



HAL
open science

Caractérisation du mycobiome intestinal et fécal chez les patients atteints de maladie de Crohn, et leurs parents sains du premier degré

Gautier Hoarau

► To cite this version:

Gautier Hoarau. Caractérisation du mycobiome intestinal et fécal chez les patients atteints de maladie de Crohn, et leurs parents sains du premier degré. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S033 . tel-01534878

HAL Id: tel-01534878

<https://theses.hal.science/tel-01534878>

Submitted on 8 Jun 2017

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 DROIT ET SANTE DE LILLE II

École Doctorale Biologie – Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Spécialité : Parasitologie-Mycologie

Soutenue le 30 novembre 2016 par :

HOARAU Gautier

Caractérisation du mycobiome intestinal et fécal chez les patients atteints de maladie de Crohn, et leurs parents sains du premier degré.

Composition du jury

| | |
|------------------------------|---|
| Rapporteurs : | Dr Thierry Roger |
| | Pr Guillaume Bouguen |
| Examineurs : | Pr Daniel Poulain |
| | Dr Genevieve Hery-Arnaud |
| | Dr Marie-Elisabeth Bougnoux |
| | Pr Saad Nseir |
| Directeurs de thèse : | Pr Boualem Sendid- Dr Laurent Beghin |

***Point n'est besoin d'espérer pour entreprendre,
ni de réussir pour persévérer.***

Guillaume 1er d'Orange -Nassau, dit le Taciturne

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Introduction..... | 16 |
| Chapitre 1 : Aspects cliniques, épidémiologiques et physiopathologiques de la maladie de Crohn..... | 19 |
| Clinique..... | 19 |
| <i>Sémiologie digestive</i> | <i>19</i> |
| <i>Sémiologie extra-digestive</i> | <i>19</i> |
| <i>Scores cliniques et classifications</i> | <i>20</i> |
| Diagnostic | 21 |
| Iléo-coloscopie | 21 |
| Anatomopathologie | 22 |
| Marqueurs biologiques | 22 |
| Les anticorps anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) | 22 |
| pANCA | 24 |
| Anticorps dirigés contre des épitopes bactériens | 24 |
| Combinaison de marqueurs sérologiques | 24 |
| Le diagnostic différentiel entre les colites d'origine infectieuse et la MC..... | 25 |
| Marqueurs pronostiques..... | 25 |
| Epidémiologie | 26 |
| Principes de traitement | 26 |
| Poussées | 27 |
| Traitement préventif des rechutes | 27 |
| Complications..... | 27 |
| Prévention | 27 |
| Hypothèses étiopathogéniques | 28 |
| Rôle de l'environnement | 28 |
| Rôle de la génétique | 29 |
| Flore microbienne et rupture de la barrière..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| Chapitre 2 : Implication du microbiote intestinal dans la maladie de Crohn..... | 32 |
| Développement du microbiote intestinal..... | 32 |
| Composition du microbiote intestinal du sujet sain | 33 |
| Procaryote | 33 |
| Bactéries..... | 33 |
| Archéobactéries | 34 |
| Eucaryote | 34 |
| Protozoaire et helminthes..... | 34 |
| Fongique..... | 34 |
| Viral | 36 |
| Bactériophages | 36 |
| Virus..... | 36 |
| Interactions entre les différents membres du microbiome | 36 |
| Composition et implication du microbiote bactérien au cours de la maladie de Crohn.37 | |
| Phylum des Firmicutes..... | 38 |
| Phylum des Bacteroidetes | 39 |
| Phylum des Proteobacteria | 39 |
| Autres pistes | 40 |
| Composition et implication du microbiote fongique au cours de la maladie de Crohn ..40 | |
| Preuves cliniques..... | 40 |
| Preuves expérimentales | 42 |
| Composition du mycobiote intestinal dans la maladie de Crohn | 42 |
| Première étude : Ott..... | 42 |
| Deuxième étude : Li | 43 |
| Troisième étude : Mukhopadhy..... | 43 |
| Quatrième étude : Lewis..... | 44 |
| Cinquième étude : Sokol | 44 |
| Sixième étude : Iliev | 45 |
| Composition et implication du microbiote viral au cours de la maladie de Crohn | 46 |
| Mécanisme immunopathogénétique de la maladie de Crohn..... | 46 |

| | |
|--|-----------|
| Immunité innée | 47 |
| Reconnaissance des motifs bactériens..... | 47 |
| Reconnaissance des motifs fongiques | 48 |
| Immunité adaptative..... | 53 |
| Lymphocytes Th1 | 54 |
| Lymphocytes Th17 | 55 |
| Lymphocytes T-reg..... | 55 |
| Lymphocytes Th2 | 56 |
| Chapitre 3 : Utilisation des outils métagénomiques pour caractériser le microbiote digestif.... | 58 |
| Principe | 58 |
| Extraction de l'ADN fécal | 60 |
| Technologies de séquençage..... | 60 |
| Technologie de Sanger | 60 |
| Technologies de haut débit | 61 |
| 454/Système Roche | 62 |
| Illumina/Solexa..... | 62 |
| Ion torrent/Life Technologies | 63 |
| Comparaison des différentes technologies de séquençage..... | 63 |
| Outils bioinformatiques..... | 64 |
| Analyse phylogénétique..... | 64 |
| α -diversité | 65 |
| Abondance..... | 65 |
| Courbe de raréfaction..... | 65 |
| Indices de diversité..... | 65 |
| β -diversité..... | 66 |
| Chapitre 4 : Matériels et méthodes | 67 |
| Patients..... | 67 |
| Recrutement: | 67 |
| Description des variables cliniques : | 68 |
| Tests biologiques | 69 |

| | |
|--|-----------|
| Détection des anticorps anti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ASCA) dans le sérum des patients | 69 |
| Culture fongique des selles..... | 69 |
| Analyse métagénomique moléculaire des selles des patients..... | 69 |
| Extraction de l'ADN fongique et bactérien..... | 70 |
| Préparation de la bibliothèque d'amplicons fongiques..... | 72 |
| Préparation de la bibliothèque d'amplicons bactériens..... | 73 |
| Séquençage ITS, classification et analyse..... | 75 |
| Séquençage..... | 75 |
| Classification..... | 75 |
| Analyse..... | 76 |
| Modèle de Biofilm..... | 76 |
| Souches utilisées..... | 76 |
| Formation du biofilm..... | 76 |
| Microscopie confocale..... | 77 |
| Microscopie électronique..... | 77 |
| Chapitre 5 : Résultats..... | 78 |
| Données clinico-épidémiologiques..... | 78 |
| Culture mycologique..... | 79 |
| Corrélation ASCA et statut clinique..... | 79 |
| Analyses de diversité..... | 80 |
| Analyse d'abondance..... | 81 |
| Analyses de corrélation..... | 84 |
| Interaction mycète-mycète..... | 85 |
| Interaction mycète-bactérie..... | 86 |
| Analyse du biofilm..... | 87 |
| Chapitre 6 : Discussion et perspectives..... | 90 |
| Synthèse..... | 90 |
| Implication de <i>Candida tropicalis</i>..... | 90 |
| La biologie de <i>C. tropicalis</i> et ses facteurs de virulence :..... | 90 |
| Réponse immunitaire et <i>C. tropicalis</i> :..... | 92 |

| | |
|---|------------|
| Equilibre entre symbiotes et pathobiontes | 92 |
| La dysbiose : | 92 |
| Les interactions microbiennes synergiques : | 93 |
| Le rôle des bactéries du genre <i>Bacteroides</i> | 93 |
| Modèle murin de dysbiose : | 94 |
| Modèle physiopathologique de la maladie de Crohn | 95 |
| Controverse..... | 96 |
| Etudes antérieures sur le mycobiome : | 96 |
| Stabilité temporo-spatiale du mycobiome ? | 97 |
| Perspectives | 98 |
| Discordance entre la culture et la métagénomique : | 99 |
| Etude de la flore muqueuse : intérêt des biopsies intestinales | 100 |
| Conclusion | 101 |
| Annexes: Articles publiés..... | 102 |
| Article 1: Implication de la flore fongique intestinale dans la maladie de Crohn (Médecine/Sciences)..... | 102 |
| Article 2 : Mycobiota in gastrointestinal diseases (Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology) | 111 |
| Article 3: Bacteriome and Mycobiome Interactions Reveal Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease (MBio) | 154 |
| Bibliographie..... | 155 |

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Phénotypes De La Maladie De Crohn (Baumgart and Sandborn 2012)..... | 20 |
| Figure 2 : Aspect endoscopique de la maladie de Crohn (Baumgart and Sandborn 2007) | 21 |
| Figure 3 : Aspect histologique de la maladie de Crohn, granulome épithélioïde et gigantocellulaire (Xavier and Podolsky 2007)..... | 22 |
| Figure 4 : Combinaison des marqueurs sérologiques (Mow et al. 2004) | 25 |
| Figure 5 : Incidence et répartition de la maladie de Crohn (Cosnes et al. 2011) | 26 |
| Figure 6 : Hypothèses étiologiques de la maladie de Crohn (Hold et al. 2014) | 28 |
| Figure 7 : Loci génétiques de susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Lees et al. 2011) | 30 |
| Figure 8 : Evolution du microbiote intestinal (Arrieta et al. 2014)..... | 33 |
| Figure 9 : Rapport microbiote fongique/microbiote total (Huffnagle and Noverr 2013) | 35 |
| Figure 10 : Comparaison de la flore bactérienne fécale sujets sains/maladie de Crohn (Manichanh et al. 2006)..... | 38 |
| Figure 11 : Structure antigénique de la paroi de <i>Candida albicans</i> (Poulain et al. 2009)..... | 41 |
| Figure 12 : Immunité innée antibactérienne (Man, Kaakoush, and Mitchell 2011) | 48 |
| Figure 13: Structure de la paroi de <i>C. albicans</i> (Gow et al. 2012)..... | 49 |
| Figure 14 : Immunité innée antifongique (Gow et al. 2012) | 53 |
| Figure 15 : Différentiation des cellules de la lignée T (Xavier and Podolsky 2007) | 54 |
| Figure 16 : Flow chart général des études métagénomiques (Morgan and Huttenhower 2012)..... | 59 |
| Figure 17 : Principe de la technique de séquençage de Sanger (Shendure and Ji 2008)..... | 61 |
| Figure 18 : Technologie 454 (Metzker 2010) | 62 |
| Figure 19 : Technologie Illumina/Solexa (Shendure and Ji 2008) | 63 |
| Figure 20 : Technologie Ion torrent (Life Technologies)..... | 63 |
| Figure 21: Analyse en composantes principales (Logiciel Partek)..... | 66 |
| Figure 22 : Procédure d'extraction de l'ADN (Qiagen) | 71 |
| Figure 23 : Régions génomiques de l'ADN fongique ribosomal (Cui, Morris, and Ghedin 2013)..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Figure 24 : Régions génomiques de l'ADN bactérien ribosomal (Ziesemer et al. 2015)..... | 73 |
| Figure 25: Gel d'électrophorèse (ITS 1) | 74 |
| Figure 26 : Etape de ligation (produits de PCR-billes magnétiques, Life technologies) | 75 |
| Figure 27:Détermination de l'épaisseur du biofilm par microscopie confocale (Chandra, Mukherjee, and Ghannoum 2008)..... | 77 |
| Figure 28 : Culture Mycologique (n= 29)..... | 79 |
| Figure 29: Valeur moyenne des ASCA et statut clinique | 80 |
| Figure 30: Analyse en composantes principales du bactériome et du mycobiome (Hoarau et al. 2016) | 80 |
| Figure 31: Analyses d' α - diversité pour le bactériome et le mycobiome (Hoarau et al. 2016) | 81 |
| Figure 32: Ecologie bactérienne au sein des familles multiplexes | 82 |
| Figure 33: Ecologie fongique au sein des familles multiplexes..... | 83 |
| Figure 34: Abondance relative des espèces bactériennes et fongiques (Hoarau et al. 2016) | 84 |
| Figure 35: Interactions au sein du bactériome (Hoarau et al. 2016) | 85 |
| Figure 36: Interactions au sein du mycobiome (Hoarau et al. 2016)..... | 85 |
| Figure 37: Epaisseur du biofilm (Hoarau et al. 2016)..... | 87 |
| Figure 38: Microscopie électronique à balayage du biofilm (Hoarau et al. 2016)..... | 88 |
| Figure 39: Microscopie électronique à transmission du biofilm (Hoarau et al. 2016)..... | 89 |
| Figure 40: Modèle physiopathologique de dysbiose au cours de la maladie de Crohn..... | 96 |
| | |
| Tableau 1 : Performances diagnostiques des ASCA (Reumaux et al. 2003) | 24 |
| Tableau 2 : Comparaison des différentes technologies de séquençage (Kuczynski et al. 2012)..... | 64 |
| Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des patients atteints de maladie de Crohn | 78 |
| Tableau 4: Principales interactions entre mycètes et bactéries intestinales..... | 86 |
| | |
| Équation 1 : Indices de Simpson et de Shannon | 65 |
| Équation 2 : Indice de Pielou..... | 66 |

Avant-Propos/Remerciements

Cher ami lecteur, tu es prêt à t'engager dans la lecture d'une histoire passionnante : le microbiote humain. Le rôle du microbiote chez l'individu sain, et son implication en pathologie humaine sont de plus en plus étudiés, grâce à l'avènement de techniques de détection de plus en plus sophistiquées. Il est vraiment exaltant de pouvoir partir à la découverte de ce nouvel organe, le microbiote, et des interactions intimes avec l'hôte.

Au Pr Daniel Poulain : vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Merci beaucoup pour cette énergie constante déployée sur la thématique des candidoses, et pour vos conseils et suggestions avisés. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Pr Boualem Sendid : merci de m'avoir accueilli dans votre service, et de m'avoir encadré tout au long de cette thèse. Merci d'avoir assuré les relations diplomatiques avec la scolarité. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Pr Guillaume Bouguen : vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, et d'apporter votre expertise clinique sur la prise en charge des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Pr Saad Nseir : merci pour votre intérêt pour l'infectiologie et la microbiologie en général. Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Dr Laurent Beghin : merci pour votre intérêt pour les maladies digestives et pour votre encadrement tout au long de cette thèse. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Dr Thierry Roger : vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance. C'est un honneur de pouvoir bénéficier de votre expertise infectiologique, et microbiologique.

Au Dr Geneviève Hery-Arnaud : merci d'avoir accepté de juger ce travail, et d'apporter votre expertise sur le microbiome. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Dr Marie-Elisabeth Bognoux : merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour la qualité de l'enseignement prodigué au cours du diplôme universitaire de mycologie médicale. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Pr Mahmoud Ghannoum et au Dr Pranab Mukherjee : merci de m'avoir accueilli dans votre prestigieuse unité à Cleveland. Cette expérience d'un mois dans l'Ohio fut une expérience très enrichissante, autant sur le plan scientifique, humain, et musical (la renommée de l'orchestre symphonique, depuis Georges Szell n'est plus à faire). Merci à Marty de m'avoir guidé dans les manip périlleuses du séquençage à haut débit.

A l'équipe du registre Epimad : Le Pr Jean-Frederic Colombel, et le Dr Corinne Gower pour avoir mis à disposition ces prélèvements précieux.

Merci à l'ensemble de l'unité Inserm U995-2, ainsi que tous les membres de l'équipe de Parasitologie-Mycologie du CHU de Lille. Un grand merci à Samir pour son aide précieuse lors de l'impression des manuscrits, et pour ses facéties. Un grand merci à Nadine François qui œuvre dans l'ombre, et qui réalise un travail extraordinaire. A Emmanuel Dutoit, pour ces discussions passionnées sur les vertus de la triple Karmeliet. Félicitations pour ton premier diagnostic de gnathostomose !

A mes parents, et une pensée pour mon grand-père Joffre.

A mes compagnons de cordée (Yvo, Juju, Elophe, Adrien, TTB, Math, Julien T, Jean-Marie, Tinmar, Olivier, Canard...) et compagnes de cordée (FF, Mathilde, Jus d'Orange, Hélène, Chouillon, Papillon...) qui m'ont accompagné aux cours de mes périples en montagne. Les plus beaux souvenirs d'une amitié partagée, notamment lors de la traversée de Belledonne, le soleil a rendez vous avec la lune au Grépon, ou bien le couloir Macho aux Bans, mais aussi après avoir dormi dans le couloir de l'aiguille du Midi, après avoir loupé la dernière benne... Sans oublier la fameuse cascade de la grande Valloire, terminé à la frontale ! Les 5.x des Alpes avec Nico M me manquent, yadugaz ! Et désolé pour les oublis ! Mais aussi à mes compagnons de bordée, qui ont essayé de m'apprendre les rudiments de la voile, et des cardinales, ceux la même qui m'ont convaincu d'amener des chaussons d'escalade au Glénant !

Abréviations

ACCA : antichitobioside carbohydrate antibodies

ADN : acide désoxyribonucléique

AIEC : adherent invasive Escherichia coli

ALCA : antilaminariboside carbohydrate antibodies

AMCA : antimannobioside carbohydrate antibodies

ANCA : anti neutrophil cytoplasmic antibodies

ASCA : anti *Saccharomyces cerevisiae* antibodies

CARD : caspase activation and recruitment domain-containing

CRP : C reactive protein

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DGGE : Denaturing gradient gel electrophoresis

DSS : Dextran sodium sulfate

ECCO : European Crohn's and colitis organisation

FDA : Food and Drug Administration

HAS : Haute autorité de Santé

IFN : Interferon

IL : Interleukine

ITS : Internal transcribed spacer

LRR : Leucine rich repeat

MBL : Mannose binding lectin

MC : Maladie de Crohn

MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MYD88 : Myeloid differentiation primary response 88

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

NFS : Numération formule sanguine

NGS : Next generation sequencing

NOD2 : Nucleotide binding oligomerization domain 2

OTU: Operational taxonomic unit

PCR : Polymerase chain reaction

PLM : Phospholipomannane

RAF : Rapidly accelerated fibrosarcoma

RCH : Rectocolite hémorragique

RIPK : Receptor interacting protein kinase

SIK : Spleen tyrosine kinase

TGF : Transforming growth factor

TLR : Toll like receptor

TNF : Tumor necrosis factor

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

VIH : Virus de l'immunodéficience acquise humaine

Résumé

Introduction : La maladie de Crohn (MC), est une maladie inflammatoire chronique intestinale d'origine multifactorielle, impliquant une dérégulation de la réaction immunitaire muqueuse vis-à-vis d'un microbiote intestinal déséquilibré sous l'influence de facteurs environnementaux et génétiques. Notre objectif était de caractériser la flore fongique, conjointement à la flore bactérienne au cours de formes familiales de MC.

Méthodes: Nous avons utilisé une plateforme de séquençage à haut débit pour caractériser le microbiote fongique et bactérien fécal, échantillonné dans 9 familles multiplexes atteints de MC (20 patients, et 28 sujets sains apparentés), et 4 familles contrôles (21 individus sains non apparentés). Une étude bioinformatique a été réalisée pour analyser l'abondance, la biodiversité, et les interactions microbiennes.

Résultats : Le microbiote fécal des membres issus des familles multiplexes était statistiquement différent de celui des membres issus des familles contrôles. L'analyse en composantes principales a montré qu'au sein des familles multiplexes, les sujets malades et sujets sains apparentés partageaient un répertoire fongique commun. Les patients MC avaient en revanche un microbiote enrichi en *Candida tropicalis*, *Escherichia coli* et en *Serratia marcescens*, et appauvri en bactéries dites bénéfiques (*Faecalibacterium prausnitzii*). De plus les taux d'ASCA (Anticorps anti- *S. cerevisiae*), marqueur sérologique de MC étaient corrélées à la présence de *C. tropicalis* ($P = .01$). Enfin nous avons mis en évidence une synergie entre *C. tropicalis*, *E. coli*, et *S. marcescens*, suggérant une interaction microbienne *in vivo* participant à l'aggravation de l'inflammation intestinale. Ces données ont été validées par la suite *in vitro* avec un modèle impliquant ces trois pathogènes, montrant un biofilm épaissi, et des interactions microbiennes synergiques.

Conclusion : Dans ces formes familiales de MC, la dysbiose et les interactions microbiennes entre bactéries et champignons pourraient contribuer à l'aggravation de la réponse inflammatoire au cours de la maladie.

Abstract

Introduction: Crohn's disease (CD) results from a complex interplay between host genetic factors and endogenous microbial communities.

Methods: In the current study, we used Ion Torrent sequencing to characterize the gut bacterial microbiota (bacteriome) and fungal community (mycobiome) in patients with CD and their non-diseased first degree relatives (NCDR) in 9 familial clusters living in Northern France/Belgium, and in healthy individuals from 4 families living in the same area (non-CD unrelated, NCDU). Principal components analysis, diversity, and abundance analyses were conducted and CD-associated inter- and intra-kingdom microbial correlations determined. Significant microbial interactions were identified and validated using single- and mixed-species biofilms.

Results: CD and NCDR groups clustered together in the mycobiome, but not in bacteriome. Microbiota of familial (CD, NCDR) samples were distinct from that of non-familial (NCDU) samples. Abundance of *Serratia marcescens* (SM), *Escherichia coli* (EC) was elevated in CD patients, while that of beneficial bacteria was decreased. Abundance of the fungus *Candida tropicalis* (CT) was significantly higher in CD compared to NCDR ($P = .003$), and positively correlated with levels of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA). Abundance of CT was positively correlated with SM and EC, suggesting these organisms interact in the gut. The mass and thickness of Triple species (CT+SM+EC) biofilm were significantly higher than single and double species biofilm. CT biofilms comprised of blastospores, while double and triple species biofilms were enriched in hyphae. SM used fimbriae to co-aggregate or attach with CT/EC, while EC closely apposed with CT.

Conclusion: Specific inter-kingdom microbial interactions may be key determinants in CD.

Introduction

La maladie de Crohn est une pathologie inflammatoire chronique de l'intestin, d'origine multifactorielle (Baumgart and Sandborn 2012). Elle serait liée à une dérégulation de la réaction immunitaire muqueuse vis-à-vis d'un microbiote intestinal déséquilibré sous l'influence de facteurs environnementaux et génétiques (Baumgart and Sandborn 2012). La dysbiose bactérienne a été largement décrite, grâce aux progrès des outils moléculaires, notamment le séquençage haut débit. De nombreuses pistes cliniques et expérimentales tendent à penser que la flore fongique commensale –beaucoup plus **négligée**– puisse influencer la sévérité de la maladie. La littérature médicale concernant le rôle de la flore fongique est relativement « pauvre » dans ce sens, comme l'atteste une recherche simple sur le moteur PubMed. Les requêtes concernant « Gut microbiota » AND « yeasts » renvoient vers 45 articles, alors que les requêtes concernant « Gut microbiota » and « bacteria » renvoient vers 4449 articles, soit un facteur 100.

Plusieurs arguments suggérant l'implication de la flore fongique dans la maladie de Crohn ont été rapportés : i) la colonisation du tube digestif par *Candida albicans*, (levure commensale du tube digestif chez l'homme) est plus fréquente et plus importante chez les patients atteints de maladie de Crohn (MC) et leur parents sains du premier degré (Standaert-Vitse et al. 2009) ; ii) la présence de nombreux anticorps antiglycanes pariétaux fongiques dans le sérum des patients MC et leur parents sains. Ces derniers sont dirigés contre des oligomannosides ayant un résidu α 1,3 terminal exprimés par le mannane de *S. cerevisiae* et celui de *C. albicans* lors de l'invasion tissulaire (Standaert 2006), ou des fragments de β 1,3 glucanes et de chitine. Ils sont dénommés respectivement ASCA (anti-*S. cerevisiae* antibodies), ALCA (anti-laminaribioside antibodies) et ACCA (anti-chitobioside antibodies). Cette réponse humorale suggère une perte de tolérance vis-à-vis du microbiote fongique (Standaert-Vitse et al. 2006). Des modèles animaux viennent renforcer cette hypothèse. Dans un modèle murin de colite chimioinduite, *C. albicans* augmenterait l'activité pro-inflammatoire intestinale (Jawhara et al. 2008). Une seconde étude récente réalisée sur un modèle murin de colite chimioinduite a montré la prédominance de levures opportunistes (*Candida*, *Trichosporon*), et la diminution des levures probiotiques « bénéfiques » (*Saccharomyces*) (Iliev et al. 2012).

Le but de cette thèse est la description par une approche métagénomique haut débit de la flore intestinale bactérienne et fongique dans les formes familiales de maladie de Crohn. En effet, la description précise du mycobiome intestinal, conjointement au microbiome bactérien permettrait de préciser le rôle de la flore fongique dans la physiopathologie de la maladie. De nombreux champignons ne sont pas « cultivables », et les techniques classiques d'isolement, plus adaptées aux espèces pathogènes et ne permettent pas de révéler la diversité des espèces fongiques, en raison de la faible représentativité du règne fongique dans le microbiome intestinal (de l'ordre de 0.1%) ou de besoins nutritionnels de certains champignons. L'approche métagénomique semble donc être l'outil de choix pour caractériser ces « microflores ». Dans un premier temps, nous allons faire une synthèse bibliographique consacrée à 3 chapitres :

- Aspects cliniques et physiopathologiques de la maladie de Crohn
- Exploration du rôle du microbiote intestinal dans la maladie de Crohn
- Aspects méthodologiques de la métagénomique appliqués à la caractérisation du microbiote intestinal

Dans un deuxième temps, nous exposerons les résultats originaux de cette thèse consacrée à la caractérisation du mycobiome fécal de cas familiaux de maladie de Crohn et de leurs parents sains du premier degré. Le premier volet de ce travail publié en 2009 a montré que les patients atteints de MC et leurs parents sains étaient fréquemment colonisés par *C. albicans*. Le second volet de cette étude concerne la caractérisation du mycobiome et du microbiome bactérien fécal au cours de la MC. Il s'agit d'un travail collaboratif entre l'Université de Lille 2 (Inserm U995 Pr B. Sendid), et l'Université de Cleveland (Case Western Reserve, Pr M. Ghannoum). Ces travaux font l'objet de plusieurs publications :

- Fungal intestinal flora in the development of Crohn's disease Hoarau G, Colombel JF, Poulain D, Sendid B Med Sci (Paris). 2013 Aug-Sep;29(8-9):691-3
- Mycobiota in gastrointestinal diseases Mukherjee PK, Sendid B, Hoarau G, Colombel JF, Poulain D, Ghannoum MA Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015 Feb; 12(2):77-87

- Bacteriome and Mycobiome Interactions Define Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease. **Hoarau G**, Mukherjee PK, Gower-Rousseau C, Clemente J, Colombel JF, Poulain D, Ghannoum MA. *Mbio* 2016 Sep 20; 7(5)

Ces travaux ont aussi fait l'objet de communications orales en congrès:

- Diminution de la diversité du microbiote fongique fécal dans les formes familiales de maladie de Crohn révélée par une approche métagénomique haut débit. **Hoarau G**, Mukherjee P, Gower-Rousseau C, Colombel JF, Poulain D, Ghannoum M, Sendid B Congrès de la société française de mycologie médicale 14-15 novembre 2014, Paris.
- Ghannoum MA et al. ISHAM 2015, Melbourne
- Characterization of the mycobiome in Crohn's disease patients and healthy relatives **Hoarau G** and al Journée André Verbert 2014, Lille
- Gut Bacteriome and Mycobiome in Crohn's disease: association between Candida tropicalis and Crohn's disease. Mukherjee P, **Hoarau G**, Gower-Rousseau C, Colombel JF, Poulain D, Sendid B, Ghannoum M. ICAAC 17-21 septembre 2015 San Diego, USA
- The fungal mycobiome and human health, Ghannoum MA, ECCMID 2016

Dans un troisième temps, nous discuterons les résultats, et dresserons des perspectives sur le rôle de la dysbiose fongique au cours de la maladie de Crohn.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Aspects cliniques, épidémiologiques et physiopathologiques de la maladie de Crohn

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique, affectant principalement le tube digestif. Elle fait partie, avec la rectocolite hémorragique, des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Contrairement à la rectocolite hémorragique qui n'affecte que le colon ou le rectum, la maladie de Crohn peut atteindre la totalité du tube digestif. La première description a été faite par Crohn (Crohn, Ginzburg, and Oppenheimer 2000) en 1932 à l'hôpital Mount Sinai (New York, Etats Unis). Bien que son étiologie demeure à ce jour inconnue, la prévalence et l'incidence de cette maladie multifactorielle sont en constante augmentation (Cosnes et al. 2011), que ce soit dans les pays industrialisés ou dans les pays émergents.

