15813-8.
310. Becker, C., et al., *TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling*. *Immunity*, 2004. **21(4)**: p. 491-501.
311. Maloy, K.J., et al., *Cure of innate intestinal immune pathology by CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Immunol Lett*, 2005. **97(2)**: p. 189-92.
312. Kobayashi, M., et al., *Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes*. *Br J Dermatol*, 2009. **160(2)**: p. 297-304.
313. Yun, U.J., et al., *DNA damage induces the IL-6/STAT3 signaling pathway, which has anti-senescence and growth-promoting functions in human tumors*. *Cancer Lett*, 2012.
314. Erdman, S.E., et al., *CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice*. *Am J Pathol*, 2003. **162(2)**: p. 691-702.
315. Biswas, A., et al., *Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107(33)**: p. 14739-44.
316. Pan, Q., et al., *MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3*. *J Leukoc Biol*, 2007. **82(1)**: p. 177-83.

317. Lebeis, S.L., et al., *Interleukin-1 receptor signaling protects mice from lethal intestinal damage caused by the attaching and effacing pathogen Citrobacter rodentium*. Infect Immun, 2009. **77**(2): p. 604-14.
318. Hedl, M. and C. Abraham, *Distinct roles for Nod2 protein and autocrine interleukin-1beta in muramyl dipeptide-induced mitogen-activated protein kinase activation and cytokine secretion in human macrophages*. J Biol Chem, 2011. **286**(30): p. 26440-9.