Clinique

Il s'agit d'une maladie inflammatoire chronique évoluant par phases de poussées et de rémissions (Baumgart and Sandborn 2012). Il existe classiquement une symptomatologie digestive et extra-digestive.

Sémiologie digestive

La symptomatologie digestive est au premier plan avec diarrhée, douleurs abdominales, rectorragies, manifestations anales et péri-anales (fissures, abcès, fistules). Ces lésions peuvent être associées à des signes généraux comme la fièvre, la perte de poids et l'altération de l'état général. A un stade avancé de la maladie, des complications digestives à type de sténoses, ou de fistules peuvent survenir. Il existe un risque de carcinogénèse colo-rectale accrue dans la maladie de Crohn, en raison de l'état inflammatoire chronique (Greenson 2002).

Sémiologie extra-digestive

On décrit classiquement des atteintes ostéo-articulaires (arthralgies, arthrites), cutanéomuqueuses (érythème noueux, *pyoderma gangrenosum*, ulcérations buccales) et oculaires (uvéites). Ces atteintes sont rappelées dans la Figure 1. Il existe des

manifestations auto-immunes associées (Psoriasis, thyroïdite, diabète, maladie coeliaque, sclérose en plaques...)

Scores cliniques et classifications

On utilise le plus souvent la classification de Montréal (Age, localisation des lésions digestives, comportement de la maladie) pour décrire les différents phénotypes de la maladie (Figure 1). Les différentes localisations digestives de la maladie sont iléales terminales (45%), iléo-coliques (19%), coliques (32%), et gastrointestinales (4%). Les formes inflammatoires compliquées de la maladie sont moins fréquentes : sténose (5%), fistules (14%).

Il existe par ailleurs des scores cliniques (Crohn's Disease Activity Index) pour évaluer la sévérité et l'activité de la maladie, basés sur des éléments clinico-biologiques (Lichtenstein et al. 2009).

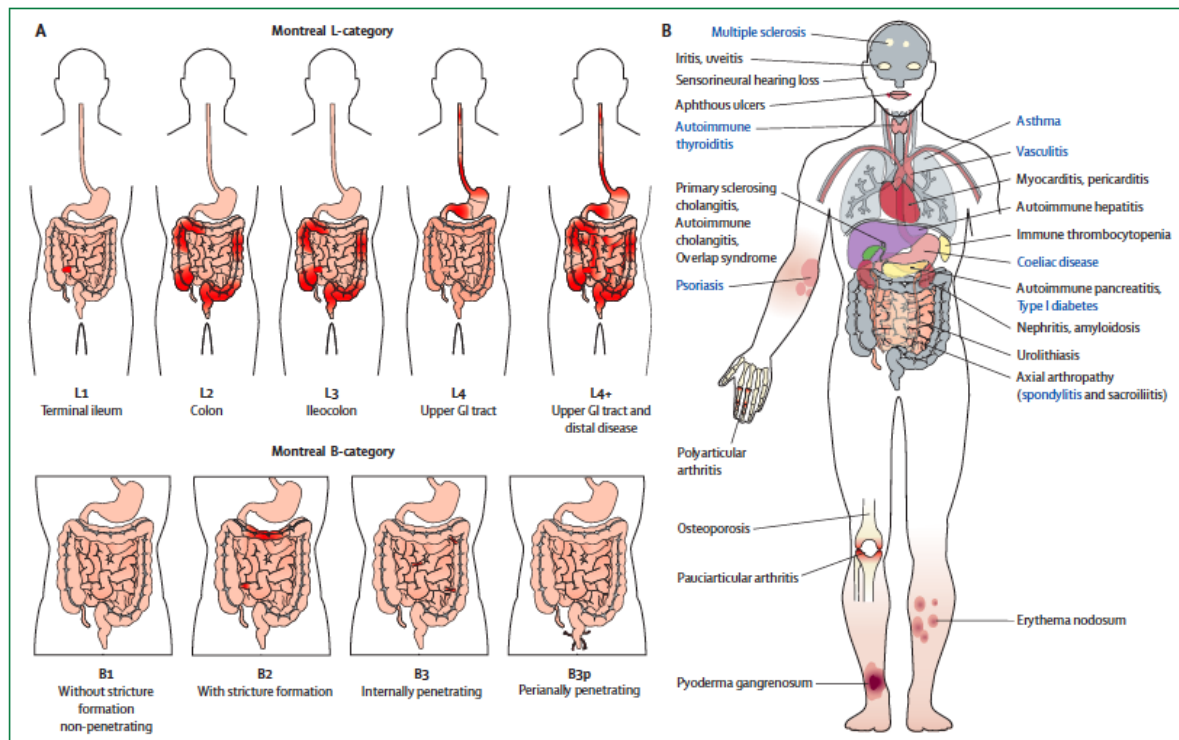


Figure 3: Phenotype of Crohn's disease

(A) Montreal classification.³⁹ Classification by age is A1 <16 years, A2 17–40 years, A3 >40 years. (B) Major extraintestinal manifestations⁴ and associated autoimmune disorders⁹ (blue). GI=gastrointestinal. p=perianal disease modifier. p is added to B1–3 when concomitant perianal disease is present.

FIGURE 1 : PHENOTYPES DE LA MALADIE DE CROHN (BAUMGART AND SANDBORN 2012)

Diagnostic

La confirmation de la maladie de Crohn repose avant tout sur l'observation de lésions macroscopiques (Coloscopie totale), et de lésions microscopiques (examen histologique des biopsies intestinales). La place des autres examens biologiques est au second plan, et permet principalement le diagnostic différentiel entre la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique.

Iléo-coloscopie

L'examen macroscopique, lors de l'endoscopie digestive, met en évidence des lésions intestinales segmentaires, alternant tissu sain et tissu lésé (Hommes and van Deventer 2004). Les lésions sont à type d'ulcération en carte de géographie (aphtoïdes ou profondes), ou de sténose. Il existe d'autres examens morphologiques non invasifs comme la vidéo-capsule ou l'entéro-IRM. La vidéocapsule consiste en l'absorption d'une capsule contenant une caméra permettant d'enregistrer en temps réel l'intégralité du tube digestif, en particulier les portions d'intestin non accessibles à l'iléo-coloscopie. Cette indication a été validée par la HAS. L'entéro-IRM permet de réaliser une cartographie de l'atteinte du grêle et de poser des arguments en faveur d'une inflammation intestinale.



FIGURE 2 : ASPECT ENDOSCOPIQUE DE LA MALADIE DE CROHN (BAUMGART AND SANDBORN 2007)

On peut voir sur la figure 2 des ulcérations, avec une alternance de tissus sains et inflammatoires.

Anatomopathologie

L'observation microscopique des lésions des biopsies étagées confirme l'alternance de tissus sains et lésés, et peut mettre en évidence un infiltrat lymphoplasmocytaire transmural et de rares granulomes épithélioïdes sans nécrose caséuse (Gramlich and Petras 2007). Ces caractéristiques histologiques sont pathognomoniques de la maladie. Les lésions sont principalement de localisation iléo-colique (50%), mais peuvent se retrouver sur l'ensemble du tube digestif, de la bouche à l'anus. La Figure 3 montre l'aspect histologique de granulomes épithélioïdes, correspondant à une agrégation de macrophages tissulaires et de cellules géantes.

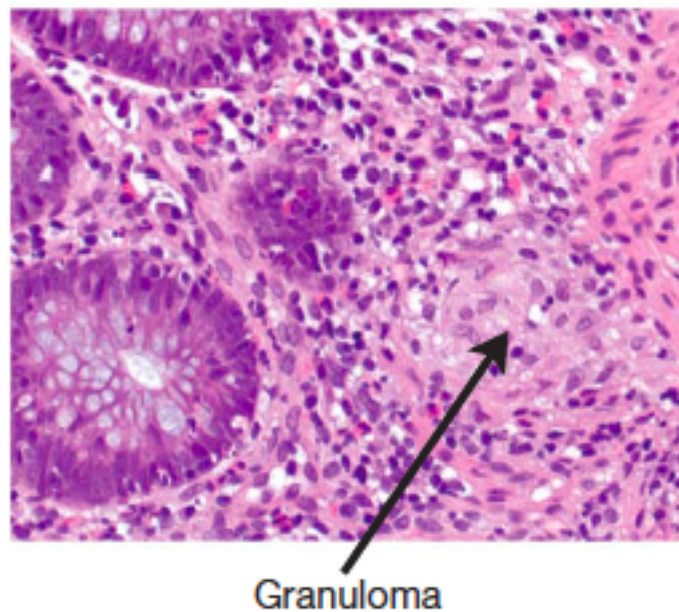


FIGURE 3 : ASPECT HISTOLOGIQUE DE LA MALADIE DE CROHN, GRANULOME EPITHELIOÏDE ET GIGANTOCELLULAIRE (XAVIER AND PODOLSKY 2007)

Marqueurs biologiques

Le diagnostic de la maladie de Crohn est principalement clinique. En effet les marqueurs biologiques manquent de sensibilité et parfois de spécificité. Ils peuvent être cependant utiles dans les formes frontières de la maladie, en cas de colite indéterminée.

Les anticorps anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA)

Les ASCA (Anti *Saccharomyces cerevisiae* antibodies) d'isotypes IgG,

et IgA sont présents chez 50-60% des patients atteints de maladie de Crohn (Reumaux et al. 2003). Les taux des ASCA sont stables au cours de la maladie, et sont plutôt associés à un âge jeune de la maladie, aux formes gastrointestinales proximales que coliques.

Lors de leur découverte, ces anticorps étaient initialement dirigés contre les résidus oligomannosidiques présents sur le mannane de la paroi de *S. cerevisiae* (Sendid et al. 1996). Cependant, il se pourrait que ces anticorps soient en fait le reflet d'une perte de tolérance vis à vis de levures endogènes opportunistes présentant les mêmes épitopes (Standaert-Vitse et al. 2006) (*C. albicans*), ou d'un microorganisme non identifié à ce jour ayant des structures glycaniques similaires (mycobactérie). En effet il semblerait exister une réactivité croisée vis à vis d'anticorps anti-mycobactériens (Müller et al. 2008).

D'autres arguments suggèrent que les ASCA sont des autoanticorps probablement dirigés contre des motifs glycaniques exprimés dans un contexte de dysrégulation immunitaire. En dépit d'une spécificité forte pour la maladie de Crohn (90%) (Quinton et al. 1998), les ASCA peuvent être également retrouvés dans la maladie coeliaque (Granito et al. 2006) et la maladie de Behcet (Fresko et al. 2005).

Par ailleurs la prévalence des ASCA serait plus importante dans les formes familiales de maladie de Crohn (Standaert-Vitse et al. 2009), de l'ordre de 70% pour les sujets malades, et de l'ordre de 20% pour les parents sains du premier degré. Ces données suggèrent que les ASCA ne sont pas exclusivement un marqueur diagnostique, mais possiblement un marqueur « infra-clinique » et prédictif d'une évolution vers une MC. En effet les ASCA pourraient prédire chez ces « parents sains » plusieurs années avant, l'apparition des symptômes cliniques de la maladie (van Schaik et al. 2013). Par ailleurs, Israeli *et al* avaient également montré que les ASCA pourraient prédire l'évolution vers une MC plusieurs années avant que son diagnostic clinique formel puisse être établi (Israeli et al. 2005).

Il existe d'autres anticorps dirigés contre des motifs glycaniques de la paroi fongique ALCA (anti-laminaribioside), ACCA (antichitobioside), AMCA (antimannobioside), anti-L (anti-laminarine) et anti-C (anti-chitine), ces molécules représentent des fragments de β 1,3-glucanes, de chitine, ou de mannane (Poulain et al. 2009). Leur sensibilité est faible (30%) (Papp et al. 2007) mais leur positivité améliore considérablement la spécificité des ASCA (Dotan et al. 2006).

pANCA

Les pANCA (Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibodies de type périnucléaire) sont retrouvés dans la rectocolite hémorragique (Reumaux et al. 2003) et permettent de faire le diagnostic différentiel avec la maladie de Crohn. L'utilisation combinée des ASCA et des pANCA permet de faire la distinction entre les deux MICI. Plus récemment, Goren et al. ont pu montrer que le profil sérologique des pochites (inflammation du réservoir après anastomose iléo anale) associées à la RCH était similaire à celui de la MC, suggérant un mécanisme physiopathologique commun à ces deux MICI (Goren et al. 2015).

| | PREMIER AUTEUR | SENSIBILITÉ (%) | SPÉCIFICITÉ (%) | VALEUR PRÉDICTIVE POSITIVE (%) |
|--|----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|
| ▶ ANCA+/ASCA- pour RCH | Quinton | 49 | 97 | 96 |
| | Peeters | 56 | 92 | 95 |
| | Koutrobakis | 30 | 97 | 77 |
| | Sandborn | 38 | 94 | 86 |
| ▶ ANCA-/ASCA+ pour maladie de Crohn | Quinton | 57 | 97 | 92,5 |
| | Peeters | 44 | 98 | 88 |
| | Koutrobakis | 58 | 88 | 93 |
| | Sandborn | 55 | 81 | 75 |

TABLEAU 1 : PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DES ASCA (REUMAUX ET AL. 2003)

Anticorps dirigés contre des épitopes bactériens

Parmi ces anticorps bactériens, les plus étudiés sont les anticorps ant-OMP-c, les anti-I2 et les anti- Flagelline. Les anti OMP-c sont dirigés contre la protéine de membrane externe d' *Escherichia coli*, et les anti-I2 sont dirigés contre *Pseudomonas fluorescens*, anti-flagelline CBir1. Il semblerait que les anti Omp-c soient associés à des complications de type perforation digestive, tandis que les anti-I2 soient associés à des complications sténosantes (Mow et al. 2004). Ces marqueurs sont intéressants, en cas de colite indéterminée, avec des ASCA négatifs. La sensibilité de ces marqueurs au cours de la MC est respectivement de 55%, 54% et 50%.

Combinaison de marqueurs sérologiques

La combinaison des marqueurs sérologiques (ASCA, anti Omp-c, anti-I2), permet d'augmenter la sensibilité de ces tests, s'ils étaient pratiqués isolément (Mow et al.

2004) (80% sensibilité, Figure 4). Le nombre de marqueurs positifs et l'amplitude des réponses sérologiques sont prédictifs d'un phénotype sévère nécessitant une intervention chirurgicale.

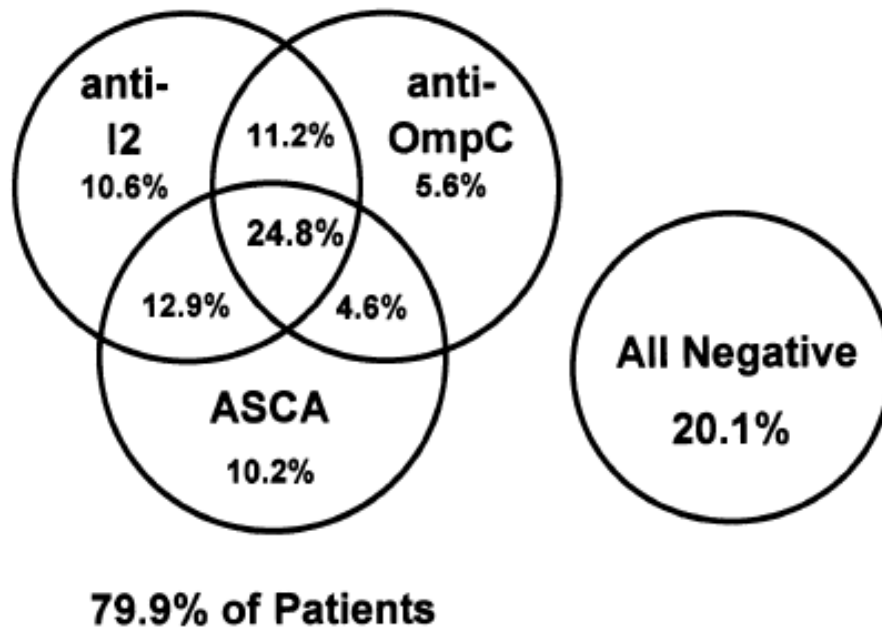


FIGURE 4 : COMBINAISON DES MARQUEURS SEROLOGIQUES (MOW ET AL. 2004)

Le diagnostic différentiel entre les colites d'origine infectieuse et la MC.

Il faut éliminer au préalable une colite infectieuse (Tuberculose intestinale, ou entéropathogène type *Yersinia*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*), ou une colite post-antibiotique (*Clostridium difficile* et sa toxine, *Klebsiella oxytoca*) sur des cultures bactériologiques de selles.

Marqueurs pronostiques

On peut mettre en évidence un syndrome inflammatoire (CRP, calprotectine fécale), une anémie (NFS), un syndrome carenciel (bilan ferrique, albumine). Ces marqueurs reflètent généralement le stade de l'inflammation intestinale.

Epidémiologie

La maladie touche préférentiellement la population caucasienne (Cosnes et al. 2011), en particulier l'adulte jeune (15-30 ans), avec un second pic vers 50 ans. Les femmes sont plus touchées que les hommes (sexe ratio homme/femme 0.8). L'incidence varie selon les pays, et est globalement plus élevée aux Etats unis et en Europe (Figure 5). Par ailleurs, son incidence est en augmentation dans les pays émergents. Le nombre de malades est estimé en Europe à 1 million (Cosnes et al. 2011) . Concernant la France, on estime que la maladie touche environ 1 personne sur 1000 avec un gradient Nord-Sud.

On distingue deux formes de la maladie : une forme sporadique, et plus rarement une forme familiale (touchant jusqu'à 3 membres du premier degré). Il semblerait que les formes familiales soient associées à un âge de survenue plus précoce, et un phénotype plus agressif (Colombel et al. 1996). Ces formes familiales sont beaucoup plus fréquentes dans le nord de la France (n=120 familles multiplex, données EPIMAD), sans facteurs environnementaux retrouvés. Dans ces familles, il existe un profil évolutif des sujets sains apparentés vers la maladie.

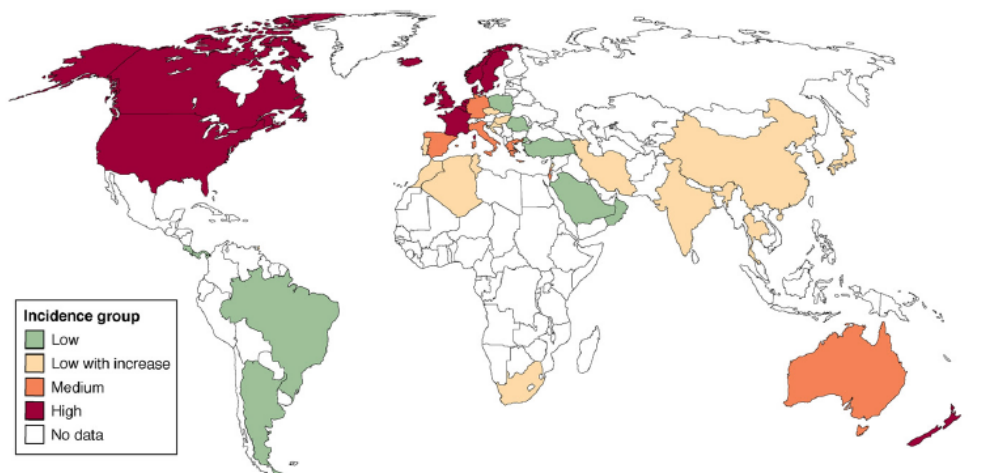


Figure 1. The global map of inflammatory bowel disease: red refers to annual incidence greater than 10/10⁵, orange to incidence of 5–10/10⁵, green to incidence less than 4/10⁵, yellow to low incidence that is continuously increasing. Absence of color indicates absence of data.

FIGURE 5 : INCIDENCE ET REPARTITION DE LA MALADIE DE CROHN (COSNES ET AL. 2011)

Principes de traitement

Il n'y a pas de traitement étiologique de la maladie de Crohn. Le traitement est avant tout symptomatique (correction des troubles hydro électrolytiques, dénutrition, carence

martiale, anti-diarrhéique, anti-infectieux), et anti-inflammatoire. L'objectif du traitement est de traiter les poussées et de favoriser une rémission clinique afin de prévenir les rechutes. Le traitement doit tenir compte de l'activité de la maladie, et du site anatomique (Dignass et al. 2010).

Poussées

On utilise en première intention les aminosalicylés (salazosulfasalazine (Salazopyrine®), olsalazine (Dipentum®) et mésalazine (Pentasa®)) et les corticostéroïdes (cure courte). En cas de corticorésistance, et dans les formes graves on peut avoir recours aux immunomodulateurs (azathioprine : Imurel®, methotrexate), et plus récemment aux biothérapies (anti TNF- α : Infliximab : Remicade®).

Traitement préventif des rechutes

En première intention, on utilise les immunomodulateurs : l'azathioprine, le methotrexate, et les biothérapies pour favoriser la rémission clinique.

Complications

La chirurgie est utilisée pour traiter les fistules, sténoses symptomatiques, et les complications carcinologiques.

Prévention

On préconise l'arrêt du tabac, qui est un facteur aggravant de la maladie. En raison du déséquilibre du microbiote au cours de la maladie de Crohn, des stratégies de modulation de la flore intestinale ont été suggérées.

L'utilisation des probiotiques (*Lactobacillus spp.*, *Saccharomyces boulardii*), est possible en prévention des rechutes de la maladie (Sokol 2014). En effet les levures probiotiques, telle que *S. boulardii*, ont des propriétés anti-inflammatoires et réduisent la prolifération bactérienne (Pothoulakis 2009). Toutefois ce traitement décevant est discuté dans la maladie de Crohn, car il n'y aucune preuve clinique de son efficacité dans des essais contrôlés (Bourreille et al. 2013). Dans cette étude de Bourreille, l'administration de probiotiques ne prévient pas les rechutes, chez les patients en rémission clinique, après un traitement par aminosalicylés et corticostéroïdes.

Les antibiotiques doivent être réservés aux formes compliquées de MC, c'est à dire les abcès intraabdominaux et périanaux et dans les colites à *Clostridium difficile*. En effet, les dernières recommandations de l'ECCO suggèrent de ne pas utiliser

d'antibiotiques dans les formes simples, car d'une part il y a peu de preuves sur l'intérêt des antibiotiques dans la rémission clinique prolongée et d'autre part les antibiotiques ne sont pas dénués d'effets indésirables (Dignass et al. 2010). La manipulation du microbiote intestinal, par l'intermédiaire des greffes fécales, semble prometteuse au regard des succès obtenus au cours des colites à *C. difficile* (Zainah et al. 2015).

Hypothèses étiopathogéniques

La maladie de Crohn est une maladie cryptogénétique, impliquant plusieurs pistes étiopathogéniques (Microbiome intestinal, facteurs environnementaux, et facteurs d'hôte).

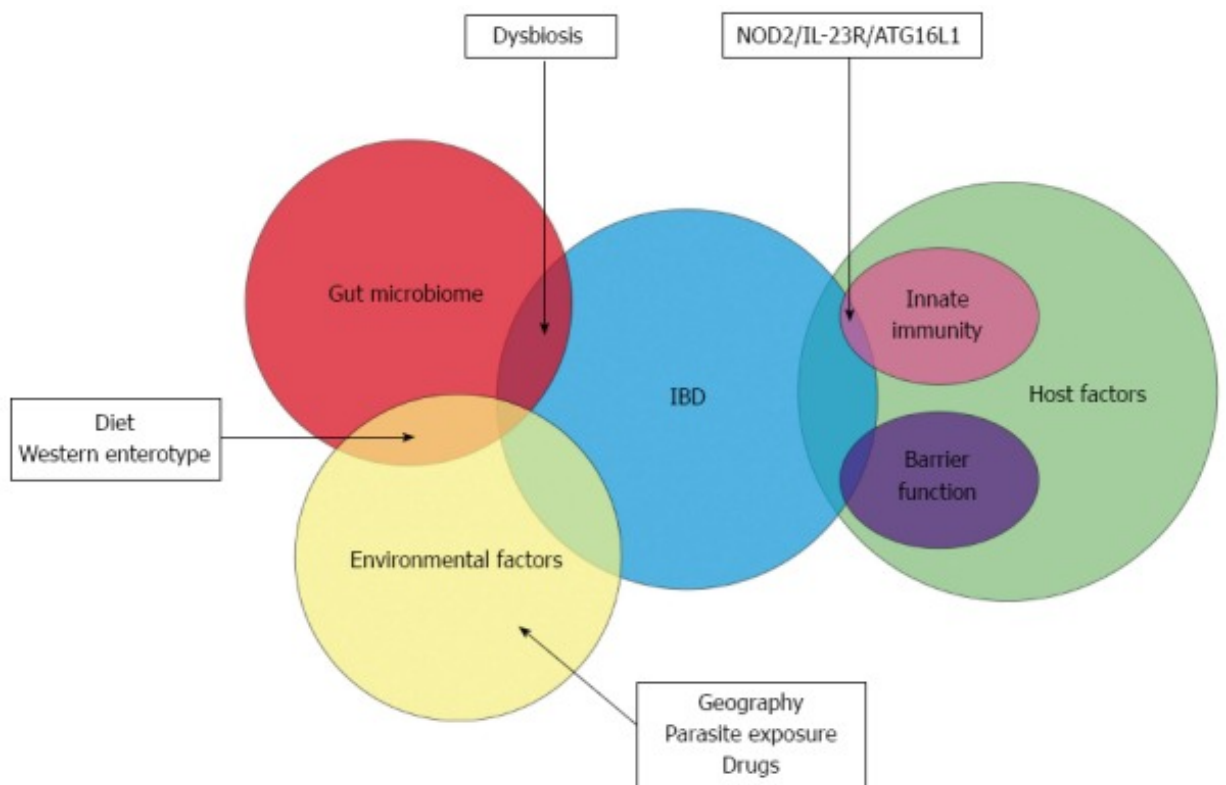


FIGURE 6 : HYPOTHESES ETIOLOGIQUES DE LA MALADIE DE CROHN (HOLD ET AL. 2014)

Rôle de l'environnement

Devant l'augmentation du nombre de cas de maladie de Crohn, il semblerait que des facteurs environnementaux puissent être incriminés dans son développement :

-Tabac (Cosnes 2004)

-Théorie hygiéniste (Gent et al. 1994), au même titre que d'autres maladies dysimmunitaires (psoriasis, asthme...). Il semblerait que l'exposition aux parasites intestinaux dans l'enfance (Kabeerdoss et al. 2011) (helminthes) soit un facteur protecteur.

-Alimentation (Hou, Abraham, and El-Serag 2011) et société industrielle: régime riche en graisses saturées type fast-food (« western diet »), saccharose, aluminium (Lerner 2007), consommation d'eau du robinet pendant l'enfance (Aamodt et al. 2008).

D'autres facteurs ont été évoqués, comme l'appendicectomie (Kaplan et al. 2008) et l'utilisation de contraceptifs oraux (Cornish et al. 2008)

Pour ainsi dire, le tabac est le seul facteur de risque majeur reconnu dans l'aggravation et le développement de la maladie. Ni la nicotine, ni le monoxyde de carbone n'ont été incriminés dans cette hypothèse physiopathologique. Le sevrage tabagique est un des piliers du traitement de la MC.

Rôle de la génétique

La MC n'est pas une maladie génétique à proprement parler, puisqu'il n'y a pas de transmission de type Mendélienne. On estime qu'il n'y a que 50% de concordance entre jumeaux monozygotes, et 10% entre jumeaux dizygotes (Halfvarson et al. 2003). L'existence de formes familiales -bien que plus rare que les formes sporadiques- suggère cependant des facteurs de susceptibilité génétique, en interaction avec les facteurs environnementaux. Les études génétiques ont mis en évidence 163 loci de susceptibilité (Van Limbergen, Radford-Smith, and Satsangi 2014). Les gènes les plus fréquents incriminés à ce jour appartiennent aux régions génomiques comprenant Nucleotide oligomerization domain 2 (*NOD2*) codant pour un récepteur intracellulaire du peptidoglycane bactérien, les gènes de l'autophagie (dont *ATG16L1*, et *IRGM*) et les gènes de la voie IL23-TH17. Ces loci codent pour des facteurs impliqués dans la réponse immunitaire innée et adaptative, vis à vis d'agents infectieux, principalement bactériens. Certains gènes sont communs avec la rectocolite hémorragique et d'autres maladies dysimmunes (psoriasis par exemple...). A ce jour, il semblerait que les loci identifiés

n'expliqueraient que 20% de l'héritabilité des MICI ce qui laisse suggérer l'existence d'autres variants non découverts à ce jour. Récemment, il a été proposé que d'autres facteurs puissent intervenir, en particulier la régulation épigénétique du gène *TNF-α* (méthylation de l'ADN).

En pratique clinique, il n'y a aucune recommandation de réaliser d'étude génétique pour la prise en charge de ces malades.

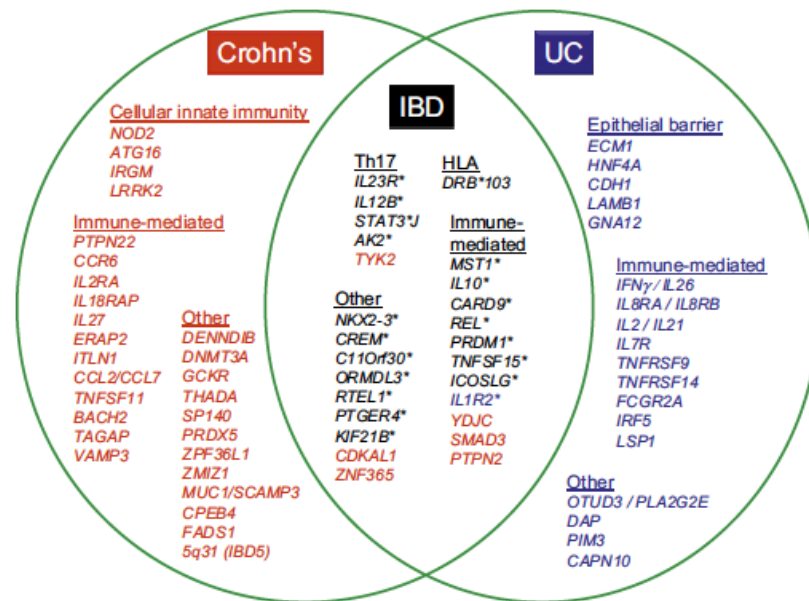


Figure 2 Inflammatory bowel disease susceptibility loci. The loci (depicted by lead gene name) attaining genome-wide significance ($P < 5 \times 10^{-8}$) are shown for Crohn's disease (red), ulcerative colitis (blue) and IBD (black where $p < 5 \times 10^{-8}$ in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC); red where $p < 5 \times 10^{-8}$ in Crohn's disease and $< 5 \times 10^{-4}$ in ulcerative colitis; blue where $p < 5 \times 10^{-8}$ in ulcerative colitis and $< 5 \times 10^{-4}$ in Crohn's disease).

FIGURE 7 : LOCI GENETIQUES DE SUSCEPTIBILITE AUX MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN (LEES ET AL. 2011)

Flore microbienne et rupture de la barrière

L'hypothèse de la perturbation du microbiote intestinal (bactérie, champignon, virus) a été évoquée dans l'initiation du processus inflammatoire (Carrière, Darfeuille-Michaud, and Nguyen 2014). Il y a une implication très forte, entre l'hôte et la flore digestive, car le microbiote est indispensable dans le processus inflammatoire de la maladie. En effet, il n'y a pas de colite chez les souris axéniques (Sellon et al. 1998). Cependant, à ce jour, il n'y a aucune association claire entre un microorganisme et le déclenchement de la maladie. Par ailleurs, on ne sait pas si cette dysbiose est une cause

ou une conséquence de la maladie. L'étude de la perturbation de la flore microbienne sera abordée en détail dans le chapitre suivant (Chapitre 2).

En marge de la perturbation de la flore microbienne, des anomalies de structure et de composition de la paroi intestinale ont été rapportées, avec une rupture de la barrière digestive. Tout d'abord il y aurait une translocation microbienne digestive beaucoup plus importante, avec une augmentation de la perméabilité intestinale, pendant les phases actives de la maladie (Benjamin et al. 2008). Chez les sujets malades, on observerait une diminution des jonctions serrées (tight junction, protéines claudines (Zeissig et al. 2007)), expliquant cette altération de la perméabilité des cellules intestinales. Par ailleurs, il y aurait une modification de composition du mucus intestinal chez les malades (Deplancke and Gaskins 2001). En particulier, la synthèse de peptides anti-microbiens (défensines, cathelicidines, C-lectines) et des mucines serait diminuée. Finalement, la clairance microbienne serait diminuée, au cours de la maladie, par une altération de « l'autophagie » intestinale (Levine, Mizushima, and Virgin 2011). L'autophagie est un mécanisme de défense contre les microorganismes, en particulier intra-cellulaires, faisant intervenir la machinerie cellulaire lysosomale. La biologie de l'autophagie a été bien étudiée, et certains variants génétiques (*ATG16L1*, *IGRM*, *ULK1*) seraient associés à la maladie de Crohn (Nguyen et al. 2013). Cette diminution de l'autophagie serait responsable d'une pullulation microbienne non contrôlée, entretenant le processus inflammatoire de la maladie.

Chapitre 2 : Implication du microbiote intestinal dans la maladie de Crohn

Le microbiote intestinal est un organe à part entier du système digestif. La flore intestinale est estimée à 10^{14} microorganismes, soit 10 fois plus que de cellules eucaryotes humaines. Celle-ci joue un rôle important dans l'homéostasie intestinale notamment grâce à leurs fonctions :

- de protection contre la colonisation par d'autres microorganismes pathogènes, et d'induction de la réponse immunitaire
- de différenciation du tissu intestinal
- d'activité métabolique notamment la production de vitamines, la dégradation des polysaccharides.

Pendant longtemps, le microbiote intestinal était associé à la flore bactérienne. Le rôle de la flore fongique dans l'homéostasie intestinale, et son implication dans de nombreux processus pathologiques sont de plus en plus décrits, comprenant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la maladie de Hirschprung, la carcinogénèse, l'obésité, ou même la réaction de greffon contre l'hôte. L'avènement des techniques de séquençage à haut débit a permis la description de plus en plus précise des flores complexes. Les études pionnières initiées par Ghannoum, ont permis au début des années 2010, la description de la flore fongique oropharyngée et de donner naissance au terme mycobiome, par analogie au microbiome (Ghannoum et al. 2010).

Développement du microbiote intestinal

L'établissement de la flore est un processus dynamique, car elle peut varier au cours du temps. A la naissance, le système digestif du nouveau-né est stérile, et se colonise initialement avec la flore maternelle (Arrieta et al. 2014). Dès les premiers jours de la vie, le tube digestif du nouveau-né est colonisé par des entérobactéries, puis remplacées par une flore strictement anaérobie dans les jours suivants. Durant le premier mois, les bifidobactéries apportées par l'alimentation lactée sont prédominantes. L'introduction d'une alimentation solide vers 6 mois s'accompagne d'une augmentation des genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, et d'une diminution des bifidobactéries. La

maturation se fait entre l'âge de 2 et 4 ans (Arrieta et al. 2014). Par contre, il y a peu de données sur l'établissement de la flore fongique. Le nouveau né se colonise principalement par la transmission verticale mère-enfant, au cours de l'accouchement. Une étude récente a mis en évidence une flore fongique fécale de faible abondance, mais diversifiée chez des nourrissons (n=11) (Heisel et al. 2015). Le genre *Candida* y était le plus représenté avec une prédominance de *C. albicans*, suggérant une colonisation fongique intestinale dans les premiers mois de vie.

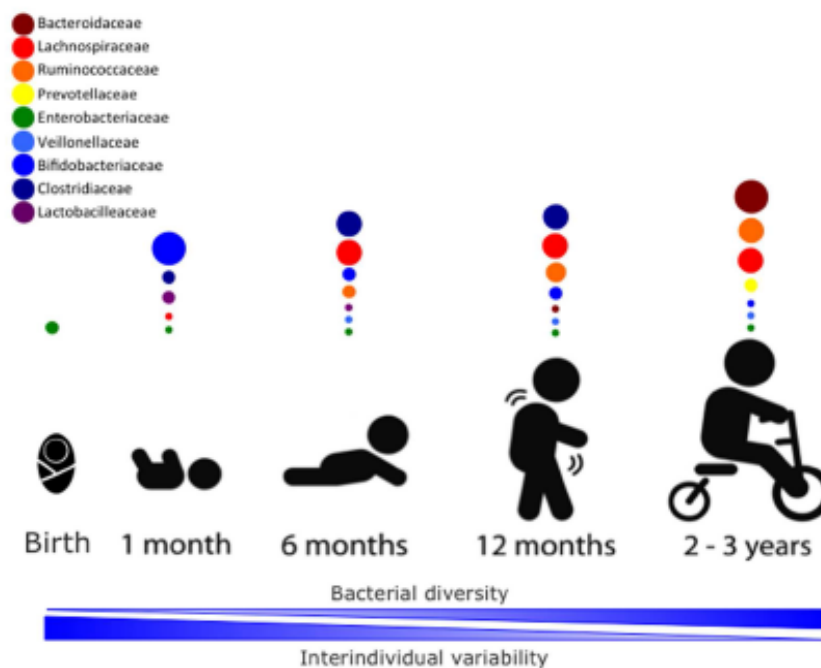


FIGURE 8 : EVOLUTION DU MICROBIOTE INTESTINAL (ARRIETA ET AL. 2014)

Composition du microbiote intestinal du sujet sain

Procaryote

Bactéries

Les bactéries représentent 99% de la flore intestinale totale. Le microbiote bactérien est composé en majorité de bactéries appartenant à 4 grands phyla : Bacteroidetes (30%), Firmicutes (60%), Actinobacteria (1-5%), Proteobacteria (<1%) - les Bacteroidetes et les Firmicutes étant les groupes majoritaires-(Lozupone et al. 2012). Cette flore est répartie le long du tube digestif, mais la diversité bactérienne est

maximale au niveau du colon, avec un nombre de plus en plus important de bactéries anaérobies. On retrouve entre 10^{11} et 10^{12} bactéries par gramme de selles. Cette diversité peut varier en fonction des individus, de l'âge, de l'alimentation, de la prise de médicaments (antibiotiques). Finalement, le microbiote, pour un individu donné, est relativement stable au cours du temps, en contrôlant ces facteurs de variations (Faith et al. 2013).

Archéobactéries

En dépit de leur faible représentation, les archéobactéries sont des composants importants du microbiote intestinal (Lozupone et al. 2012, Dridi, Raoult, and Drancourt 2011). En particulier *Methanobrevibacter smithii* est responsable de la production de méthane à partir des produits de la fermentation bactérienne. Ils joueraient un rôle important dans le métabolisme intestinal.

Eucaryote

Protozoaire et helminthes

Blastocystis, est fréquemment retrouvé dans la flore intestinale du sujet sain (Fletcher et al. 2012). Son rôle dans le microbiote intestinal reste indéterminé, mais il pourrait être associé aux colopathies fonctionnelles (Poirier et al. 2012) (syndrome de l'intestin irritable). Une étude danoise a montré que la présence de *Blastocystis* et de *Dientamoeba* étaient négativement associées avec les formes actives de RCH (Petersen et al. 2013). Par ailleurs l'exposition aux helminthes pathogènes de l'homme durant l'enfance diminuerait l'inflammation intestinale et protégerait des MICI (Kabeerdoss et al. 2011).

Fongique

La flore fongique ne représenterait que 0.1% du microbiome total (Huffnagle and Noverr 2013), probablement sous-estimée par les techniques conventionnelles de culture (Figure 9). Cette sous-représentation est à nuancer, puisqu'elle ne considère pas la flore fongique en termes de « biomasse ». En effet le poids d'une levure est cent fois plus important que celui d'une bactérie (Wlodarska, Kostic, and Xavier 2015).

Chez le sujet sain, on retrouve entre 10^1 et 10^3 cellules fongiques par gramme de selles, principalement des levures du genre *Candida* (Schulze and Sonnenborn 2009). La flore fongique est considérée comme commensale saprophyte.

Dans certains cas (immunodépression, MICI), il peut y avoir une rupture de la tolérance vis à vis de cette flore, et on peut observer une transition entre commensalisme et pathogénicité.

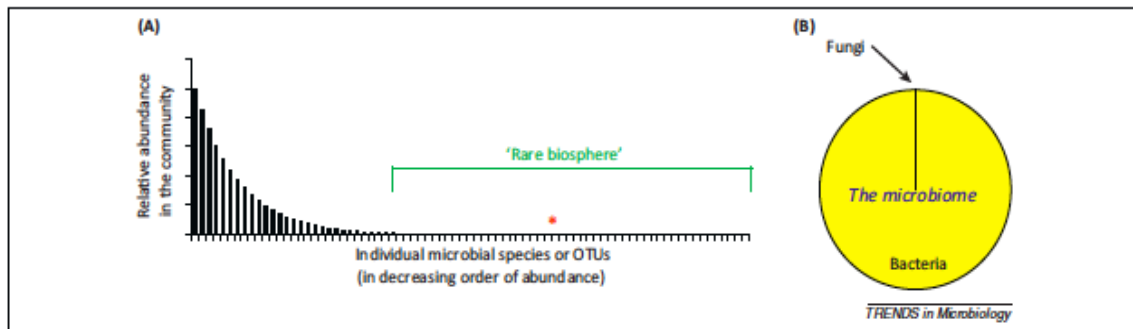


FIGURE 9 : RAPPORT MICROBIOTE FONGIQUE/MICROBIOTE TOTAL (HUFFNAGLE AND NOVERR 2013)

Les deux phyla fongiques les plus représentés sont les Ascomycota et les Basidiomycota (Hoffmann et al. 2013). Ces deux groupes semblent d'ailleurs mutuellement exclusifs. La première caractérisation du mycobiome du sujet sain par séquençage moléculaire a montré que la flore fongique était relativement faible et stable au cours du temps (Scanlan and Marchesi 2008), comprenant *Gloeotinia*, *Paecilomyces*, *Galactomyces* et *Candida*. Une seconde étude moléculaire (Dollive et al. 2012) a montré la présence d'*Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Pneumocystis*, *Candida* et *Saccharomyces* dans le tube digestif de 10 sujets sains. Une troisième étude utilisant une autre approche moléculaire sur un plus large effectif (97 volontaires sains) a mis en évidence plus de 66 genres fongiques différents (Hoffmann et al. 2013). Les levures colonisant le plus souvent le tractus digestif du sujet sain appartenaient au genre *Saccharomyces* (89%), *Candida* (57%) et *Cladosporium* (42%). Mais la composition de la flore fongique intestinale peut varier en fonction de l'alimentation, et de la localisation géographique des individus. On a souvent considéré, d'après les études basées sur la culture, que *C. albicans* était la levure commensale colonisant préférentiellement le tube digestif. Mais une étude récente sur la composition du mycobiome fécal menée dans une tribu amérindienne Wayampi (Angebault et al. 2013) montre que *C. albicans* n'est pas l'espèce majoritaire dans cette population (3-7%). Influencée par l'alimentation locale, *S. cerevisiae* et *C.krusei* (30%) colonisent plus fréquemment le tractus digestif. De nombreuses études métagénétiques suggèrent par ailleurs l'existence de champignons

«non cultivables» avec les milieux et conditions de culture usuels, qui ont été affinés pour faciliter l'isolement des levures du genre *Candida* (Scanlan and Marchesi 2008).

Viral

Le rôle des virus est probablement sous-estimé dans l'équilibre du microbiote intestinal. Cependant la diversité virale y est importante, puisque les virus seraient 10 fois plus abondants que les procaryotes (Norman, Handley, and Virgin 2014).

Bactériophages

Ce sont des virus qui infectent les procaryotes, et sont responsables du transfert horizontal des gènes procaryotes (gènes de résistance aux antibiotiques, fitness...). Leurs fonctions sont indéterminées, mais ils pourraient jouer un rôle dans la stimulation du système immunitaire (Norman, Handley, and Virgin 2014).

Virus

Les virus infectant les cellules humaines sont moins nombreux que les bactériophages, et sont principalement responsables des étiologies de gastroentérites aiguës. Néanmoins le séquençage des virus issus d'échantillons de selles provenant d'enfants sains a montré la présence d'une diversité virale importante (Norman, Handley, and Virgin 2014) (picobirnavirus, adenovirus, anellovirus, astrovirus, bocavirus, enterovirus, rotavirus, and sapovirus).

Interactions entre les différents membres du microbiome

Il existe par ailleurs de nombreuses interactions positives ou négatives entre les différents constituants du microbiote intestinal (Archeobactéries, bactéries et champignons). L'étude d'Hoffmann *et al.* a mis en évidence l'influence du régime alimentaire sur la composition et les interactions entre les différents membres du microbiome fécal (Hoffmann *et al.* 2013). En particulier, une alimentation riche en protéines animales est corrélée positivement au genre *Bacteroides*, et négativement au genre *Candida*. Un régime en hydrates de carbone (sucres) est corrélé positivement aux genres *Prevotella* et *Candida*. Les auteurs ont confirmé des antibioses entre champignons et bactéries (*Candida/Bacteroides*), mais aussi des synergies (*Fusarium/Anaerostipes*, *Pichia/Syntrophococcus*). Il peut aussi exister des interactions champignons-champignons, comme celles rapportées récemment par Mukherjee et al

montrant l'antagonisme entre *Pichia* et *Candida* dans le mycobiome oral chez le patient VIH (Mukherjee, Chandra, et al. 2014)

La synthèse des données actuelles semble privilégier l'existence d'une compétition importante entre microorganismes pour la colonisation des surfaces muqueuses, en particulier entre la flore bactérienne et les champignons du genre *Candida*. De manière générale, il s'agit d'un mécanisme protecteur pour l'exclusion des microorganismes « pathogènes ». A ce titre, il existe une régulation fine entre le commensalisme et la pathogénicité. Il est par ailleurs reconnu que la filamentation de certaines espèces de levures est un facteur de virulence majeur dans le déclenchement des infections fongiques (Felk et al. 2002). Par exemple, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* inhibe la filamentation de *C. albicans* et maintient cette levure sous sa forme « commensale » (Hogan, Vik, and Kolter 2004).

L'étude de Fan a mis en évidence dans un modèle murin le rôle de la flore bactérienne anaérobie commensale digestive (*Bacteroides thetaiotaomicron*) sur le contrôle de la colonisation intestinale à *C. albicans* (Fan et al. 2015). Cette étude démontre qu'un facteur de transcription HIF-1- α (Hypoxia inducible factor -1- α) et un peptide antimicrobien LL-37 (cathelicidine) induits par *B. thetaiotaomicron* diminuent la colonisation intestinale à *C. albicans*. Par ailleurs Cuskin *et al.* ont démontré par des techniques de co-culture que les α -mannanes des levures du tube digestif étaient métabolisés par des bactéries à gram négatif, les *Bacteroidetes*, et en particulier *B. thetaiotaomicron* (Cuskin et al. 2015). Ces données suggèrent l'existence d'interactions fortes entre microorganismes eucaryotes et procaryotes du tube digestif qui participent à l'homéostasie intestinale.

Composition et implication du microbiote bactérien au cours de la maladie de Crohn

Le microbiote intestinal est statistiquement différent entre les patients atteints de maladie de Crohn et des sujets contrôles sains (Qin *et al.* 2010). De plus, il a été démontré que la diversité de la flore bactérienne intestinale était réduite dans la maladie de Crohn, en particulier les phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes*, au profit des *Proteobacteria* (Entérobactéries) (Manichanh et al. 2006). La Figure 10 montre la diminution de cette diversité bactérienne. Il pourrait exister un état de dysbiose, un

déséquilibre entre bactéries « pathogènes » et bactéries « bénéfiques » au cours de la maladie (Chassaing and Darfeuille-Michaud 2011). Par ailleurs des tentatives de transplantation de flore fécale, ont été réalisées au cours de la maladie de Crohn, avec succès, suggérant l'implication de la dysbiose du microbiote intestinal (Cui et al. 2014). Les indications reconnues à ce jour concernent principalement les infections récidivantes à *Clostridium difficile*.

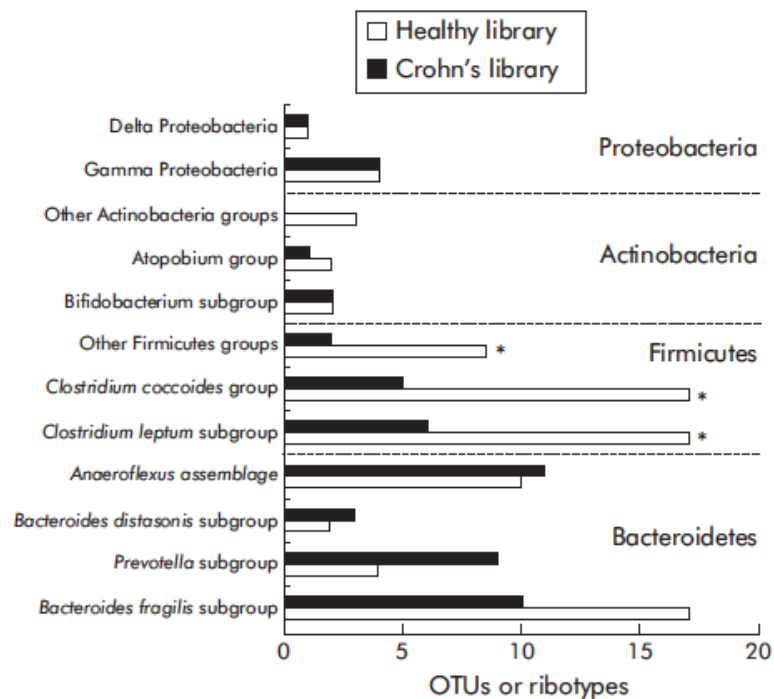


FIGURE 10 : COMPARAISON DE LA FLORE BACTERIENNE FECALE SUJETS SAINS/MALADIE DE CROHN (MANICHANH ET AL. 2006)

Phylum des Firmicutes

Les taux de bactéries appartenant à la famille des *Ruminococcaceae* (phylum des Firmicutes), en particulier *Faecalibacterium prausnitzii* (groupe des *Clostridium leptum*), et *Roseburia hominis* seraient diminués au cours des formes iléales de la maladie de Crohn (Sokol et al. 2009). Ce sont des bactéries indispensables dans la physiologie intestinale, et ont un rôle de protection en digérant les fibres alimentaires en acides gras à chaîne courte (butyrate) (Tedelind et al. 2007), et en intervenant dans la régulation des lymphocytes T régulateurs en inhibant l'activité histone deacetylase, menant à une augmentation de l'expression de *Foxp3* (Smith et al. 2013). De ce fait, ces bactéries ont une activité anti- inflammatoire importante au niveau de l'écosystème intestinal en

diminuant la synthèse de TNF et de cytokines pro- inflammatoires (Segain et al. 2000). Récemment, Quévrain *et al.* ont identifié une protéine chez *F. prausnitzii* présentant des propriétés anti- inflammatoires (Quévrain et al. 2015). Cette protéine inhibe dans un modèle de culture cellulaire la voie NF- κ B, et diminue la colite inflammatoire dans un modèle murin. Par ailleurs, on a constaté que l'absence de *F. prausnitzii* serait un facteur prédictif de rechute après l'arrêt d'un traitement par anti-TNF- α au cours de la maladie de Crohn (Rajca et al. 2014).

Phylum des Bacteroidetes

Il y a une baisse significative du taux des bactéries appartenant au genre *Bacteroides* au cours de la maladie de Crohn (Frank et al. 2007). De plus il a été démontré que les taux de *Bacteroides* étaient plus importants chez les patients en phase de rémission clinique. La récurrence de la maladie était associée à des taux diminués de *Bacteroides* (De Cruz et al. 2015). Ces bactéries ont une action importante dans la modulation du système immunitaire intestinal. A ce titre, le polysaccharide A sécrété par *Bacteroides fragilis* a une activité anti-inflammatoire en stimulant la production de lymphocytes T régulateurs, médiée par l'IL-10 (Mazmanian, Round, and Kasper 2008, Round and Mazmanian 2010). De même, *Bacteroides thetaiotaomicron* a une action anti-inflammatoire *in vitro*, et dans un modèle murin des propriétés antagonistes de la voie NF- κ B (Kelly et al. 2004). Il est intéressant de noter qu'il existe des traitements basés sur l'administration de *B. thetaiotaomicron* au cours de formes pédiatriques de la maladie de Crohn (Thetanix, autorisé par la FDA). Un essai clinique écossais initié en 2016, va évaluer la tolérance et l'efficacité de ce traitement chez des patients MC pédiatriques, en rémission clinique.

Phylum des Proteobacteria

Des pathovars d' *Escherichia coli* dits AIEC (Adherent Invasive *E. coli*) ont été incriminés dans la pathogénèse de la maladie. La bactérie type AIEC a été isolé en culture dans les selles d'un patient MC (Darfeuille-Michaud et al. 1998), par des chercheurs de l'université de Lille (*E. coli* souche LF82). Le taux de ces souches d' *E. coli* avec une virulence et une adhésion aux cellules épithéliales intestinales accrues est augmenté. En particulier la prévalence iléale de ces entérobactéries (membre du phylum des Proteobacteria) est de 36% chez certains patients atteints de la maladie, alors

qu'elle de 6% chez des sujets contrôle (Darfeuille-Michaud et al. 2004). Ces bactéries persistent dans les macrophages et échappent au système immunitaire par un déficit fonctionnel des cellules de Paneth, d'une diminution de la sécrétion de peptides antimicrobiens, et d'une perte de l'autophagie cellulaire (Chassaing and Darfeuille-Michaud 2011). Par ailleurs le lipopolysaccharide (reconnu par le récepteur TLR4) produit par ces entérobactéries aggrave et entretient la réponse pro-inflammatoire au niveau de l'inflammasome cellulaire par les voies de signalisation NF- κ B et NLRP3 (Poltorak et al. 1998).

Autres pistes

Une autre piste oriente vers le rôle de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dans le développement de la maladie de Crohn (Sibartie et al. 2010). Cette mycobactérie est responsable avant tout d'une pathologie bovine, la maladie de Johne responsable d'une inflammation chronique de l'intestin. Elle présente de nombreuses similitudes cliniques et histologiques avec la maladie de Crohn. Cependant le niveau de preuve est bas pour affirmer le lien étiologique entre cette bactérie et la maladie de Crohn.

D'autres agents bactériens potentiellement impliqués ont été étudiés, à savoir *Campylobacter*, *Listeria*, *Helicobacter* (Carrière, Darfeuille-Michaud, and Nguyen 2014), nécessitant d'être approfondis.

Composition et implication du microbiote fongique au cours de la maladie de Crohn

La cartographie de la flore fongique intestinale au cours de la maladie de Crohn a été peu étudiée. Cependant de nombreuses pistes cliniques et expérimentales suggèrent son implication au moins en tant que facteur d'exacerbation de l'inflammation (Poulain et al. 2009).

Preuves cliniques

Tout d'abord, des médecins japonais ont mis en évidence des taux sériques de β -D-(1,3)-glucanes beaucoup plus élevés, chez des patients atteints de MC (Chiba et al. 2001). Ce marqueur d'infection fongique invasive suggère potentiellement une translocation de levures à partir du tube digestif vers le système circulatoire, chez des

patients colonisés présentant une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale. Secondairement, de façon anecdotique, et complètement empirique, il a été rapporté une rémission clinique chez des patients atteints de maladie de Crohn traités par itraconazole pour une histoplasmosse, infection fongique invasive (Samuel, Loftus, and Sandborn 2010). Même s'il s'agit d'un cas rapporté, il semblerait que la flore fongique puisse jouer un rôle dans la pathogénèse de la maladie de Crohn.

La colonisation intestinale par *C. albicans*, révélée d'abord par des techniques de culture, était plus fréquente et plus intense dans les formes familiales de maladie de Crohn (Standaert-Vitse et al. 2009) que dans les familles contrôles. Dans cette étude, *C. albicans* était isolé des selles chez 44% des patients atteints de maladie de Crohn, 38% chez les sujets sains apparentés, contre 22% dans les familles contrôles ($p < 0.05$). Cette colonisation est d'autant plus importante en phase aiguë de la maladie (Gerard R 2013). De plus, la prévalence des ASCA, biomarqueur de la maladie, est plus importante chez ces malades (50-60%). De façon intéressante, la prévalence des ASCA chez les parents sains des familles multiplexes de Crohn est de 25%, alors qu'elle est de 0-6% dans la population générale. Les travaux initiaux de l'équipe lilloise ont montré que ces anticorps étaient dirigés envers le mannane de paroi de la levure probiotique *S. cerevisiae* (Sendid et al. 1996). L'épitope majeur correspond à un phosphopeptidomannane, avec une séquence $\text{Man } \alpha 1,3 (\text{Man } \alpha-1,2 \text{ Man})_n$ (Sendid et al. 2009). Ultérieurement, il a été montré que la levure opportuniste *C. albicans* exprimait au niveau de sa paroi la même structure antigénique, pouvant induire une réponse sérologique similaire à celle révélée par le mannane de *S. cerevisiae* (Standaert-Vitse et al. 2006).

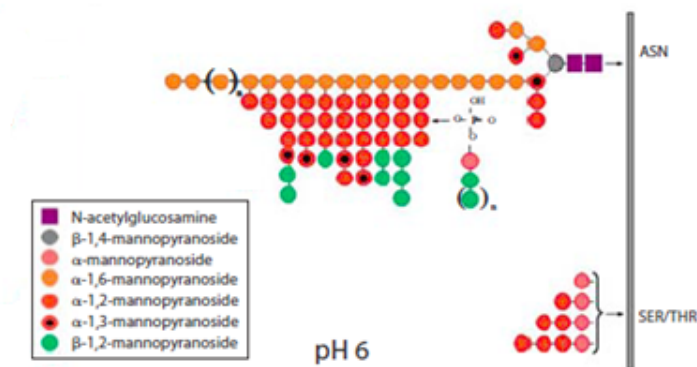


FIGURE 11 : STRUCTURE ANTIGENIQUE DE LA PAROI DE *CANDIDA ALBICANS* (POULAIN ET AL. 2009)

Il existe par ailleurs une réactivité croisée vis à vis des chaînes latérales mannosylées du lipoarabinomannane mycobactérien (Müller et al. 2008). Cependant le scénario de l'implication de *C. albicans*, levure opportuniste, est plus plausible. En effet, les patients sont d'une part plus colonisés par *C. albicans*, et d'autre part la colonisation par cette levure génère une réponse sérologique de type ASCA. En outre de « nouveaux » marqueurs sérologiques de la maladie de Crohn ALCA, et ACCA sont également dirigés contre les β (1,3) glucanes et la chitine majoritairement présents dans la paroi de *C. albicans* (Poulain et al. 2009). Cette perte de tolérance vis à vis des levures commensales du tube digestif chez les malades et leurs parents sains du premier degré des familles multiplex est un argument fort pour la participation de la flore fongique dans le processus inflammatoire de la maladie.

Preuves expérimentales

Un modèle murin de colite chimio-induite au dextran sodium sulfate (DSS) a montré d'une part que l'inflammation intestinale augmentait la colonisation intestinale à *C. albicans*, et d'autre part que la présence de *C. albicans* aggravait les lésions intestinales (Jawhara et al. 2008). Par ailleurs la colonisation du tube digestif de ces souris par *C. albicans* s'accompagnait d'une augmentation de la réponse sérologique des ASCA. Ces données suggèrent fortement l'implication de la flore fongique dans la pathogénèse de la maladie.

Composition du mycobiote intestinal dans la maladie de Crohn

Quelques études métagénétiques ont tenté de caractériser la flore fongique intestinale au cours de modèles animaux de colite chimio induite, et au cours de la maladie de Crohn.

Première étude : Ott

La première étude a montré, par une technique d'empreinte moléculaire, ciblant l'ADN ribosomique fongique 18S (électrophorèse en gel en gradient dénaturant : DGGE) que la flore fongique tissulaire dans le groupe MICI (n=47) était statistiquement différente de la population contrôle (n=57). La richesse et la diversité fongique retrouvées au sein des biopsies intestinales étaient plus importantes chez les sujets atteints de maladie de Crohn (Ott et al. 2008).

Deuxième étude : Li

Une seconde étude, avec une méthodologie similaire (DGGE, 18S) a montré également une flore fongique plus riche et plus diversifiée au niveau des ulcérations muqueuses intestinales et des zones inflammatoires chez des patients atteints de maladie de Crohn, avec notamment une augmentation des proportions de *Candida* spp, *Gibberella moniliformis*, *Alternaria brassicola* et *Cryptococcus neoformans* (Li et al. 2014). La communauté fongique fécale était également plus diversifiée chez ces patients, avec une augmentation de la prévalence de *C. albicans*. Par ailleurs, *S. cerevisiae* était beaucoup plus représenté chez les sujets contrôles, suggérant l'activité anti-inflammatoire potentielle de cette levure. A noter que ces deux études ont utilisé une technologie de séquençage de première génération, avec une profondeur d'analyse réduite.

Troisième étude : Mukhopadhy

Une troisième étude, utilisant une technologie de séquençage à haut débit (technologie 454, cible fongique 18S) a décrit la flore fongique tissulaire (biopsies intestinales) au cours de maladies inflammatoires de l'intestin (Maladie de Crohn, rectocolite hémorragique) survenant dans une population pédiatrique (Mukhopadhy et al. 2014). L'effectif de cette étude était faible (7 patients et 3 contrôles). Les auteurs ont démontré une prédominance des basidiomycètes chez les patients, et une prédominance des ascomycètes chez les contrôles. Malgré le faible effectif de l'étude, la prédominance des basidiomycètes pourrait être expliquée par la perte de tolérance vis à vis des ascomycètes (source potentielle d'ASCA) chez ces patients. Par ailleurs les auteurs ont démontré que la diversité et la richesse de la flore fongique étaient accrues dans la population adulte, ce qui suggère une maturation et une évolution du mycobiome intestinal au cours de l'histoire naturelle de la maladie.

Le concept de cette étude est intéressant, puisqu'il cherche à caractériser la flore fongique tissulaire dans des formes *de novo* de maladies inflammatoires intestinales, chez des patients naïfs de tout traitement (antibiotique, anti-inflammatoire). En s'affranchissant de ces biais, la description de la flore fongique à la phase initiale de la maladie permettrait de mieux comprendre l'implication du mycobiome intestinal dans la physiopathologie de la maladie de Crohn.

Quatrième étude : Lewis

Cette étude décrit la dynamique du microbiome fécal sur une période de 8 semaines (Bactéries, champignons, archéobactéries, et virus) et l'influence de traitements adjuvants (antibiotiques, anti-inflammatoires) au cours des formes pédiatriques de MICI, utilisant une plateforme de séquençage à haut débit (Illumina HiSeq). L'effectif de cette étude était plus important (90 patients MICI, et 26 sujets contrôles). Les auteurs ont montré une augmentation de la communauté fongique (enrichi en *Candida* sp), et une diminution de la flore bactérienne anaérobie chez les patients atteints de MICI (Lewis et al. 2015). Par ailleurs cette étude a montré que l'antibiothérapie était associée à la dysbiose intestinale, et à une communauté fongique accrue. L'analyse séquentielle des échantillons des patients traités a montré l'influence des thérapeutiques sur les modifications du microbiome intestinal. Sous traitement, on observait une amélioration de la dysbiose intestinale, avec une diminution de la flore fongique, et une augmentation de la flore bactérienne anaérobie.

Cinquième étude : Sokol

L'équipe de Sokol a pu démontrer récemment, dans une étude métagénomique la part du microbiote fongique fécal dans une cohorte de patients adultes présentant une MICI (n=235) (Sokol et al. 2016). Il existe un déséquilibre de la flore fongique intestinale chez les patients en poussée de MC, avec une augmentation du rapport basidiomycètes/ascomycètes. Dans les formes iléales de la maladie, la diversité du répertoire bactérien est diminuée au profit d'une augmentation de la diversité fongique (rapport champignons (ITS2)/bactéries (16S) augmenté). Dans les formes coliques, cette diversité fongique est diminuée. Par ailleurs les auteurs de cette étude ont montré une baisse de *S. cerevisiae*, et une augmentation de *C. albicans* chez ces patients dans les formes actives de la maladie. L'effet anti-inflammatoire de *S. cerevisiae* était confirmé par la production accrue d'IL-10 par les cellules dendritiques. Dans cette étude les auteurs suggèrent également une association statistique entre la flore fongique et les gènes de susceptibilité aux infections fongiques (*Dectin-1*, *CARD9*, *TLR1*, *Mincle*).

Dans une seconde étude métagénomique, l'équipe de Sokol a décrit la flore fongique associée aux muqueuses (biopsies intestinales) dans une cohorte de 23 patients MC (Liguori et al. 2015). Les auteurs ont démontré une augmentation de la flore

fongique muqueuse, en particulier une surreprésentation de *C. glabrata*. *Filobasidium uniguttulatum* et *S. cerevisiae* ont été retrouvés dans les portions de muqueuse saine, alors que les champignons de l'ordre des Xylariales ont été retrouvés dans les portions de muqueuse inflammatoire.

Sixième étude : Iliev

L'étude d'Iliev *et al.* fut la première à démontrer l'interaction entre le système immunitaire intestinal et la flore fongique (Iliev *et al.* 2012). Les auteurs ont analysé le mycobiome fécal, dans un modèle de colite chimio-induite au DSS, chez des souris déficientes en dectin-1 (Récepteur lectinique, codé par *CLEC7a*, reconnaissant un motif de la paroi fongique, les (1,3) β -D-glucanes), en utilisant une technologie de séquençage à haut débit (Illumina, cible fongique : ITS). Ce récepteur est important dans l'immunité innée antifongique. Les auteurs ont mis en évidence chez ces souris déficientes en dectin-1 : d'une part une sévérité clinique accrue, et d'autre part une augmentation des levures opportunistes (*Candida*, *Trichosporon*) et une diminution des levures bénéfiques (*Saccharomyces*). La majorité des séquences fongiques amplifiées appartenait à seulement 10 espèces, *Candida tropicalis*, levure opportuniste étant largement majoritaire (65%). De plus, le gavage de ces souris *CLEC7a*^{-/-} par du *C. tropicalis* aggravait les lésions intestinales et la colite. Il est intéressant de noter que la sévérité clinique était atténuée par l'administration d'un antifongique (Fluconazole). Par ailleurs les auteurs n'ont pas noté de différence concernant la flore bactérienne. Ces résultats suggèrent l'implication forte de la flore fongique dans l'aggravation des lésions inflammatoires chez un hôte susceptible.

Une étude réalisée sur un modèle murin de colite chimio-induite est à mettre en parallèle de l'étude d'Iliev (Qiu *et al.* 2015). En utilisant une plateforme de séquençage à haut débit (Illumina, ITS), les auteurs ont démontré une diminution de la charge fongique fécale et une augmentation de la charge fongique tissulaire au cours de l'inflammation intestinale, suggérant une augmentation de la flore fongique muqueuse *in situ*. La flore fongique des souris traitées par DSS présentait des différences significatives avec les animaux contrôles. On retrouvait chez les souris traitées une augmentation de *Penicillium*, *Wickerhamomyces*, *Alternaria*, *Candida* et une diminution de *Cryptococcus*, *Phialemonium*, *Wallemia*. Fait intéressant, les animaux présentant une

colite chronique plus grave avaient des taux sériques de β -d-(1, 3) glucanes augmentés et une translocation accrue de leur flore fongique intestinale au niveau de la muqueuse colique et des tissus lymphoïdes (rate). Ces données expérimentales sont à mettre en parallèle d'une observation clinique de patients atteints de MC présentant des taux sériques élevés de β -d-(1, 3) glucanes (Chiba et al. 2001).

Tous ces faits cliniques et expérimentaux soulignent donc l'importance de la flore fongique intestinale dans la physiopathologie de la maladie de Crohn. Néanmoins, les données de la littérature laissent à penser que la flore fongique n'est pas la cause de la maladie, mais plutôt une contribution à l'exacerbation et à l'aggravation du processus inflammatoire.

Composition et implication du microbiote viral au cours de la maladie de Crohn

Le rôle des virus dans la pathogénèse de la maladie de Crohn est plus discuté. Cependant des virus entériques pourraient être impliqués. Une étude a montré l'impact d'un norovirus murin dans la pathogénèse de la maladie chez des souris knock out pour le gène de l'autophagie *Atg16L1* (Cadwell et al. 2010).

Norman et al. ont récemment démontré des altérations dans la composition du « virome » intestinal au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique). Il existerait une augmentation de la richesse virale, et en particulier une expansion des bactériophages de l'ordre des *Caudovirales* au cours de la maladie (Norman et al. 2015).

Le rôle de l'infection par le virus de la rougeole ou lors de la vaccination est discuté et remis en question par plusieurs auteurs (Ekblom et al. 1994).

Mécanisme immunopathogénétique de la maladie de Crohn

On observe au cours de la maladie une anomalie de la réponse immunitaire muqueuse vis à vis d'un microbiote intestinal altéré (Chassaing and Darfeuille-Michaud 2011). Il s'agit probablement d'une rupture de l'équilibre entre la tolérance et la réponse immune vis à vis des commensaux digestifs, menant au processus inflammatoire de la maladie de Crohn. L'immunité innée (macrophages, cellules

dendritiques) et adaptative (lymphocytes B et T) sont importantes dans le déclenchement du processus inflammatoire.

Immunité innée

Elle s'effectue par le biais des macrophages, des cellules dendritiques de la lamina propria intestinale, en interaction avec le microbiote intestinal. La production de cytokines proinflammatoires (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8) se fait par le biais du recrutement de polynucléaires neutrophiles et des monocytes sur le site de l'inflammation intestinale.

Reconnaissance des motifs bactériens

Les motifs bactériens, les PAMPs, Pathogen associated molecular patterns, (Cf. Figure 12) sont reconnus par des récepteurs membranaires dits PRRs (Pattern recognition receptors) induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires principalement par le biais de la voie NF- κ B. Différentes structures bactériennes sont reconnues par des récepteurs membranaires (Toll-like receptor : TLR) et des récepteurs solubles cytosoliques (Nod like receptor : NLR) de la cellule cible (Man, Kaakoush, and Mitchell 2011). La Figure 12 met en évidence l'immunité innée antibactérienne.

On distingue les lipoprotéines (TLR1, 2), le lipopolysaccharide (TLR4), la flagelline (TLR5), l'ADN bactérien (TLR9) pour les bactéries extracellulaires. L'activation de ces TLR induit la voie NF- κ B, aboutissant à la synthèse de facteurs de transcription nucléaires, impliquée dans la production de cytokines proinflammatoires TNF et IL-8. Les bactéries à développement intracellulaire sont internalisées et reconnues par les NLR (NOD2 et NLRP3 principalement). *NOD2/CARD15* reconnaît un motif du peptidoglycane des bactéries à gram négatif et positif (muramyl-dipeptide), et active la voie NF- κ B, en interaction avec RIPK2. *NOD 2* a été le premier gène de susceptibilité décrit dans les MICI, suggérant le rôle central du microbiote dans la physiopathologie de la MC (Hugot et al. 2001). Les produits de dégradation lysosomale activent les cytokines pro inflammatoires IL-1 β et IL-18 par la caspase 1, via la voie de l'inflammasome NLRP3. L'atteinte des gènes *ATG16L1* et *IRGM*, associée à une susceptibilité à développer une maladie de Crohn, impacte l'autophagosome et l'autophagie cellulaire.

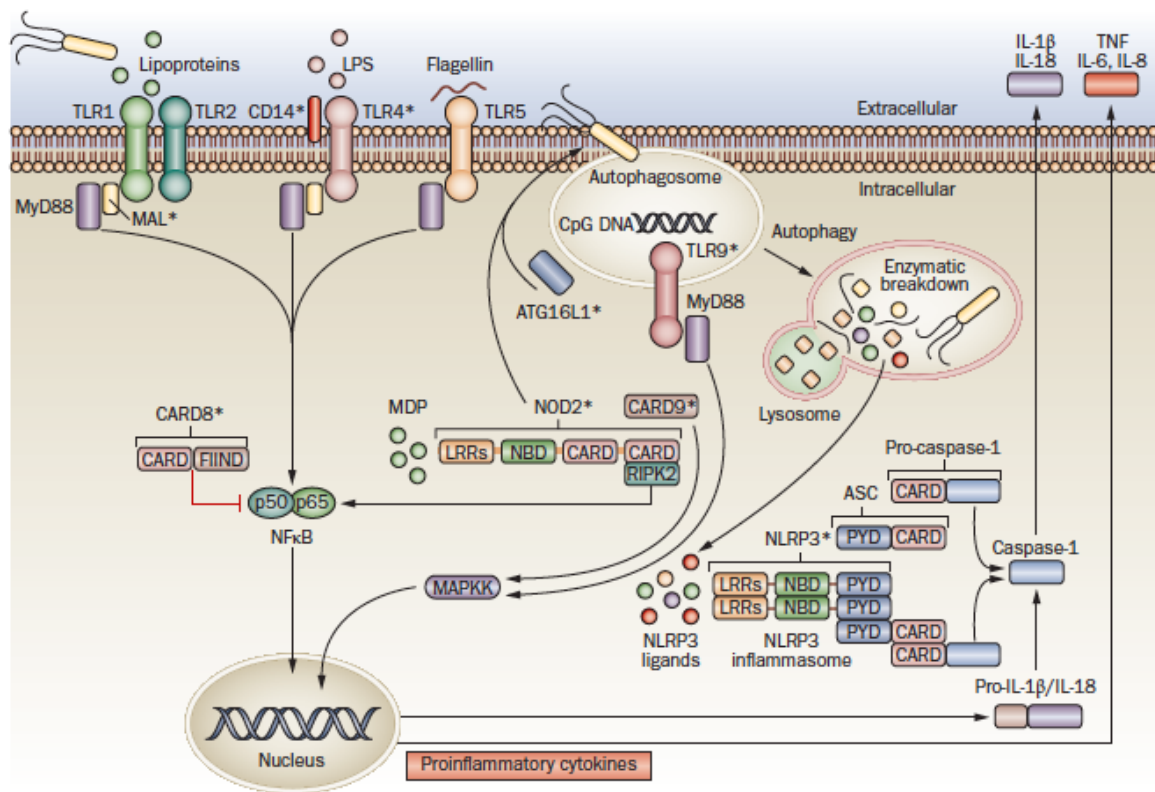


FIGURE 12 : IMMUNITÉ INNÉE ANTIBACTÉRIENNE (MAN, KAAKOUSH, AND MITCHELL 2011)

Reconnaissance des motifs fongiques

Elle se fait par le biais de récepteurs membranaires et solubles (Jouault et al. 2009). Les PAMPs et les PRRs fongiques sont rappelés dans la figure 14. Le modèle exposé ici concerne le modèle d'interaction hôte- *C. albicans*.

La paroi fongique est composée à 90% d'hydrates de carbone (structure glycanique), les 10% restants étant composés de protéines et de lipides. On distingue globalement 2 couches dans la paroi. La couche interne correspond à un réseau de β -glucanes (β -1,3, β -1,6) et de chitine (polymère de N-acétylglucosamine lié par des ponts β -1,4), donnant à la cellule fongique sa rigidité (Gow et al. 2012). La couche externe correspond à une structure de mannoprotéines pariétales liées à la couche interne par des liaisons non covalentes, comme le phosphopeptidomannane (polymères de D-mannose)-ou mannane-. Les autres mannoprotéines sont liées à la couche interne par des liaisons covalentes aux β -1,6 glucanes (ancrage GPI : glycosylphosphatidylinositol), et aux β -1,3 glucanes (Protéines PIR : proteins with internal repeats). Il existe par ailleurs à la surface de la paroi fongique des phospholipomannanes (PLM), une variété de

sphingolipides, composé d'une structure glycanne (β -1,2 mannosides). A priori, le PLM ne serait retrouvé que dans la paroi de *C. albicans* et de *C. tropicalis* (Cantelli et al. 1995). La figure 13 illustre la structure de cette paroi.

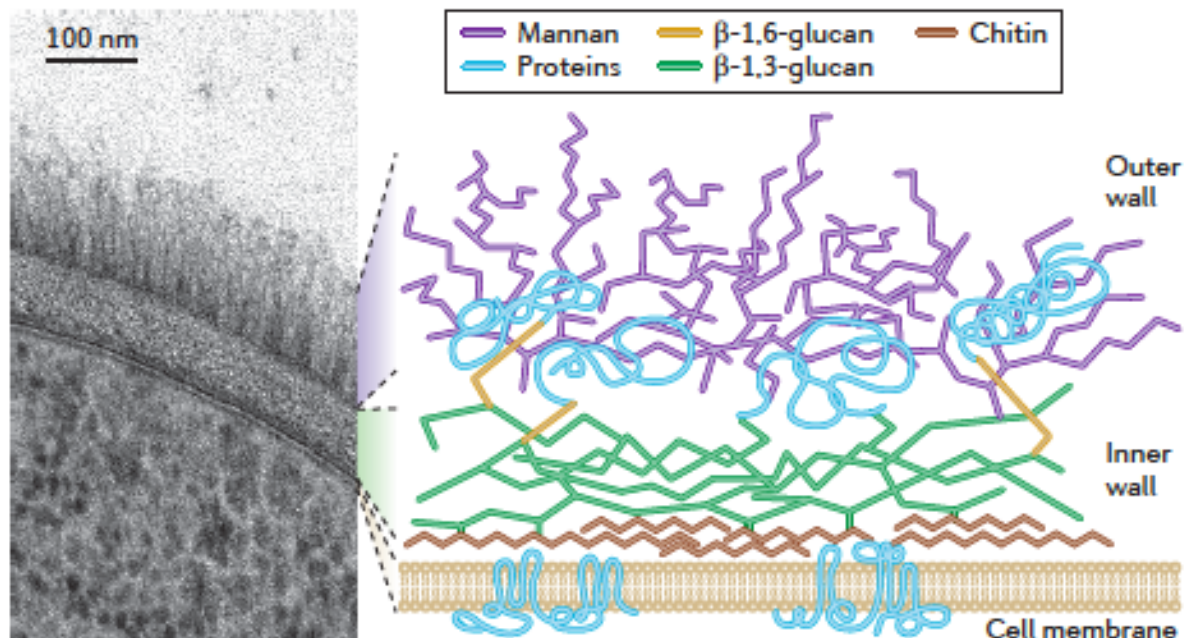


FIGURE 13: STRUCTURE DE LA PAROI DE *C. ALBICANS* (GOW ET AL. 2012)

Parmi les PRRS, il existe :

- les TLR (2, 4, 9). Le TLR2 reconnaît le phospholipomannane, le TLR4 reconnaît les résidus *o*-mannosylés, et le TLR 9 l'ADN fongique et la chitine (Netea et al. 2015). La structure du TLR consiste en un domaine extracellulaire de reconnaissance, riche en motifs répétés de leucine (LRR), et un domaine intracellulaire effecteur composé d'un domaine Toll/IL-1 receptor (TIR) et d'adaptateurs (MYD88 et TRIF). Après présentation de l'antigène fongique, les cellules dendritiques peuvent s'orienter, soit vers un profil « inflammatoire », en initiant une réponse Th17/Th2 en impliquant l'adaptateur MYD88 induisant une réponse NF- κ B, soit vers un profil « tolérant » en initiant une réponse Treg en impliquant l'adaptateur TRIF induisant la sécrétion d'interféron β (Romani 2011).

- les récepteurs lectiniques (C-Lectin types receptors : Dectin 1/2, MINCLE, DC-SIGN, récepteur au mannose, Galectin- 3, langérine).

- Dectin-1, exprimé à la surface des monocytes/macrophages est le récepteur le mieux étudié, et reconnaît le 1,3 β -D-glucane (Netea et al. 2015). Ce récepteur induit une voie de signalisation intracellulaire faisant intervenir les facteurs SYK, CARD9 et RAF1 kinase en synergie pour aboutir à la voie NF- κ B (Gringhuis et al. 2009). En partenariat avec Dectin-1, CARD9 a un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée antifongique (Ruland 2008). On a constaté dans un modèle de colite chimio induite chez des souris KO pour *CARD9* un inoculum fongique intestinal beaucoup plus important ainsi qu'une altération de la réponse immunitaire de l'axe Th17 (Sokol et al. 2013). De plus l'activation de Dectin-1 amplifie la réponse des TLR 2 et 4 (reconnaissant les structures mannosylées de la paroi fongique) (Ferwerda et al. 2008). Par ailleurs, Dectin-1 empêche l'excès de sécrétion de "pièges extracellulaires" par les polynucléaires neutrophiles (système NET: neutrophil extracellular trap) sur le site de l'inflammation, prévenant une action délétère par le système immunitaire en réponse à « l'infection fongique » (Branzk et al. 2014). Ce récepteur joue un rôle important à l'interface entre le système immunitaire muqueux et la flore intestinale fongique. Le déficit en Dectin-1 (*CLEC7A*^{-/-}) favorise la dysbiose intestinale, et est associé à la survenue de colite inflammatoire dans un modèle murin et à des formes sévères chez l'homme de RCH réfractaires (Iliev et al. 2012). Plus récemment, il a été démontré que le déficit en Dectin-1 impacterait l'apoptose des cellules T CD4 au cours de l'infection fongique, entraînant un déficit de la réponse cellulaire immunitaire T adaptative (Drummond et al. 2015).
- Dectin-2, exprimée à la surface des cellules dendritiques, macrophages, et polynucléaires neutrophiles reconnaît les α -mannanes, avec une affinité plus importante pour les formes filamenteuses des champignons. Son rôle a été moins étudié que pour Dectin-1, et semblerait être impliqué dans l'immunité anti-*Candida*, en synergie avec le récepteur Fc des chaînes γ

des immunoglobulines (FcR γ) déclenchant une réponse pro-inflammatoire par production de TNF- α , IL-1 β et IL-6 (Netea et al. 2015).

- MINCLE (macrophage inducible Ca²⁺-dependent -C-type- lectin), exprimé à la surface des macrophages, induit une réponse protectrice vis à vis de *C. albicans*, en synergie avec le récepteur FcR γ , en stimulant la voie pro inflammatoire NF- κ B (Netea et al. 2015).
- DC -SIGN, exprimé à la surface des macrophages et cellules dendritiques reconnaît les résidus N-mannosylés de *Candida* sp. Il joue un rôle dans l'induction de la différenciation des cellules Th 17 (Netea et al. 2015).
- Le récepteur au mannose reconnaît également les résidus N-mannosylés, mais aussi les α -glucanes et la chitine. Ce récepteur est impliqué dans la stimulation de la réponse antifongique Th17 (Netea et al. 2015).
- Les galectines, et en particulier la galectine-3, exprimée à la surface des macrophages reconnaissent les β -mannosides et favorisent l'inflammation intestinale. Dans un modèle de colite chimio-induite, la colonisation et l'inflammation intestinale à *C. albicans* sont diminuées chez des souris galectin3-KO (Jawhara et al. 2008).
- La langérine, présente sur certaines cellules dendritiques des plaques de Peyer, reconnaît des motifs glycaniques tels que les β - glucanes, le mannose, le fucose et la chitine (De Jesus et al. 2014). Dans un modèle murin, les levures *C. albicans* et *C. tropicalis* sont internalisées dans les plaques de Peyer, au niveau des cellules M, et reconnues par des cellules dendritiques spécialisées (CD207) exprimant la langérine (De Jesus et al. 2015).

-les récepteurs solubles lectiniques (Mannose binding lectin : MBL) reconnaissant des motifs fongiques (en particulier les mannanes de *Candida* sp), qui vont activer la voie du complément (recrutement de cytokines pro-inflammatoires permettant l'opsonisation de pathogènes fongiques). La MBL aurait un rôle important dans l'homéostasie intestinale et l'élimination des pathogènes fongiques. Le déficit en MBL peut être associée à une réactivité vis à vis des ASCA, et des formes graves de MC (Schoepfer et al. 2009). Dans un modèle murin de colite chimio induite, le déficit en MBL

augmente la colonisation intestinale à *C. albicans*, et induit la sécrétion des interleukines IL- 17, IL -23, et la synthèse de dectin-1, et duTLR4 (Choteau et al. 2015).

-les NLR : ce sont des récepteurs cytoplasmiques induisant la production d'IL-1 β et d'IL-18 (inflammasome NLRP3). Le défaut d'activation de l'inflammasome augmenterait la colonisation intestinale à *C. albicans*, et aggraverait le processus inflammatoire de la MC (Rehaume, Jouault, and Chamaillard 2010).

En marge de ces PRRs, le rôle du phospholipomannane (PLM) a été suggéré dans la dérégulation de l'inflammation intestinale caractérisant la maladie de Crohn mais cela reste à établir (Fradin, Bernardes, and Jouault 2015). Il s'agit d'un facteur de virulence majeur chez *C. albicans*. Le PLM induit la sécrétion de TNF- α par les macrophages (via un complexe galectin-3/TLR2) et déclenche la cascade pro-inflammatoire NF- κ B (Jouault et al. 2003).

Les sphingolipides, famille dont dérive le PLM, sont des constituants essentiels des cellules eucaryotes dont les champignons. Les bactéries ne possèdent pas de sphingolipides, à l'exception des actinomycètes (Alvarez and Steinbüchel 2002). Une étude sur le microbiome au cours de la maladie de Crohn a montré que la flore fongique activait les voies métaboliques des gènes codant pour les glycérolipides et les glycérophospholipides (Lewis et al. 2015). Ces données suggèrent la potentielle implication des sphingolipides de la paroi fongique dans la régulation de la réponse inflammatoire observée au cours de la MC.

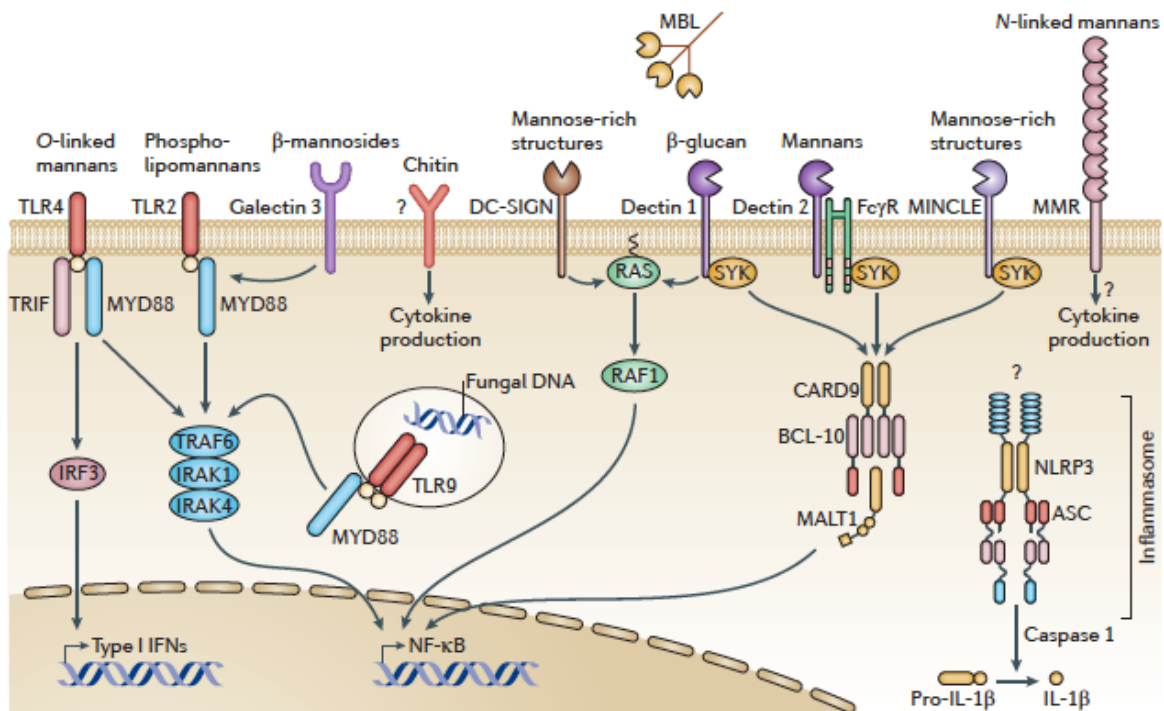


FIGURE 14 : IMMUNITÉ INNÉE ANTIFONGIQUE (GOW ET AL. 2012)

La figure 14 illustre les mécanismes de reconnaissance des PAMPs et la transduction des signaux conduisant au processus inflammatoire nécessaire à la mise en oeuvre de l'immunité anti-fongique.

Immunité adaptative

L'immunité adaptative muqueuse permet d'amplifier la réponse immunitaire, initiée par l'immunité innée, adaptée à l'agent infectieux. Elle fait intervenir des lymphocytes B (sécrétant des IgA et des IgG), et des lymphocytes T. La réponse spécialisée s'effectue à partir de cellules T naïves s'orientant vers une différenciation CD8 (LT cytotoxiques) ou CD4 (Th0). La différenciation CD4 est primordiale (Figure 15), et comprend divers phénotypes (Th1, Th2, Th17, Treg) permettant une balance et une coordination entre une activité pro-inflammatoire et anti-inflammatoire (tolérance) pour maintenir une homéostasie intestinale.

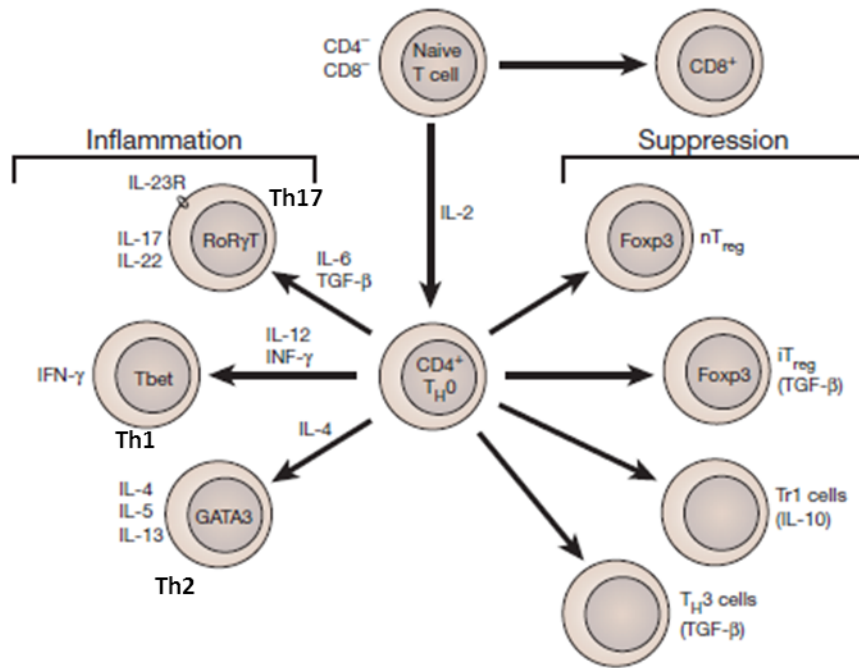


FIGURE 15 : DIFFERENTIATION DES CELLULES DE LA LIGNEE T (XAVIER AND PODOLSKY 2007)

Dans la maladie de Crohn, la réponse immunitaire muqueuse adaptative est dérégulée. En effet, il y aurait un déséquilibre entre les cellules T effectrices et les lymphocytes T régulateurs. Les antigènes microbiens, phagocytés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), sont présentés aux lymphocytes T naïfs, orientant vers une réponse immunitaire proinflammatoire avec un profil de type Th1, ou Th17 (Sartor 2006, Weaver and Hatton 2009). La figure 16 montre le déséquilibre de la réaction inflammatoire sous l'influence d'un microbiote altéré.

Lymphocytes Th1

La réponse Th1 est médiée par l'IFN- γ , dont la synthèse est stimulée par l'IL-12 produit par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), en particulier les cellules dendritiques intestinales. Le profil Th1 et la synthèse d'interféron permettent l'activation des cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles et macrophages) sur le site de « l'infection », participant à l'élimination des « pathogènes » fongiques (Romani 2011). En effet, les souris KO pour l'IFN- γ ont une susceptibilité accrue aux candidoses invasives (Balish et al. 1998).

Lymphocytes Th17

L'axe IL-17/IL-23 est fondamental dans l'immunité muqueuse antifongique au cours de la MC. IL-17 est une cytokine orientant vers une réponse Th17 pro-inflammatoire, médiée par la production d'IL-6, TGF- β et d'IL-23 (rôle stabilisateur et amplificateur de la réponse Th17) par les CPA, permettant le recrutement des polynucléaires neutrophiles et la synthèse de défensines (Romani 2011). Dans la maladie de Crohn, les niveaux tissulaires d'IL-17 et d'IL-23 sont augmentés (Fujino et al. 2003). Par ailleurs, les colonisations bactérienne (Becker et al. 2003) et fongique (Kumamoto 2011) stimulent la sécrétion d'IL-23 par les CPA, favorisant une inflammation intestinale exagérée. De plus les mutations des gènes codant pour les protéines impliquées dans la différenciation Th17 et l'axe IL-23 sont associées à une susceptibilité à développer une MC (Lees et al. 2011). Une récente observation confirme le lien entre la réponse Th17 et le rôle de *Candida* dans le déclenchement de l'inflammation intestinale dans la MC (Colombel et al. 2013). Les auteurs rapportent l'interruption d'un essai clinique d'un nouvel anticorps monoclonal anti-IL-17 A (Secukinumab) dans le traitement de la MC. Ce nouveau traitement anti-inflammatoire a augmenté la colonisation intestinale à *C. albicans* chez ces patients. Ce phénomène s'explique probablement par la levée de la réponse Th17, que l'on peut aussi observer dans la candidose cutanéomuqueuse chronique. En effet l'altération de la réponse Th17 a pour conséquence une diminution du contrôle de la flore fongique commensale.

Lymphocytes T-reg

L'activation des lymphocytes T- régulateurs (T-reg) induit la synthèse d'IL-10 et de TGF- β . Les lymphocytes T-reg jouent un rôle important dans la tolérance, le contrôle de la réponse immune et la régulation des lymphocytes Th1 et Th17. De même les cellules dendritiques, se spécialisant vers un profil « tolérant » activent les lymphocytes T-reg. Cet équilibre entre un profil tolérant/inflammatoire des cellules dendritiques est régulé par une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane, l'indoleamine 2,3 dioxygénase 1, activant les lymphocytes Treg (Romani, 2011). Cette régulation est importante pour la balance entre la tolérance de la flore fongique commensale et l'inflammation intestinale.

L'inactivation des lymphocytes Treg est responsable d'une inflammation intestinale dans un modèle murin (Makita et al. 2004). Dans la maladie de Crohn, il y a un défaut d'activation des lymphocytes Treg (Glocker et al. 2009) entraînant une

diminution des niveaux d'IL-10 et de TGF- β , et une perte de tolérance vis à vis des antigènes microbiens. De plus l'activité et la sévérité de la maladie sont inversement corrélées au taux des lymphocytes Treg périphériques (Maul et al. 2005).

La flore commensale bactérienne occupe une place déterminante dans l'activation des lymphocytes Treg, renforçant le lien entre la dysbiose intestinale et la réponse immunitaire muqueuse. Par exemple, le polysaccharide A de *B. fragilis* stimule la synthèse d'IL-10, permettant l'activation des lymphocytes Treg (Round and Mazmanian 2010). De même les acides gras à chaîne courte (butyrate), produit du métabolisme de la bactérie anti-inflammatoire *F. prausnitzii* ont une action immunomodulatrice sur les lymphocytes Treg (Smith et al. 2013). Dans un modèle murin, le butyrate induit la différenciation des lymphocytes T-reg de la muqueuse colique, en activant l'acétylation de l'histone H3 au niveau du promoteur de *Foxp3* (Furusawa et al. 2013).

Cependant, on ne sait pas encore comment *Candida*, un potentiel pathogène opportuniste est toléré, et maintenu à l'état de commensal digestif. Une étude récente a montré que l'orientation de *C. albicans* vers le commensalisme était sous la dépendance d'une phase dite GUT (Gastrointestinally induced transition), dérégulant les gènes de virulence, et de filamentation, induit par un facteur de transcription *WOR1* (Pande, Chen, and Noble 2013). Il semblerait que *Candida* puisse induire sa propre tolérance, en particulier sa capacité à orienter les cellules dendritiques vers un profil tolérant Treg, en stimulant la voie TRIF (Bonifazi et al. 2009). On pense que la transition entre opportuniste et commensalisme est régulée par la flore bactérienne, les cellules épithéliales sécrétant des peptides anti-microbiens, l'immunité muqueuse, et le régime alimentaire.

Lymphocytes Th2

La réponse Th2 est stimulée par les IL-4 et IL-13. Il y a une hyperréactivité des lymphocytes B (réponse Th2) dans la maladie de Crohn, se manifestant par une production d'IgA sécrétoires au niveau de la muqueuse intestinale, et d'IgG sériques dans le compartiment sanguin (ASCA, anticorps anti-flagelline (Lodes et al. 2004)) par les plasmocytes, témoignant de la perte de tolérance vis à vis du microbiote intestinal.

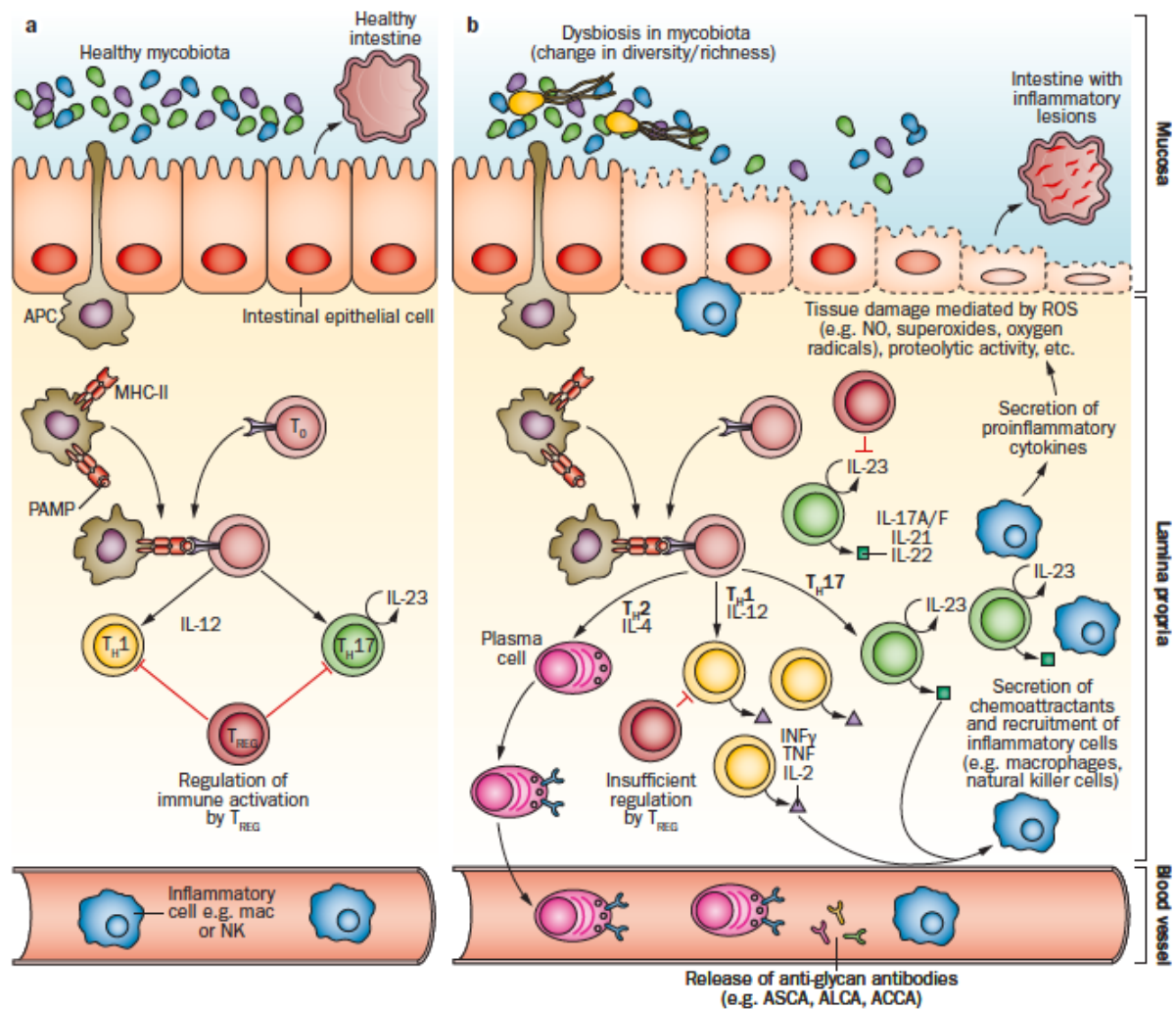


FIGURE 16 : REPONSE IMMUNITAIRE DEREGULEE AU COURS DE LA MALADIE DE CROHN (MUKHERJEE, SENDID, ET AL. 2014)

- Les CPA présentent les antigènes microbiens aux Lymphocytes T naïfs (T_0), qui s'orientent vers une réponse immunitaire Th_1/Th_{17} , régulée par les Lymphocytes T-reg.
- Chez les patients atteints de maladie de Crohn, la réponse inflammatoire est exacerbée par une réponse Th_1/Th_{17} menant à un recrutement massif de cellules inflammatoires (macrophages) et à la sécrétion de cytokines proinflammatoires.

Chapitre 3 : Utilisation des outils métagénomiques pour caractériser le microbiote digestif

L'utilisation de la métagénomique est un progrès majeur dans la caractérisation des microbiotes, et des échantillons complexes présentant une variété importante de microorganismes. Elle vient compléter l'approche utilisant des techniques de culture. En effet, de nombreux microorganismes ne peuvent être cultivés faute de milieu et de conditions de culture adéquate. On estime que plus de la moitié des microorganismes bactériens et fongiques ne sont pas cultivables. Par exemple, les études sur la flore fongique et bactérienne pulmonaire ont montré que 60% des espèces décrites en Next Generation Sequencing (NGS) n'avaient pas été détectées par culture (Delhaes et al. 2012) et qu'il n'y avait pas, de manière générale, de corrélation entre la flore bactérienne obtenue par la culture et la diversité révélée par les méthodes NGS. Les techniques de culture sont d'autant plus limitées pour les champignons, du fait de leur faible abondance. En effet les champignons représentent moins de 1% du microbiome fécal total (Huffnagle and Noverr 2013, Parfrey et al. 2014).

Principe

Le principe de la métagénomique est de recenser l'ensemble d'une communauté microbienne, en utilisant un marqueur génétique panmicrobien, sans avoir à séquencer l'intégralité des différents génomes microbiens. Ces marqueurs génomiques ont l'avantage de présenter des régions conservées et des régions hypervariables entre les espèces, pour pouvoir les discriminer. Les régions ciblées sont principalement le 16S rDNA pour les bactéries, et l'ITS (internal transcribed spacer), le 18S rDNA ou le 28S rDNA pour les champignons. En marge de cette approche ciblée, il est possible d'utiliser une approche métagénomique globale fonctionnelle (« shotgun metagenomic »), permettant d'analyser l'ensemble des gènes du microbiote, y compris les gènes codant pour les voies métaboliques ou des facteurs de virulence. Il s'agit d'une nouvelle approche transversale coûteuse et peu utilisée à ce jour, comme dans cette étude (Lewis et al. 2015).

Depuis peu, il existe un consensus sur le choix de la cible fongique (Irinnyi et al. 2015) et les sociétés savantes recommandent d'utiliser la cible ITS car plus utilisée, et plus discriminante sur le plan phylogénétique (plus de régions hypervariables) (Schoch et al. 2012). Néanmoins, il faut savoir que les banques de données fongiques sont beaucoup moins riches, et contiennent 20% d'erreurs dans l'annotation des séquences (Nilsson et al. 2006). Par exemple la première étude moléculaire sur le mycobiome (2008) a mis en évidence un grand nombre de séquences non annotées, de l'ordre de 77% (Scanlan and Marchesi 2008). Par ailleurs l'analyse taxonomique est rendue plus complexe par le fait qu'un même champignon puisse avoir 2 appellations différentes notamment pour les espèces capables de reproduction sexuée (Ex : *Candida lusitanae*/*Clavispora lusitanae*).

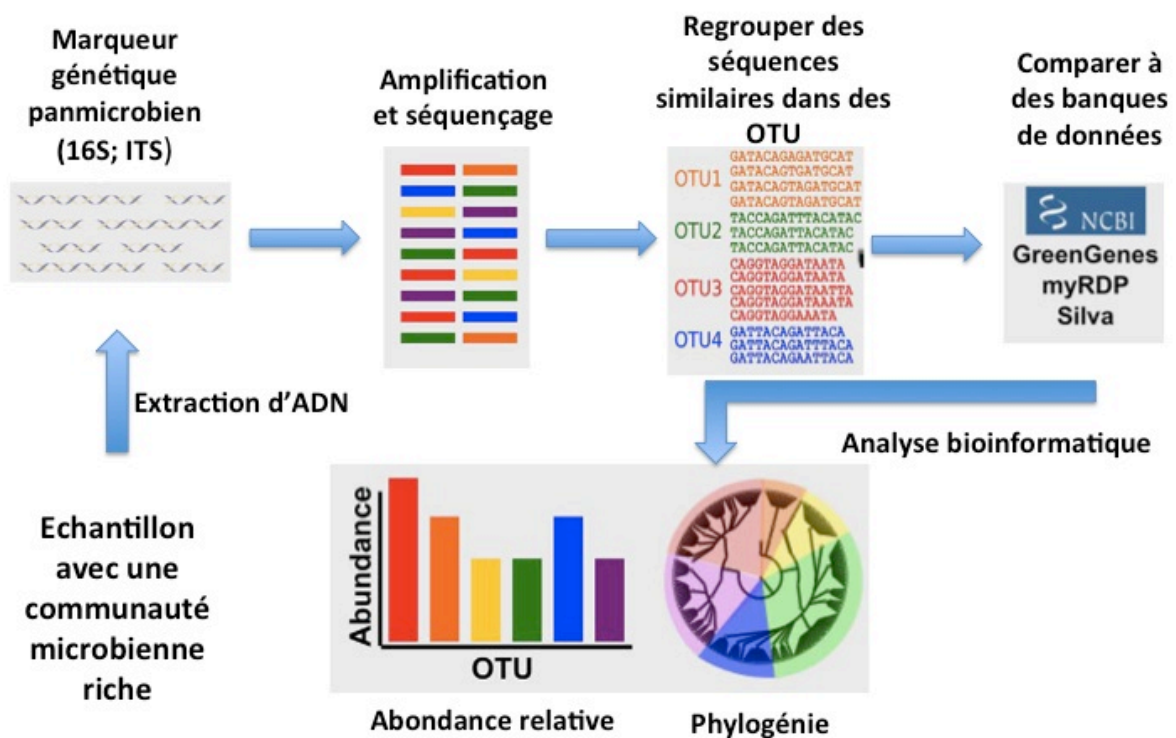


FIGURE 16 : FLOW CHART GÉNÉRAL DES ÉTUDES MÉTAGÉNÉTIQUES (MORGAN AND HUTTENHOWER 2012)

La figure 16 montre les principes généraux et la démarche expérimentale des études métagénétiques.

Extraction de l'ADN fécal

L'extraction de l'ADN microbien est une étape cruciale avant l'étape de séquençage proprement dite. Deux problématiques sont importantes à cerner. Tout d'abord, il faut rappeler que l'échantillon fécal est une matrice complexe, comprenant des résidus de la digestion, des enzymes, et une flore microbienne. Des molécules telles que les acides biliaires sont des inhibiteurs potentiels de la réaction de PCR, pouvant diminuer la sensibilité de l'examen (Hedman and Rådström 2013). Certains kits commerciaux d'extraction utilisent des tampons pour absorber les inhibiteurs présents dans les faeces, comme le Qiagen DNA stool (Persson et al. 2011). Par ailleurs la charge de la flore fécale est le deuxième point clef dans l'étape de séquençage. L'extraction de l'ADN bactérien ne pose pas de problème majeur, car l'inoculum bactérien intestinal est important (10^{12} bactéries/g de selles). En revanche, la taille de l'inoculum fongique est souvent faible (10^3 levures/g de selles). De plus la rigidité de la paroi des champignons (glucanes) est un obstacle à un bon rendement d'extraction d'ADN fongique. Il y a donc un intérêt à optimiser le protocole de PCR. Un prétraitement de l'échantillon en utilisant des techniques de lyse mécanique et/ou chimique est nécessaire pour altérer la paroi des cellules fongiques (Karakousis et al. 2006). La lyse chimique consiste en une digestion enzymatique par la protéinase K et la lyticase. La lyse mécanique consiste en une sonication de l'échantillon mélangé avec des billes de verre. Cependant des contaminants fongiques et bactériens ont été retrouvés dans ces kits commerciaux, pouvant fausser les résultats.

Technologies de séquençage

Il existe plusieurs générations de séquençage (Shendure and Ji 2008).

Technologie de Sanger

Elle est considérée comme le gold standard des techniques de séquençage, avec un taux d'erreur bas, et une longueur des amplicons d'environ 1000 bp. Elle est basée sur une méthode de synthèse enzymatique sélective par incorporation de didésoxynucléotides

marqués (terminateur aléatoire), bloquant la polymérisation de l'ADN. La détection du signal est fluorimétrique (bases marquées par 4 fluorophores différents). Cependant, c'est une technique lourde et coûteuse en métagénétique, nécessitant des étapes de clonage des séquences amplifiées dans des vecteurs bactériens (plasmides). Les différentes approches moléculaires pour la fragmentation de l'ADN utilisées au préalable sont la DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), la RFLP (restriction fragment length polymorphism) et l'OFRG (oligonucleotide fingerprinting of RNA genes).

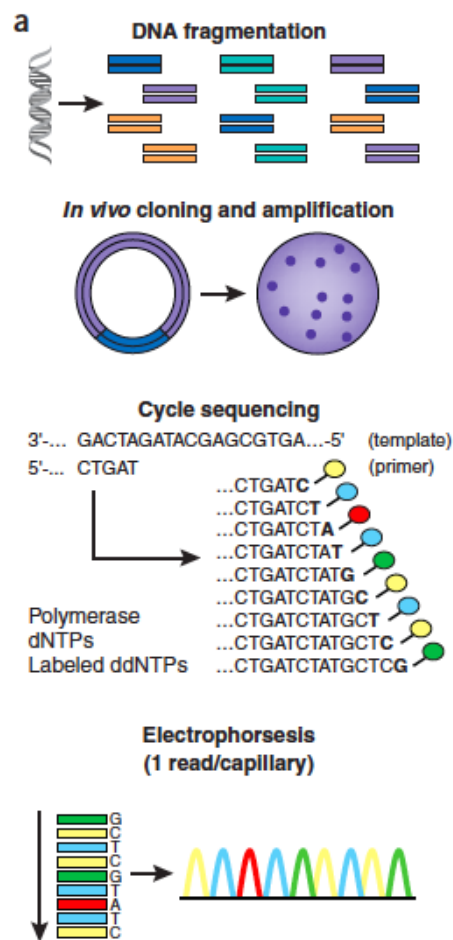


FIGURE 17 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE SEQUENÇAGE DE SANGER (SHENDURE AND JI 2008)

Technologies de haut débit

Elles sont dites de nouvelle génération, ou de haut débit, reposant sur des technologies différentes. Les principales technologies utilisées dans les études métagénétiques sont la technologie 454 (Roche), Solexa (Illumina) et Ion torrent (Life technologies).

454/Système Roche

Ce système utilise une PCR dite émulsion (interface milieu aqueux/huile), pour amplifier de façon clonale des fragments d'ADN sur des billes magnétiques (Figure 18). Ces billes sont déposées dans une plaque contenant 1.6 millions de puits (PicoTiter plate). La chimie utilisée est une réaction de pyroséquençage en temps réel. Lors de l'élongation du brin d'ADN amplifié, la réaction de polymérisation entraîne la formation d'ions pyrophosphate qui sont convertis en photons (lumière). L'intensité de la réponse lumineuse est proportionnelle à l'incorporation de nucléotides. Selon la plateforme utilisée, les amplicons ont une taille comprise entre 400 et 700 bp.

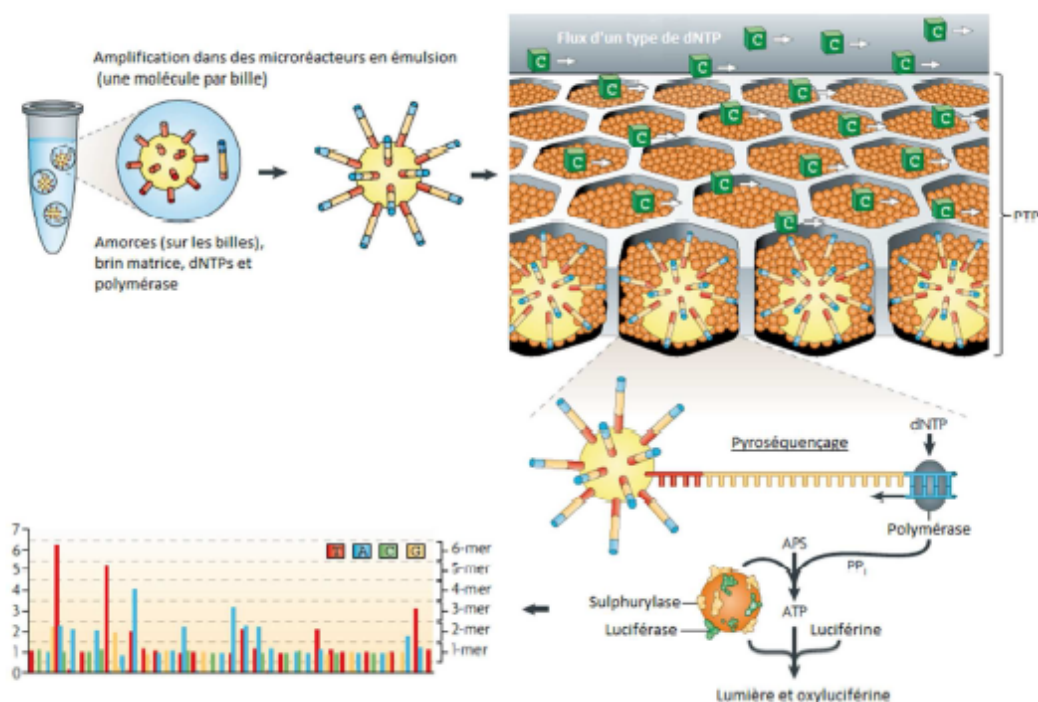


FIGURE 18 : TECHNOLOGIE 454 (METZKER 2010)

Illumina/Solexa

Ce système immobilise des fragments d'ADN sur une surface de verre (flow cell), basé sur une technique d'amplification en pont (Figure 19). L'amplification de l'ADN déposé sur cette surface crée des clusters de molécules identiques. Le séquençage se fait par incorporation réversible de nucléotides fluorescents (lecture optique de la fluorescence). Il s'agit du système le plus robuste, avec un taux d'erreur à 0.1%. La taille des amplicons est de 300 bp.

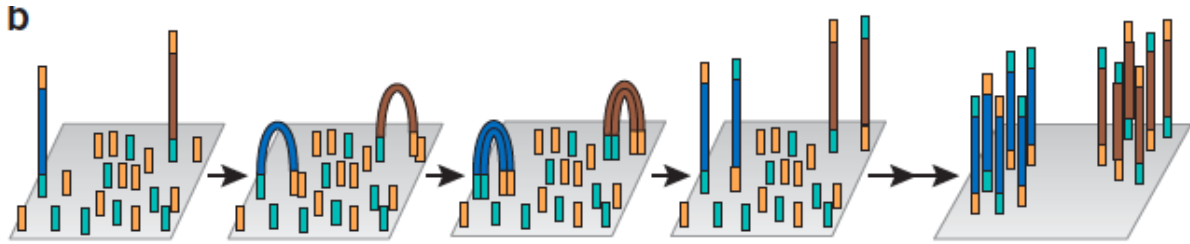


FIGURE 19 : TECHNOLOGIE ILLUMINA/SOLEXA (SHENDURE AND JI 2008)

Ion torrent/Life Technologies

Ce système utilise aussi une PCR émulsion, pour l'amplification clonale des fragments d'ADN sur des billes (Figure 20). Ces billes sont ensuite déposées dans les puits d'une puce. Lors de la réaction de séquence, il y a libération d'un ion proton (H^+) à chaque incorporation d'une nouvelle base. La détection est basée sur la modification du pH. La taille maximale des amplicons est de 400 bp.

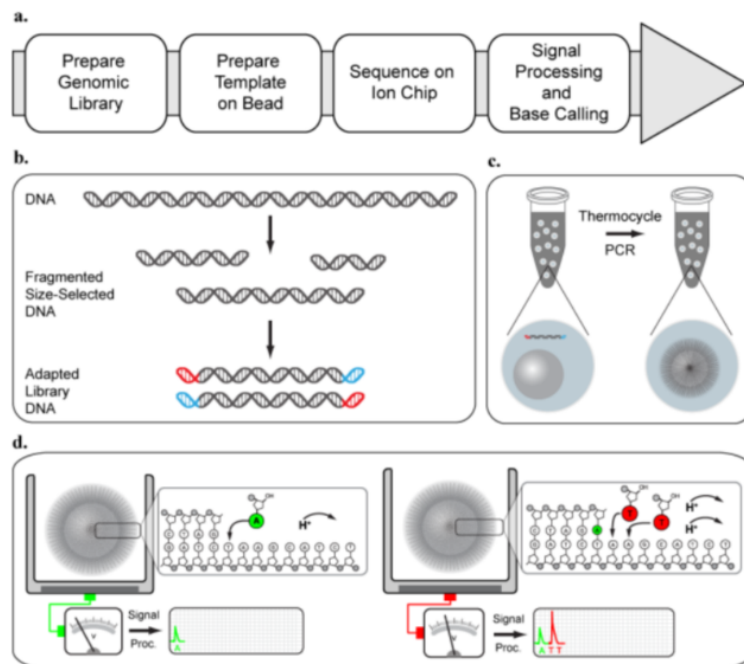


FIGURE 20 : TECHNOLOGIE ION TORRENT (LIFE TECHNOLOGIES)

Comparaison des différentes technologies de séquençage

Le tableau 2 ci-dessous résume les propriétés des différentes technologies de séquençage. Trois technologies sont principalement utilisées pour le séquençage

microbien : 454 (Roche, pyroséquençage), Illumina MiSeq et Ion Torrent PGM. La technologie Illumina est la plus robuste et la plus sensible pour l'analyse des séquences complexes. Le taux d'erreur est plus important avec les technologies 454 et Ion Torrent, notamment dans le séquençage des homopolymères (ex : TTTTT) (Loman et al. 2012). A ce jour la technologie 454 est abandonnée par la société Roche, et il reste à disposition l'Ion Torrent et le MiSeq. La technologie Ion Torrent, quoique moins performante que la technologie Illumina, a été utilisée avec succès dans le séquençage de génomes microbiens et dans des études métagénomiques. L'évolution de la technologie Ion Torrent permet de séquencer des séquences de plus en plus longues (400 bp), à plus faible coût.

| | Read length | Maximum insert size | Run time (hours (h) or days (d)) | Reads per run | Relative cost factor (per Mb) | Scale of reads per sample | Scale of samples per run | Raw error rate (%) | | | |
|---------------------|-------------|---------------------|----------------------------------|--|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|------------|-----------|------------|
| | | | | | | | | Total | Insertions | Deletions | Mismatches |
| ABI 3730 | 800 b | >1 Kb | 2 h | 96 | 100 | 10 ² | 10 ¹ | 0.001 | <<0.1 | <<0.1 | <<0.1 |
| 454 FLX Titanium | 300–400 b | 800 b | 9 h | 10 ⁶ | 1 | 10 ³ | 10 ² | 1 | <1 | <<0.1 | <<1 |
| 454 FLX+ | 500–600 b | 1200 b | 23 h | 10 ⁶ | 0.7 | 10 ³ | 10 ² | | | | |
| Illumina GAIIx | 76–101 b | 500 b | 6–9 d | 4 × 10 ⁸ | 0.1 | 10 ⁵ –10 ⁶ | 10 ³ –10 ⁴ | <1 | <<1 | <<1 | <1 |
| Illumina HiSeq 2000 | 101–151 b | 500 b | 9–15 d | 3 × 10 ⁹ | 0.002 | 10 ⁵ –10 ⁶ | 10 ³ –10 ⁴ | | | | |
| Illumina MiSeq | 36–151 b | 500 b | 4h–27 h | 10 ⁷ | 0.06 | 10 ⁴ | 10 ² | | | | |
| PacBio | 1100 b | >1 Kb | 1.5 h | 3.5 × 10 ⁷ | 1.5 | 10 ³ | 10 ¹ | 15 | 13 | 1 | 1 |
| IonTorrent | 200 b | 400 b | 2–3 h | 1.5 × 10 ⁶ –3 × 10 ⁶ | 0.4 | 10 ³ | 10 ² | 2 | 1 | 1 | <1 |

TABLEAU 2 : COMPARAISON DES DIFFERENTES TECHNOLOGIES DE SEQUENÇAGE (KUCZYNSKI ET AL. 2012)

Outils bioinformatiques

Cette étape correspond au traitement et à l'analyse statistique des données brutes du séquençage. Des logiciels ont été développés tels que Mothur ou Qiime pour l'analyse statistique des données relatives à l'abondance et à la diversité écologique (Caporaso et al. 2010, Schloss et al. 2009). Ces marqueurs et indices statistiques sont utilisés de manière courante dans les principales études métagénomiques sur le mycobiome (Mukherjee, Chandra, et al. 2014).

Analyse phylogénétique

Les séquences similaires obtenues sont regroupées en clusters d'OTU (Operational taxonomic units) ou phylotypes, c'est à dire les nœuds terminaux d'une analyse

phylogénétique. Les cut-offs de similarité entre les séquences d'un même cluster sont fixés généralement entre 95% et 99%. Ces OTUs sont confrontés à des banques de données (NCBI, Silva, Greengene, UNITE...) pour identification (Morgan and Huttenhower 2012).

α -diversité

L' α -diversité permet de mesurer le nombre de taxons à l'intérieur d'un écosystème.

Abondance

On peut estimer en première intention l'abondance absolue ou « richness » (nombre de taxons par échantillon), et l'abondance relative ou « evenness » (ratio) pour mesurer la biodiversité.

Courbe de raréfaction

C'est une courbe indiquant le nombre cumulé d'espèces nouvelles trouvées au fur et à mesure de l'échantillonnage aléatoire. C'est un critère d'efficacité du couple d'amorces, et d'estimation de la richesse taxonomique de l'échantillon (et de son exploitation statistique).

Indices de diversité

Il existe plusieurs indices statistiques pour estimer la diversité à l'échelle d'un microbiote. On distingue la richesse taxonomique absolue (« Richness » (S): nombre de taxons i) et l'indice de Shannon (H'), ou de Simpson (λ) permettant de caractériser la biodiversité (index statistiques). P_i représente l'abondance relative des taxons i .

$$\lambda = \sum_{i=1}^s p_i^2$$

$$H' = -\sum_{i=1}^s p_i \log p_i$$

ÉQUATION 1 : INDICES DE SIMPSON ET DE SHANNON

Pour évaluer la distribution de l'échantillon, on dispose de l'index de Pielou (J', « Evenness »), qui correspond au ratio entre l'indice de Shannon (diversité), et le log de

la richesse taxonomique. Celui-ci permet d'évaluer la stabilité d'une communauté (Ratio entre 0 et 1).

$J' = H' / H'_{max}$ avec $H'_{max} = \log(S)$, ou S est le nombre total d'espèces.

ÉQUATION 2 : INDICE DE PIELOU

β -diversité

La β -diversité permet de mesurer la diversité entre différents écosystèmes. L'analyse en composantes principales (ACP, figure 21) permet d'approcher une estimation de cette diversité. L'ACP est une représentation géométrique et statistique des OTU, permettant d'identifier des variances significatives entre les populations étudiées, à l'échelle d'un microbiote. Les graphiques typiques, retrouvés dans les études métagénétiques, sont définis par des composantes (PC1, PC2..), le long des axes, qui définissent les variances entre les échantillons. La composante PC1 représente la plus forte variance. L'analyse en coordonnées principale (PCoA) est une variante de l'ACP, et permet de mesurer les distances entre les échantillons (Indice de Bray-Curtis).

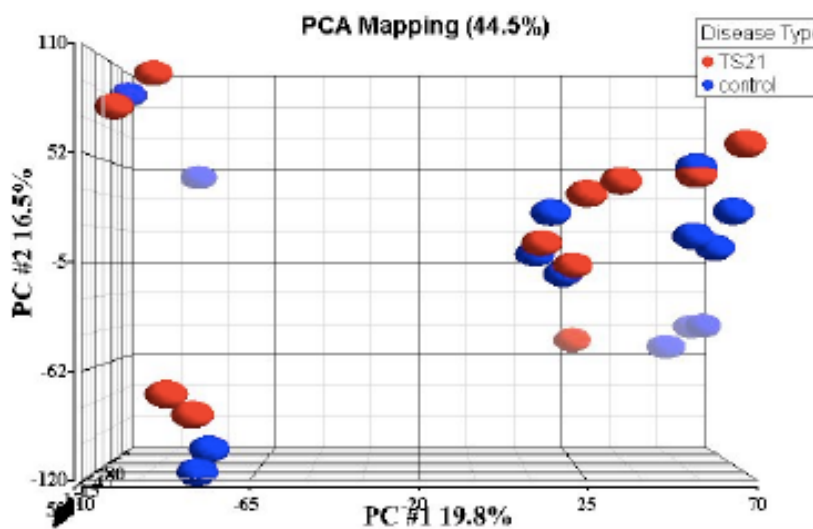


FIGURE 21: ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (LOGICIEL PARTEK)

Chapitre 4 : Matériels et méthodes

La maladie de Crohn est une pathologie inflammatoire du tube digestif, d'origine multifactorielle qui touche un habitant sur 1000 en France. L'hypothèse la plus communément admise est qu'elle serait liée à une dérégulation de la réaction immunitaire muqueuse vis-à-vis d'un microbiote intestinal déséquilibré (dysbiose) sous l'influence de facteurs environnementaux (tabac, alimentation) et génétiques. La dysbiose bactérienne a été largement évoquée, mais il semblerait que la flore fongique commensale -moins décrite- puisse influencer la sévérité de la maladie. L'objectif de notre étude est de réaliser une cartographie du microbiote bactérien et fongique fécal dans les formes familiales de maladie de Crohn, et d'identifier une dysbiose potentiellement responsable du déclenchement d'une réponse inflammatoire digestive exacerbée.

Pour cela, nous avons utilisé une plateforme de séquençage à haut débit (Ion torrent) pour caractériser le microbiote fongique fécal et bactérien (cible panfongique : ITS1, et panbactérienne : 16S) de 9 familles multiplex de maladie de Crohn (composés de patients, et de sujets sains apparentés) et de 4 familles contrôles. Ces formes familiales, définies par une atteinte d'au moins trois membres au 1^{er} degré sont des modèles intéressants et informatifs pour la compréhension de la physiopathologie de la maladie de Crohn. En effet les sujets sains apparentés peuvent évoluer vers la maladie, et il semble intéressant de comparer les modifications du microbiote à l'intérieur de ces familles multiplex, pouvant participer au déclenchement de la réponse inflammatoire intestinale.

Patients

Recrutement:

Nous avons étudié la composition du mycobiote et du microbiote fécal et la réponse sérologique (ASCA), de 9 familles, sélectionnées par le registre EPIMAD (Lille, France), et le registre des maladies inflammatoires de l'intestin de Louvain, Belgique. 9 familles françaises et belges correspondaient à des familles multiplex de maladie de Crohn, avec

au moins 3 membres malades (premier degré). Les 4 autres familles, sélectionnées en France, étaient des familles contrôles, indemnes de la maladie de Crohn. Pour le reste de l'étude on désignera les 3 groupes ainsi :

- CD (Crohn's disease, n=20) : Patients atteints de maladie de Crohn
- NCDR (Non Crohn disease relatives, n=28) : Sujets sains apparentés aux malades (1^{er} degré)
- NCDU (Non Crohn disease unrelatives, N=21) : Sujets issus des familles contrôles

Les patients ont été vus par des gastroentérologues indépendants des 2 hôpitaux, selon la méthodologie EPIMAD. Les parents sains et les familles contrôle ont été vus à leur domicile. Tous les participants ont donné leur consentement pour l'étude en question, approuvée par le comité d'éthique de l'université catholique de Louvain et du CCPPRB de Lille (CP 00/60, année 2000).

Description des variables cliniques :

L'âge au diagnostic, le sexe, la date du diagnostic de la maladie, la consommation de tabac, les localisations extra intestinales, l'histoire de la maladie, la localisation et le comportement de la maladie d'après la classification de Montréal, ont été renseignés, pendant l'examen médical. Dans la classification de Montréal, A1 correspond aux patients diagnostiqués à un âge inférieur à 17 ans, A2, de 17 à 39 ans et A3, supérieur à 40 ans. Les localisations digestive de la maladie correspondent à: L1, localisation iléale, L2, colique, L3, iléocolique et L4 gastrointestinale haut. Les formes de la maladie comprennent : B1 (inflammatoire), B2 (sténosant), et B3 (fistulisant). Les formes B2 et B3 correspondent à des formes compliquées.

Tests biologiques

Détection des anticorps anti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) dans le sérum des patients

Nous avons utilisé un test sérologique ELISA pour quantifier les ASCA. Les titres étaient exprimés en unités arbitraires (AU), selon une courbe de calibration pour chaque expérimentation, comme décrit ici (Standaert-Vitse et al. 2009).

Culture fongique des selles

La culture des échantillons coprologiques a été réalisée sur milieu chromogénique (CHROMagar, Beckton Dickinson, Paris, France) en utilisant une oese calibrée. Les cultures étaient incubées pendant 48h à 37°C. L'identification des levures isolées était réalisée par Bichro-Latex-albicans (Fumouze, Levallois, France) pour *C. albicans* et par le système API32C (Bio-Merieux, Marcy l'étoile, France) pour les autres espèces.

Analyse métagénomique moléculaire des selles des patients

Le flow chart et principe de l'analyse moléculaire ont été abordés dans le chapitre 3 (figure 20). Le séquençage des métagénomomes bactériens et fongiques a été réalisé dans le laboratoire du Pr Ghannoum (Case Western Reserve University, Cleveland, USA), en utilisant une technologie dite de haut débit sur l'appareillage Ion Torrent (Life Technologies).

Les grands principes de l'analyse technique métagénomique sont :

1. Extraction de l'ADN fongique et bactérien, ayant nécessité une optimisation de la technique Qiagen (ajout d'une étape de lyse mécanique par des billes de verres)
2. Préparations des banques ou bibliothèques : amplification au préalable des extraits par une réaction de PCR, en utilisant des marqueurs génétiques panfongiques (ITS) et panbactériens (16S).

3. Ces produits de PCR sont purifiés et fragmentés pour obtenir des amplicons de moins de 200 bp. Par la suite la structure de ces amplicons est modifiée, en utilisant une technique de ligation par l'ajout d'un code à barre et d'adaptateurs.
4. Les fragments d'ADN sont ensuite ré-amplifiés de façon clonale lors de l'étape dite de PCR émulsion (interface milieu aqueux/huile) sur des billes magnétiques, suivi d'un enrichissement.
5. Chargement de la puce et étape de séquençage proprement dite sur l'Ion Torrent Personal Genome Machine.
6. L'analyse bioinformatique.

Extraction de l'ADN fongique et bactérien

L'ADN fongique et bactérien a été isolé et purifié avec le kit Qiagen QiaAMP DNA Stool mini kit selon les recommandations du fabricant (figure 22). L'intérêt de ce kit est d'utiliser un réactif (InhibitEX) permettant la neutralisation des potentiels inhibiteurs de PCR. En effet la matrice fécale est complexe et inhibe fortement les réactions de PCR. Quelques modifications y ont été apportées pour augmenter le rendement de l'extraction de l'ADN, qui nécessite des étapes de lyse mécanique due à la rigidité de la paroi fongique. Nous avons donc utilisé 3 étapes de lyse avec des billes de verre (Sigma-Aldrich, USA ; diamètre : 500 μ m), avec l'appareil MP Fast-Prep 24 (MP Biomedicals, USA). La qualité et la pureté de l'ADN ont été confirmées par spectrophotométrie en utilisant le Nanodrop 2000 (Fischer Scientific SAS, Illkirch, France). La quantification de l'ADN bicaténaire a été réalisée par fluorimétrie avec le Qubit 2.0 (Life Technologies, USA). La concentration d'ADN est une étape critique dans le processus de séquençage. Les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C.

QIAamp DNA Stool Mini Procedure

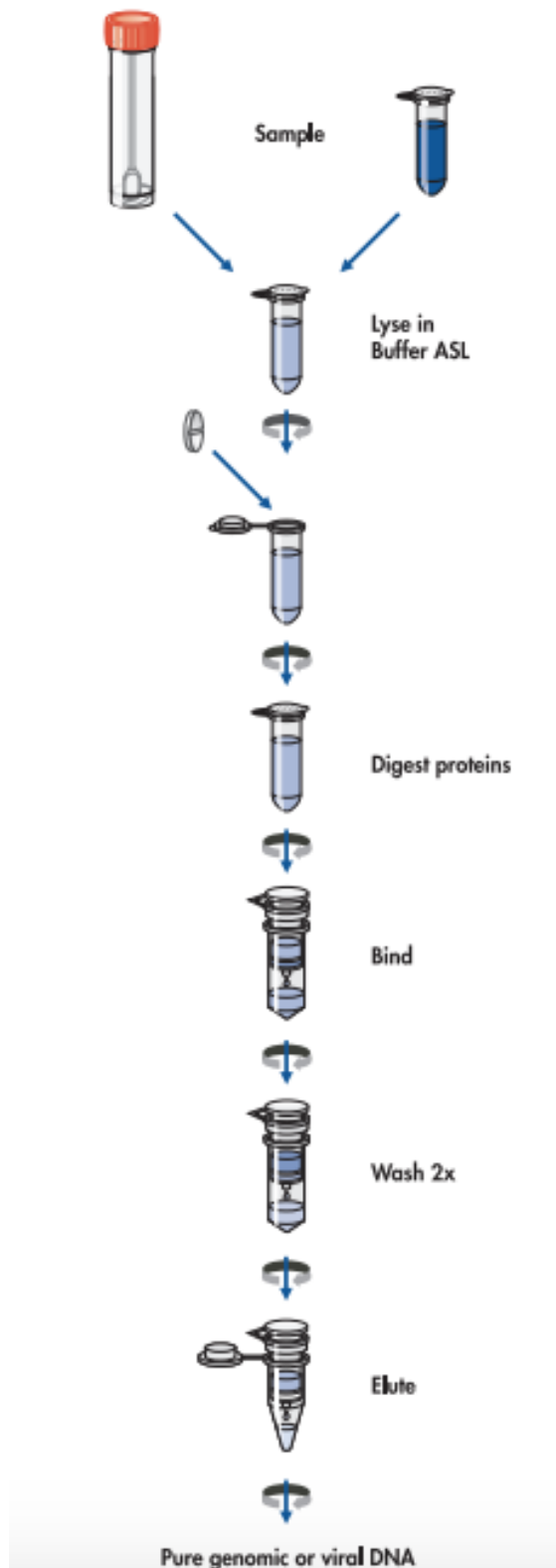


FIGURE 22 : PROCEDURE D'EXTRACTION DE L'ADN (QIAGEN)

Préparation de la bibliothèque d'amplicons fongiques

La région ITS1 (Figure 23) a été amplifiée, en utilisant les amorces ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) and ITS 2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC).

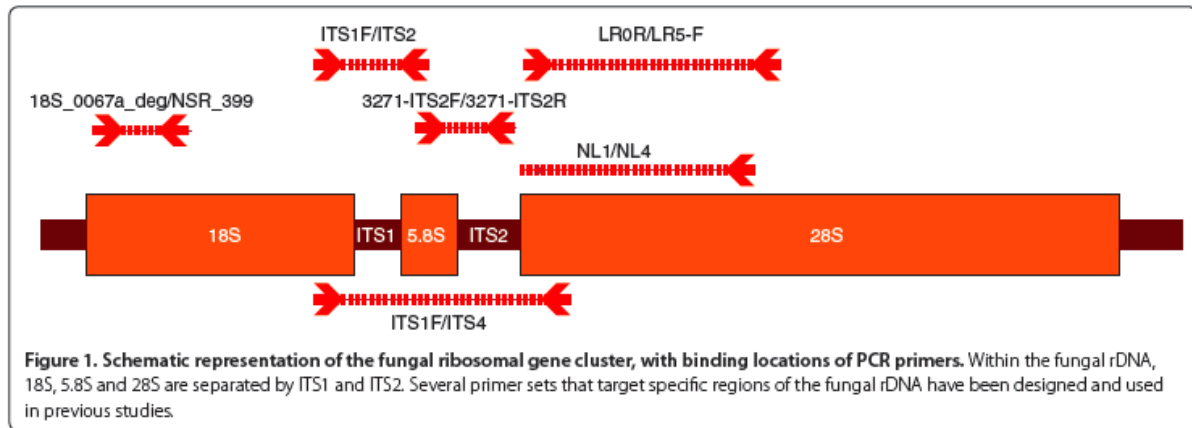


FIGURE 23 : REGIONS GENOMIQUES DE L'ADN FONGIQUE RIBOSOMAL (CUI, MORRIS, AND GHEDIN 2013)

La composition du mélange réactionnel d'un volume final de 50 µl pour la PCR est décrite, ci-après:

- Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermoscientific), 0.1 g/L bovine serum albumin, 1% de dimethylsulfoxyde (DMSO), 6 mM MgCl₂, 400nM d'amorces et 100 ng d'ADN génomique.

Le protocole de PCR, réalisée sur un thermocycleur Biorad T100™, était le suivant :

- Dénaturation initiale à 94°C (3 min)
- 35 cycles de dénaturation de 30s à 94°C, d'hybridation à 50°C (30 s), et d'élongation à 72°C (1 minute)
- Elongation finale à 72°C (5 minutes)

Préparation de la bibliothèque d'amplicons bactériens

La région hypervariable V4 de l'ARN 16S (figure 24) a été amplifiée en utilisant les amorces 16S-515F: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA et 16s-806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT.

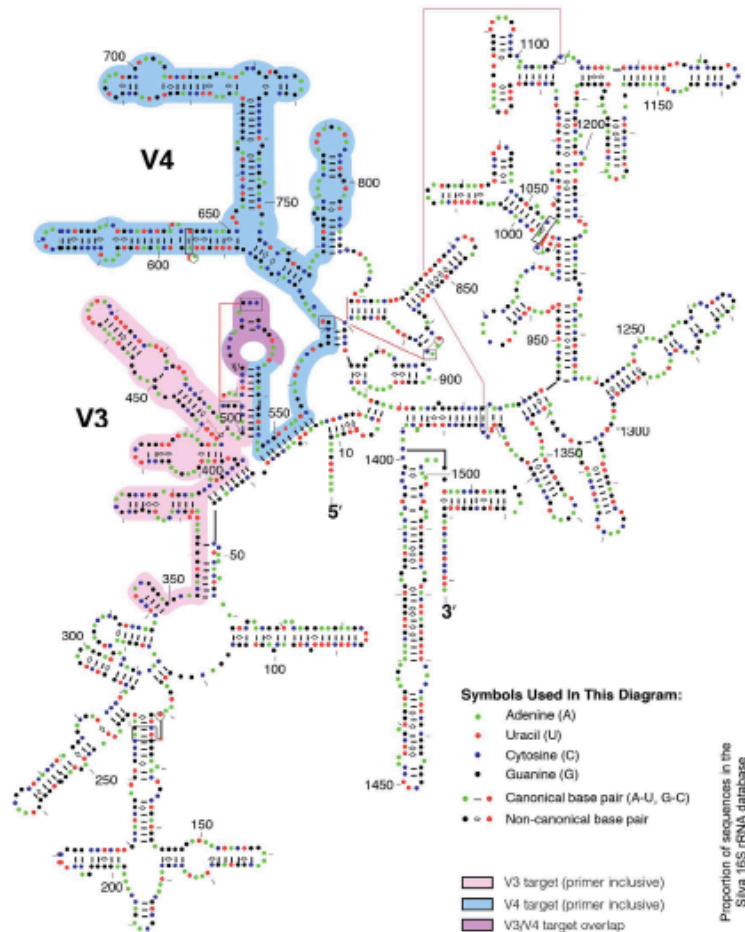


FIGURE 24 : REGIONS GENOMIQUES DE L'ADN BACTERIEN RIBOSOMAL (ZIESEMER ET AL. 2015)

La composition du mélange réactionnel d'un volume final de 50 μ l pour la PCR est décrite, ci-après:

-Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermoscientific), 0.1 g/L bovine serum albumin, 1% de dimethylsulfoxyde (DMSO), 6 mM MgCl₂, 400nM d'amorces, et 100 ng d'ADN génomique.

Le protocole de PCR, réalisée sur un thermocycleur Biorad T100™, était le suivant :

- Dénaturation initiale à 94°C (3 min)
- 35 cycles de dénaturation de 30s à 94°C, d'hybridation à 50°C (30 s), et d'élongation à 72°C (1 minute)
- Elongation finale à 72°C (1 minute)

La qualité des amplicons fongiques et bactériens a été vérifiée par une électrophorèse (100 V, 45 minutes) sur un gel d'agarose (1.5%) Tris Acetate EDTA, et révélée par excitation UV en utilisant du bromure d'éthidium (figure 25). Nous avons utilisé un marqueur moléculaire mettant en évidence des amplicons compris entre 100 et 1000 bp (La taille attendue des amplicons est d'environ 300 bp, flèche bleue).

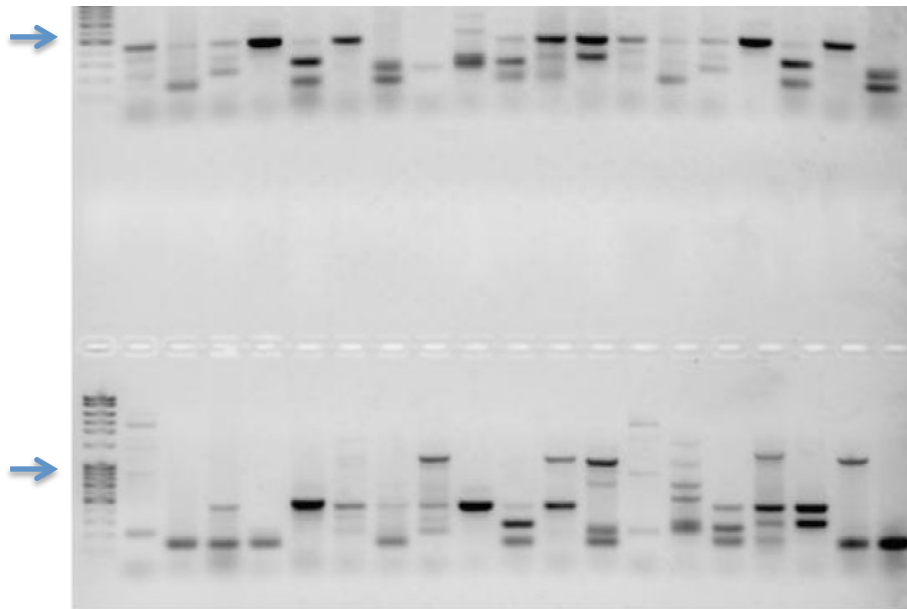


FIGURE 25: GEL D'ELECTROPHORESE (ITS 1)

Les produits de PCR ont été ensuite purifiés avec le système de billes magnétiques Agencourt AMPure XP beads (Beckman-Coulter), selon les recommandations du fabricant. Cette purification permet de retenir les amplicons d'au moins 100 bp.

Les amplicons purifiés sont fragmentés pendant 20 minutes, en utilisant le kit Ion Shear Plus Fragment Library (LifeTechnologies) selon les recommandations du fabricant. Ces amplicons ont été indexés d'un code à barre (Ion Xpress™ Barcode Adapter), du fait du multiplexage des échantillons, et d'adaptateurs A et P1 (étape de ligation -schématisée

en figure 26). Lors de l'étape de PCR émulsion, qui précède le séquençage, les amplicons sont « capturés » par les billes Ion Sphere particles présentant à leur surface des amorces complémentaires aux adaptateurs P1.



FIGURE 26 : ETAPE DE LIGATION (PRODUITS DE PCR-BILLES MAGNETIQUES, LIFE TECHNOLOGIES)

Séquençage ITS, classification et analyse

Séquençage

La concentration des amplicons modifiés (Code-barres et adaptateurs) est égalisée à 100 pM (Ion Library Equalizer kit). Les échantillons sont mélangés et dilués à 26 pM. Les amplicons se fixent à la surface des billes Ion Sphere particles (Ion PGM template OT2 200bp kit v2) et sont réamplifiés de façon clonale pendant l'étape de PCR émulsion (interface eau-huile). La qualité des amplicons a été vérifiée en utilisant le kit Ion Sphere™ Quality Control (catalogue n° 4468656) par une technique fluorimétrique (Qubit 2.0). Le séquençage des amplicons a été réalisé sur le système Ion Torrent Personnel Genome Machine (PGM) en utilisant le kit Ion Sequencing 200 kit v2 (150 cycles, puce 318) selon les recommandations du fabricant.

Classification

Le demultiplexage et la classification ont été réalisés sur le logiciel Qiime v1.6 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Les séquences ont été « nettoyées » (pour enlever les nucléotides correspondant aux adaptateurs, codes-barres et amorces) et purifiées (séquences inférieures à 100 bp, avec un score de qualité Phred inférieur à 25). Les séquences avec 97 % de similarité ont été regroupées dans un même cluster d'OTU

(Uclust algorithm), puis « raréfiées ». La classification taxonomique au rang de l'espèce fongique et bactérienne a été réalisée en utilisant la banque de données UNITE 5.8S et GreenGenes respectivement.

Analyse

L'abondance des différents taxons a été importée dans le logiciel Partek Discover Suite v 6.11, pour générer l'analyse en composantes principales (PCA), permettant d'évaluer la β -diversité. Les tests d' α -diversité (richesse taxonomique) et de corrélation (Pearson) et les tests non paramétriques (Kruskal-Wallis) de l'analyse de la variance (ANOVA) ont été réalisés avec le logiciel R (module *vegan*). Une valeur $p < 0.05$ a été considérée comme significative pour l'interprétation des tests statistiques. Un seuil à 1% a été retenu pour l'analyse de l'abondance des OTU (séquences bactériennes/fongiques).

Modèle de Biofilm

Le microbiote intestinal résident est organisé sous la forme d'un biofilm complexe, en interaction avec l'hôte. Pour valider les résultats générés par l'analyse métagénomique, nous avons mis au point *in vitro* un biofilm formé par *Candida tropicalis*, *Serratia marcescens* et *Escherichia coli* modélisant les interactions microbiennes pouvant intervenir au cours de la maladie de Crohn. Les aspects expérimentaux du biofilm sont détaillés dans ce protocole (Chandra, Mukherjee, and Ghannoum 2008).

Souches utilisées

Les souches bactériennes et fongiques ont été isolées de selles de patients MC (*C. tropicalis*, *S. marcescens* et *E. coli*). La culture de *C. tropicalis* a été réalisée sur milieu Yeast Nitrogen Base (YNB ; Difco Laboratories, Detroit, Michigan), supplémentées avec 50 mM de glucose. La culture bactérienne a été réalisée en bouillon trypticase soja (TSB, MP Biomedicals, Ohio).

Formation du biofilm

Le biofilm fongique et bactérien a été réalisé en triplicata, sur un modèle développé initialement pour l'étude du biofilm fongique sur les cathéters (matériau : élastomère de silicone). La suspension microbienne est mise en contact avec le cathéter (Cardiovascular Instrument Corp, Wakefield, Mass), et incubée dans du sérum fœtal bovin dans une plaque 12 puits pendant 24 h à 37°C en agitation. Le lavage de la plaque est réalisé avec du phosphate buffered saline (PBS).

Microscopie confocale

La mesure de l'épaisseur du biofilm est réalisée par microscopie confocale. Le biofilm développé sur les disques d'élastomère de silicone est transféré dans une nouvelle plaque 12 puits et incubée pendant 45 minutes à 37°C dans 4 ml de PBS contenant des colorants fluorescents FUN -1 (10 mM), et le conjugué concanavalin A-Alexa Fluor 488 (ConA, 25mg/ml). FUN-1 (longueur d'onde d'excitation 543 nm, émission 560 nm) est convertie en coloration orange rouge par les cellules métaboliquement actives, alors que ConA (excitation 488 nm, émission 505 nm) se fixe aux résidus glucosés et mannosylés (fluorescence verte).

Après incubation avec les colorants, les disques d'élastomère de silicone sont transférées dans des boîtes de Pétri (diamètre 35mm, MatTek Corp., Ashland, Mass.). Les biofilms sont observés en microscopie confocale avec un microscope Zeiss LSM510 équipé de lasers Argon, et HeNe. La structure du biofilm (épaisseur) est déterminée par reconstruction 3D (figure 27).

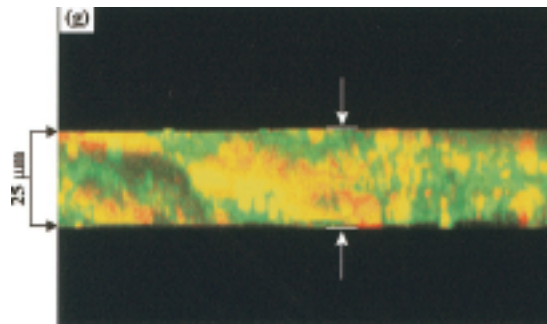


FIGURE 27: DÉTERMINATION DE L'ÉPAISSEUR DU BIOFILM PAR MICROSCOPIE CONFOCALE (CHANDRA, MUKHERJEE, AND GHANNOUM 2008)

Microscopie électronique

L'architecture du biofilm et des structures microbiennes a été visualisée par microscopie électronique à balayage (Swagelok Center for Surface Analysis of Materials, Case Western Reserve University) et par microscopie électronique à transmission (Electron Microscopy Core Facility, Case Western Reserve University).

Chapitre 5 : Résultats

Données clinico-épidémiologiques

Les caractéristiques démographiques des sujets sont détaillées ci-dessous, selon la classification de Montréal :

- Groupe CD : 20 patients atteints de maladie de Crohn (8 hommes, 12 femmes)
- Groupe NCDR: 28 sujets sains apparentés des 9 familles multiplexes (âge médian : 49 ans (24-76), 14 hommes, 14 femmes)
- Groupe NCDU : 21 sujets sains issus de 4 familles contrôle (âge médian : 41 ans (21-76), 8 hommes, 13 femmes)

| | | |
|------------------------------|---------------------|---------------|
| Nombre familles | | 9 |
| Sujets Crohn | | 20 |
| Age médian (min-max; ans) | Diagnostic | 28.83 (17-63) |
| | Début étude | 44.45 (29-79) |
| Sexe | Homme | 8 |
| | Femme | 12 |
| Age | A1 (<=16 ans) | 0 |
| | A2 (17-40 ans) | 8 |
| | A3 (>= 40 ans) | 12 |
| Localisation | L1 (Iléon terminal) | 11 |
| | L2 (Colon) | 2 |
| | L3 (Ileum-Colon) | 6 |
| | L4 (Loc haute) | 0 |
| Comportement | B1 (Non sténosante) | 3 |
| | B2 (Sténosante) | 4 |
| | B3 (Fistule) | 12 |
| Activité maladie | Active | 3 |
| | Rémission | 8 |

TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE DE CROHN

Culture mycologique

8 patients (40%), 12 parents sains (42%), et 9 membres issus de familles contrôles (42%), avaient une culture coprologique positive. Les espèces retrouvées étaient *C. albicans* (n=19), *C. glabrata* (n=5), *C. tropicalis* (n=1), *C. norvegensis* (n=1), *C. parapsilosis* (n=1), *Geotrichum* sp. (n=1) et *S. cerevisiae* (n=1). *C. albicans* était l'espèce la plus souvent isolée des selles (70%). Nous avons relevé des discordances entre l'analyse métagénomique, et la culture mycologique.

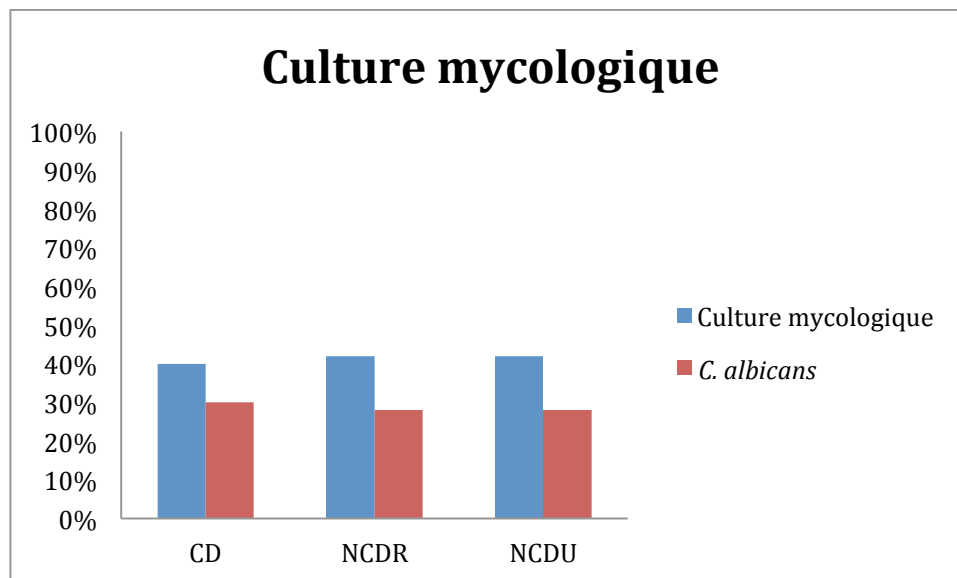


FIGURE 28 : CULTURE MYCOLOGIQUE (N= 29)

Corrélation ASCA et statut clinique

Les ASCA sont un marqueur diagnostique de la maladie de Crohn. Nous avons comparé le niveau d'ASCA dans les différents groupes (CD, NCDR, NCDU). Nos résultats montrent que le taux d'ASCA était significativement plus important dans le groupe Crohn (Figure 29, $p=0.001$). Le cutoff de positivité des ASCA était de 7.12 AU/ml. Par ailleurs, une corrélation entre le taux d'ASCA et l'abondance de *C. tropicalis* a été démontrée (cf. analyses de diversité).

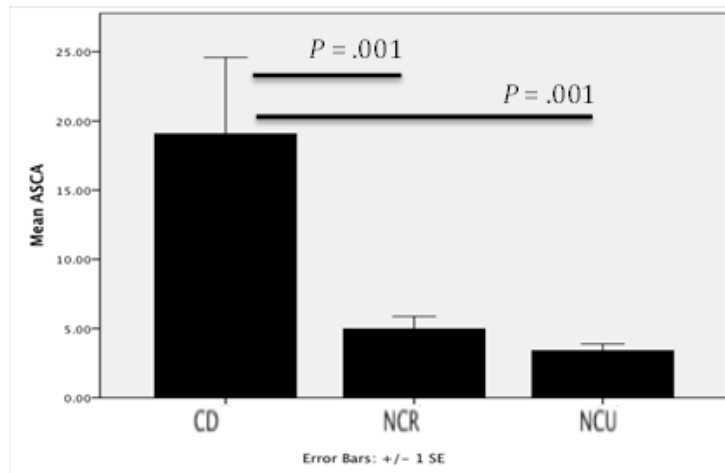


FIGURE 29: VALEUR MOYENNE DES ASCA ET STATUT CLINIQUE

Analyses de diversité

L'analyse en composantes principales représentée dans la figure 30 (β -diversité : diversité entre les individus) a montré que le microbiote bactérien (microbiome) et fongique (mycobiome) des individus appartenant aux familles multiplexes (CD, NCDR) était différent, de celui des membres issus des familles contrôle (NCDU).

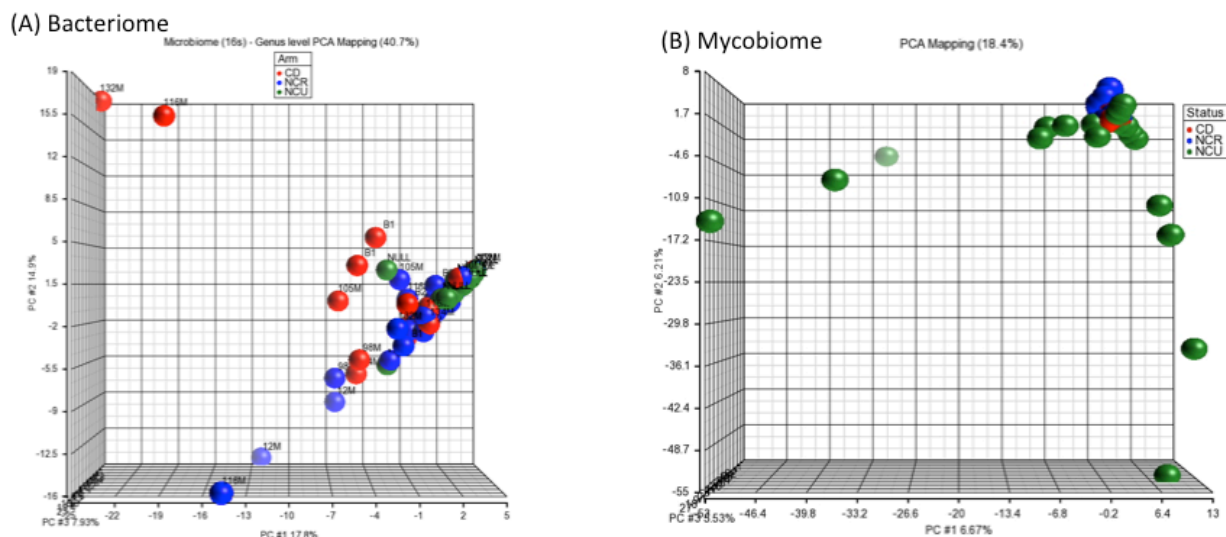


FIGURE 30: ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DU BACTERIOME ET DU MYCOBIOME (HOARAU ET AL. 2016)

De façon intéressante, on peut constater tout d'abord une dispersion des individus lors de l'analyse du répertoire bactérien (A). A l'inverse on peut observer des similitudes

dans la composition du répertoire fongique (B) pour les individus issus des familles multiplexes Crohn représentée par une agrégation des points CD et NCDR et une dispersion des sujets contrôle (NCDU).

Les analyses d' α - diversité (richesse taxonomique, diversité à l'échelle d'un individu) ont montré une augmentation de la diversité bactérienne et une réduction de la diversité fongique au sein des familles multiplexes Crohn (figure 31). Il n'y avait pas de différence significative entre les sujets malades (CD) et les sujets sains apparentés (NCDR), suggérant un répertoire bactérien/fongique commun.

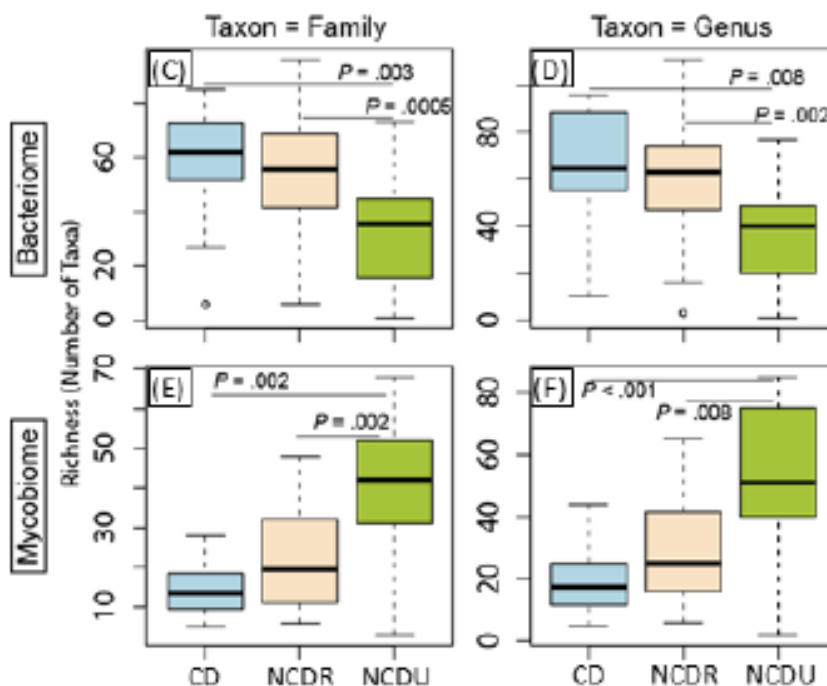


FIGURE 31: ANALYSES D' α - DIVERSITE POUR LE BACTERIOME ET LE MYCOBIOME (HOARAU ET AL. 2016)

Analyse d'abondance

Précédemment, l'analyse de la diversité a montré un répertoire microbien commun parmi les membres des familles multiplexes. Cette similitude peut s'expliquer par le fait que les membres d'une même famille partagent le même « patrimoine » génétique, environnemental et alimentaire. En effet 67% des représentants des 9 familles multiplexes habitent dans le même foyer. Notre analyse d'abondance s'est donc focalisée à comparer les microbiotes au sein des familles multiplexes Crohn entre les sujets malades (CD), et les sujets sains apparentés (NCDR), et de tester si une différence

statistique pourrait mettre en évidence des organismes potentiellement impliqués dans la dysbiose, et le déclenchement de la réponse inflammatoire digestive.

L'analyse d'abondance a mis en évidence la prédominance de deux phyla fongiques (Ascomycota, et Basidiomycota) et de quatre phyla bactériens (Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria et Bacteroidetes).

Concernant le règne bactérien, le phylum le plus représenté était celui des Firmicutes (68%), suivi par les Actinobacteria (12.6%-17.96%), les Proteobacteria (1.9-2.4%) et les Bacteroidetes (0.9-7.9%). Le taux des bactéries appartenant au phylum des Bacteroidetes était réduit chez les patients Crohn (p=0.001), ce qui est comparable au taux retrouvé dans des études précédentes sur le microbiote au cours de la maladie de Crohn (Frank et al. 2007). Au sein du phylum des Firmicutes, *Ruminococcus gnavus*, bactérie mucolytique, était l'espèce la plus représentée dans le groupe CD (p=0.02), et *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérie « anti-inflammatoire », était la bactérie la plus représentée dans le groupe NCDR. Une augmentation de pathobiontes, de la famille des *Enterobacteriaceae* (Figure 32) connus pour leur pathogénicité a été constatée dans le groupe CD (*Escherichia coli* p=0.004, *Serratia marcescens* p=0.045). Une diminution des symbiontes (bactéries dites bénéfiques) a été constatée dans le groupe CD (*F. prausnitzii* p=0.011). Ces analyses d'abondance sont reprises dans la figure 34 (page 84).

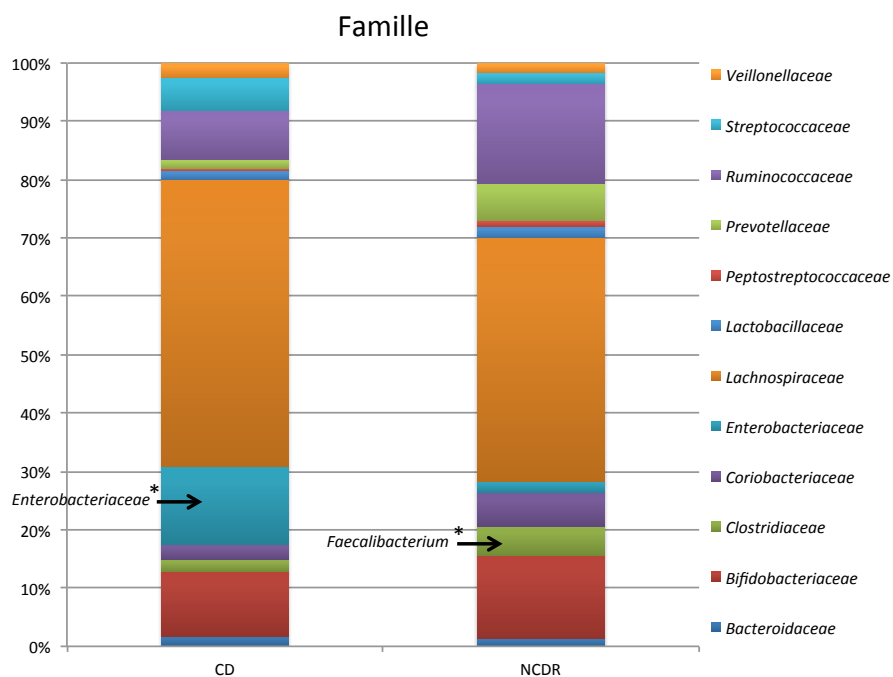


FIGURE 32: ECOLOGIE BACTÉRIENNE AU SEIN DES FAMILLES MULTIPLEXES

Concernant le règne fongique, le phylum le plus représenté était celui des Ascomycota (74%) et celui des Basidiomycota. Il est intéressant de constater qu'il existe jusqu'à 20% de séquences « non identifiables » au rang du phylum, témoignant de la non exhaustivité des banques de données mycologiques. La figure 33 montre l'écologie fongique au sein des familles multiplexes. Les genres *Saccharomyces*, *Galactomyces* et *Candida* étaient les plus représentés (figure 33). *Saccharomyces cerevisiae* (24%) et *Candida tropicalis* (10%) étaient les espèces fongiques les plus représentées dans le groupe CD, alors que *S. cerevisiae* (27%) et *Galactomyces geotrichum* (8%) étaient les plus représentées dans le groupe NCDR. La levure *S. cerevisiae* était plus représentée dans le groupe NCDR, sans lien statistique ($p=0.691$). En revanche, la levure *C. tropicalis* était significativement beaucoup plus représentée dans le groupe CD ($p=0.003$). Aucune association statistique n'a été retrouvée pour les autres espèces du genre *Candida* (figure 33).

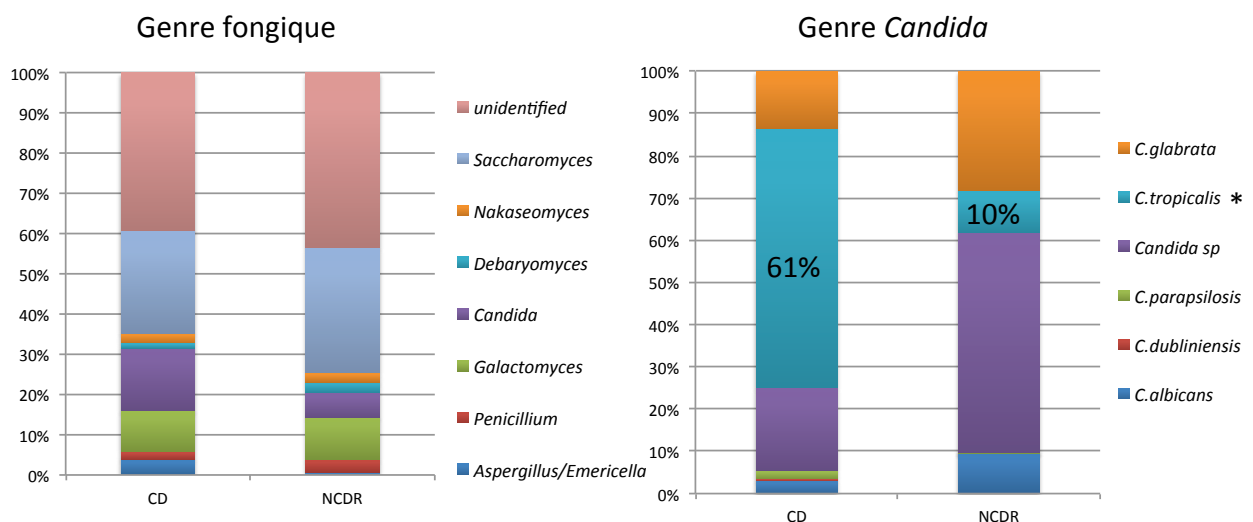


FIGURE 33: ECOLOGIE FONGIQUE AU SEIN DES FAMILLES MULTIPLEXES

De plus, nous avons mis en évidence une corrélation entre l'abondance de *C. tropicalis* et le taux d'ASCA, marqueur sérologique de la maladie de Crohn ($p=0.001$; Coefficient de Pearson =0.522), ce qui souligne la perte de tolérance possible vis-à-vis de ces ascomycètes chez les sujets CD. Nous n'avons pas mis en évidence d'autres associations statistiques en lien avec *C. tropicalis*, en particulier pas d'associations à des marqueurs cliniques (sévérité de la maladie, localisation, âge, sexe).

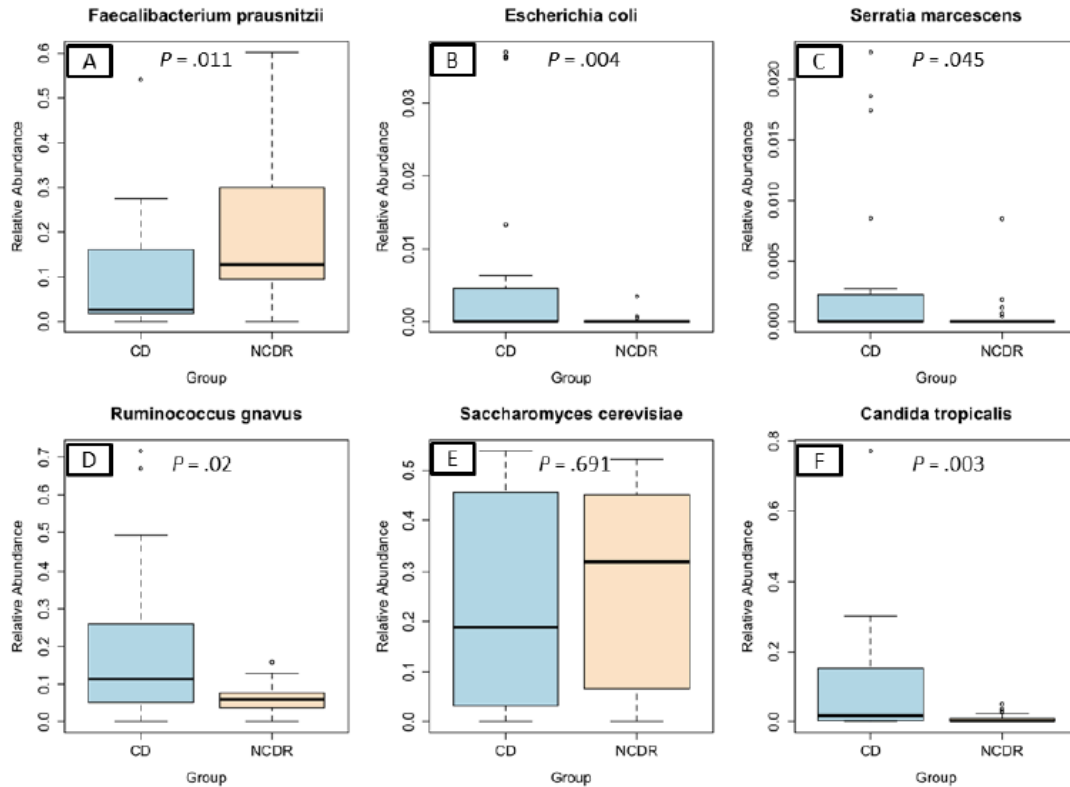


FIGURE 34: ABONDANCE RELATIVE DES ESPECES BACTERIENNES ET FONGIQUES (HOARAU ET AL. 2016)

Ces résultats suggèrent une augmentation des espèces bactériennes et fongiques pathogènes opportunistes (pathobiontes) et une diminution des espèces dites bénéfiques (symbiontes) dans le groupe CD (Figure 34).

Analyses de corrélation

Les analyses de corrélation (Pearson) ont mis en évidence des interactions significatives (positives ou négatives) parmi les constituants de la flore fécale, de type bactéries-bactéries, mycètes-mycètes, ou bactéries-mycètes au sein des familles multiplexes Crohn.

La figure 35 montre les interactions bactéries-bactéries et la figure 36 les interactions mycètes-mycètes, estimées dans les groupes CD et NCDR. Les cercles rouges représentent des interactions positives (+1, synergie) et les cercles bleus des interactions négatives (-1, antibiose). Le diamètre des cercles est proportionnel à l'intensité de la corrélation (de 0 à 1).

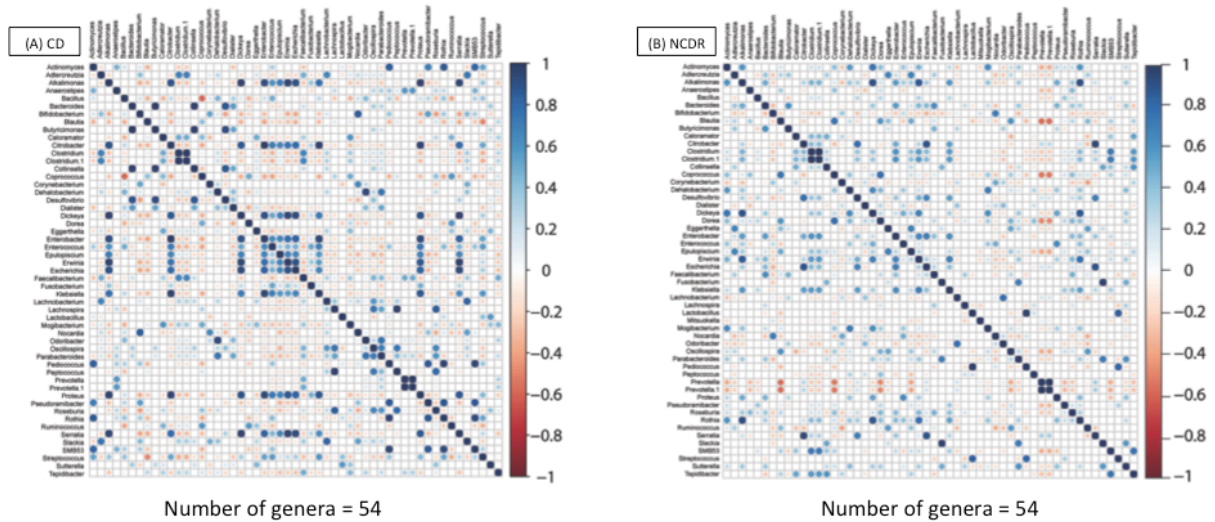


FIGURE 35: INTERACTIONS AU SEIN DU BACTERIOME (HOARAU ET AL. 2016)

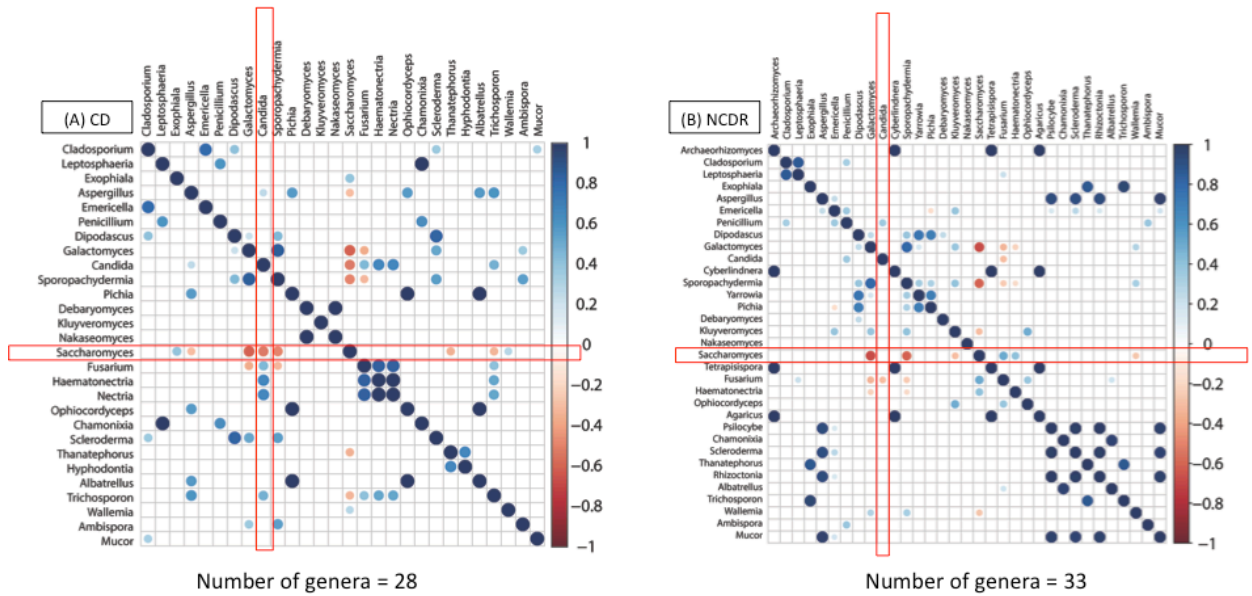


FIGURE 36: INTERACTIONS AU SEIN DU MYCOBIOME (HOARAU ET AL. 2016)

Les principaux résultats de ces interactions sont résumés ci-dessous.

Interaction mycète-mycète

Nous avons mis en évidence dans le groupe CD (Figure 36) des interactions entre les levures du genre *Candida* et les autres genres fongiques de la flore fécale (méthode de corrélation de Pearson). Il existe :

- une synergie entre *Candida* et :
 - *Fusarium, Hematonectria, Nectria, Thanatephorus* et *Trichosporon*
- Une antibiose (antagonisme) entre *Candida* et *Saccharomyces*, confirmant les résultats des analyses d'abondance de la flore fongique. Nous n'avons pas identifié cet antagonisme, dans le groupe NCDR.

Interaction mycète-bactérie

Les interactions positives significatives entre mycètes et bactéries (analyse au niveau du genre) sont reprises dans le tableau 4.

| Genre bactérien | Genre fongique | Corrélation de Pearson | P-value |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------|
| <i>Faecalibacterium</i> | <i>Kluyveromyces</i> | 0.520 | 0.019 |
| <i>Prevotella</i> | <i>Kluyveromyces</i> | 0.980 | < .001 |
| <i>Oscillospira</i> | <i>Pichia</i> | 0.724 | < .002 |
| <i>Oscillospira</i> | <i>Ophiocordyceps</i> | 0.717 | < .003 |
| <i>Oscillospira</i> | <i>Albatrellus</i> | 0.717 | < .004 |
| <i>Proteus</i> | <i>Candida</i> | 0.709 | < .005 |

TABLEAU 4: PRINCIPALES INTERACTIONS ENTRE MYCETES ET BACTERIES INTESTINALES

L'analyse au niveau de l'espèce a mis en évidence dans le groupe CD 13 interactions significatives entre *C. tropicalis* et bacilles à gram négatif, en particulier des entérobactéries (phylum des Proteobacteria). Les deux interactions les plus notables concernent *Escherichia coli*, et *Serratia marcescens*. Ces synergies sont cohérentes avec l'analyse d'abondance, qui retrouvait une augmentation de ces deux pathobiontes dans le groupe CD.

Analyse du biofilm

Nous avons identifié dans le groupe CD des interactions entre *C. tropicalis* et les entérobactéries (*E. coli*, *S. marcescens*). Pour modéliser ces interactions, nous avons mis au point un modèle de biofilm impliquant ces 3 pathobiontes.

Nous avons suggéré que la présence simultanée de *C. tropicalis*, d'*E. coli* et de *S. marcescens* augmentait l'épaisseur du biofilm de façon significative ($p < 0.0001$), comparativement aux modèles impliquant une ou deux espèces (Figure 37).

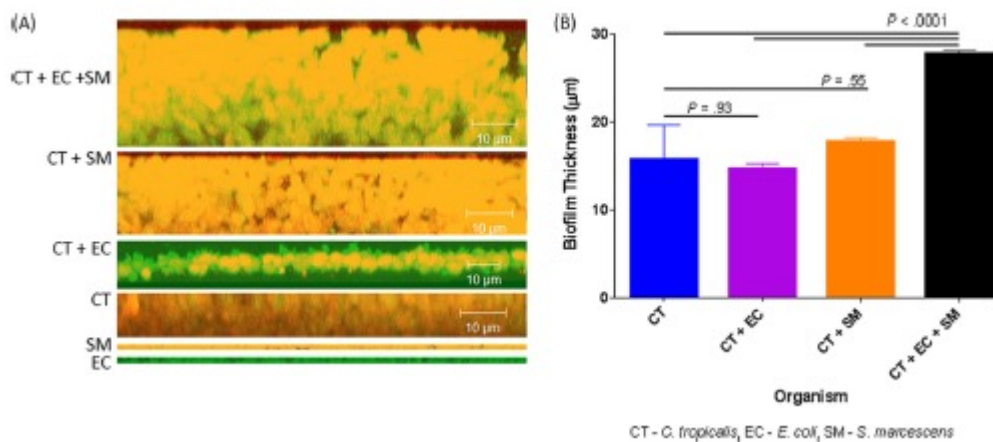
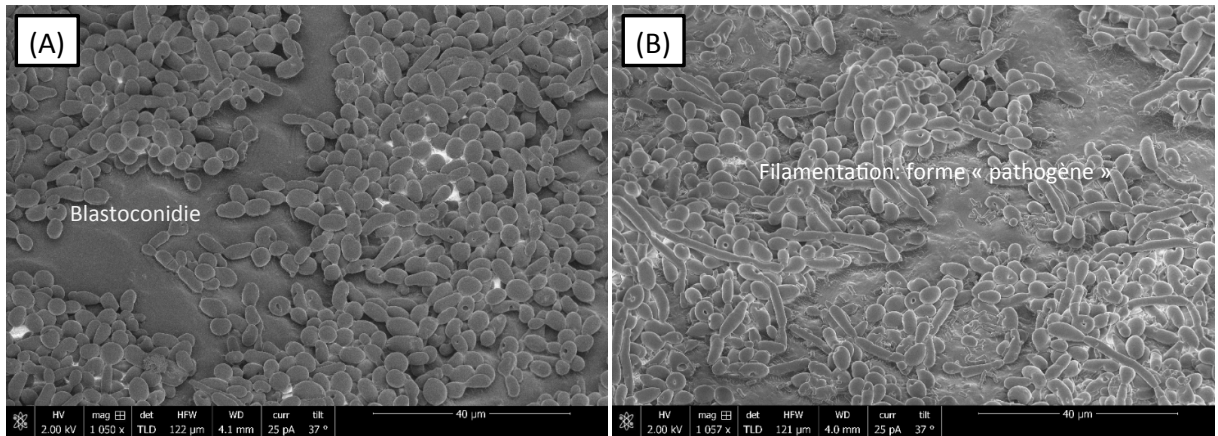


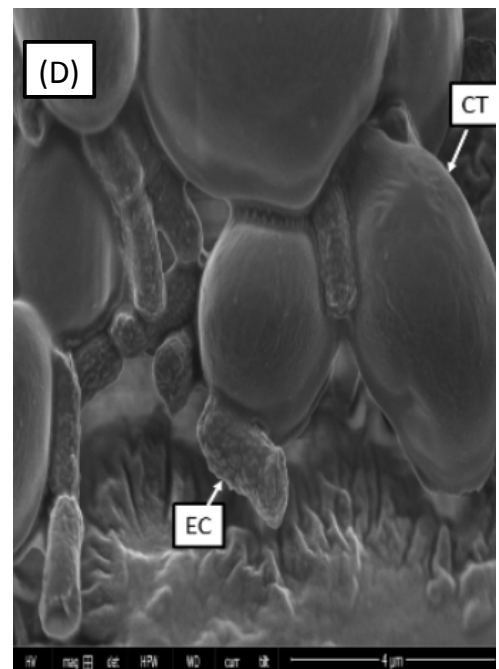
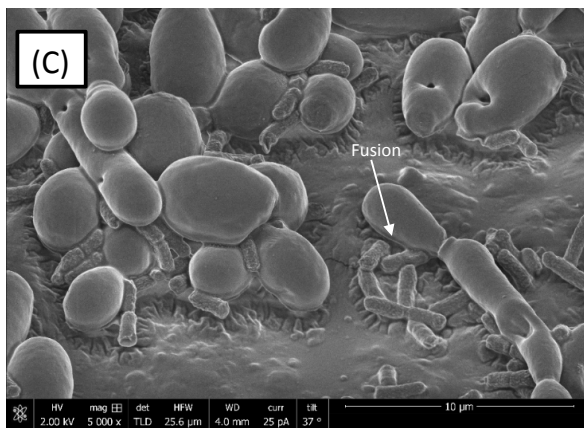
FIGURE 37: EPAISSEUR DU BIOFILM (HOARAU ET AL. 2016)

L'analyse en microscopie électronique (Figure 38) à balayage du biofilm a montré qu'isolément *C. tropicalis* se présentait sous la forme blastoconidie (Figure 38 A), alors qu'en présence des entérobactéries la levure se présentait sous forme mycélienne (Figure 38 B). L'observation de la filamentation, que l'on retrouve fréquemment dans le processus pathogénique de la candidose invasive, suggère le caractère pathologique de ces interactions. De plus l'analyse en microscopie électronique à transmission (Figure 39) a permis d'identifier plus précisément les interactions et coopérations entre la levure, et les entérobactéries. Nous avons observé une fusion membranaire entre *C. tropicalis* et *E. coli* (Figure 38D, et 39A) et la production de fimbriae (diamètre : 3-18nm ; longueur : 34-480 nm) par *S. marcescens* (Figure 39 D), potentiellement impliqués dans l'adhésion et la formation du biofilm. La présence de ces fimbriae permettrait de faire un pont entre *E. coli* et *C. tropicalis*, stabilisant ainsi la structure du biofilm.



C. tropicalis

C. tropicalis + bactéries



Fusion entre *E. coli* et *C. tropicalis*

FIGURE 38: MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DU BIOFILM (HOARAU ET AL. 2016)

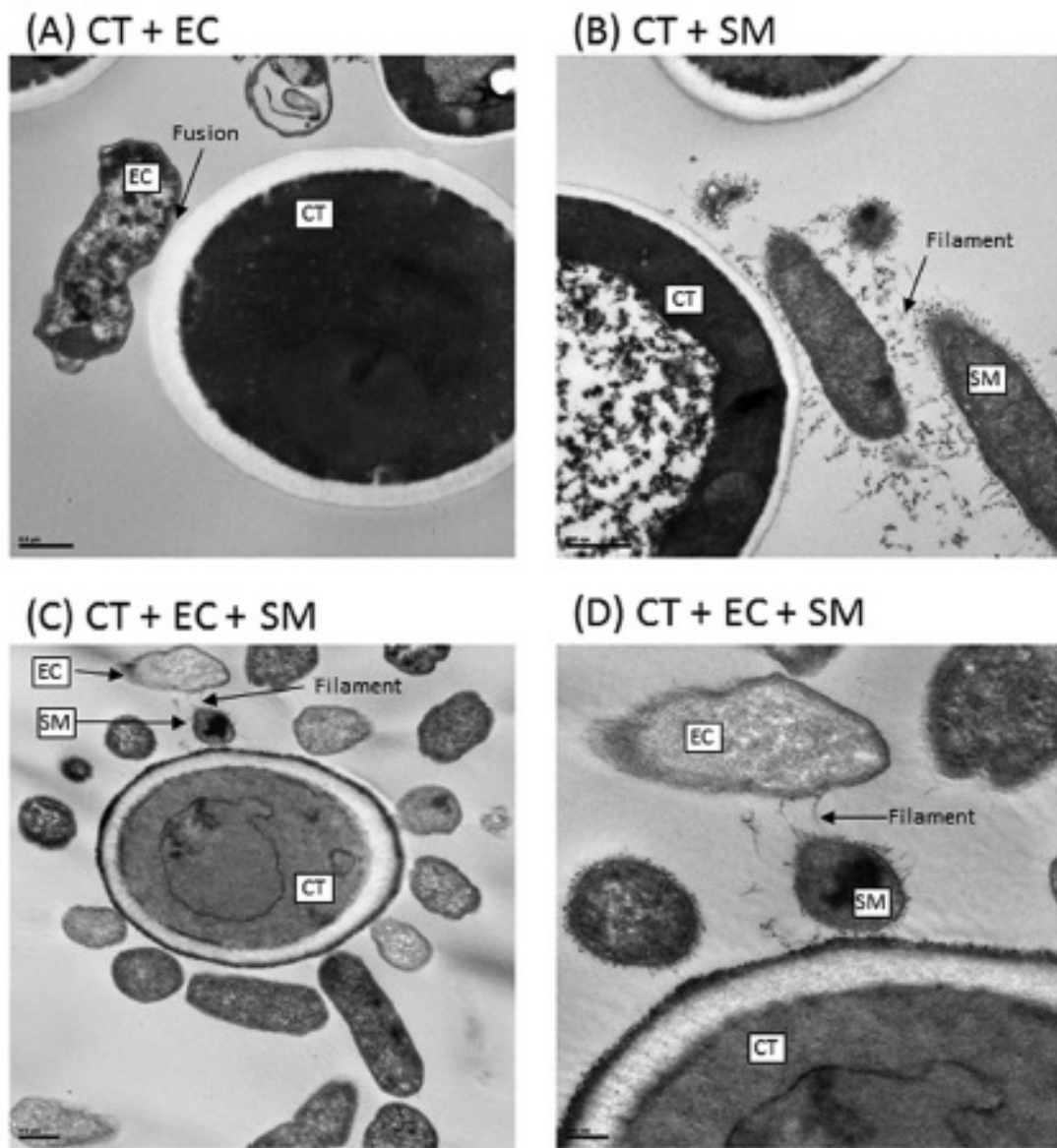


FIGURE 39: MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION DU BIOFILM (HOARAU ET AL. 2016)

Chapitre 6 : Discussion et perspectives

Synthèse

Notre étude a mis en évidence un microbiote altéré dans une cohorte de patients atteints de forme familiale de MC, en utilisant une technologie innovante de séquençage à haut débit. Au cours de la maladie, il existe globalement dans notre cohorte une augmentation de la diversité bactérienne qui s'oppose à une réduction de la flore fongique. Quantitativement, le microbiote des patients MC était enrichi en entérobactéries (*E. coli*, et *S. marcescens*) et levures du genre *Candida* (*C. tropicalis*). Nous avons également montré qu'il existe une coopération forte entre les membres du microbiote intestinal, pouvant favoriser l'aggravation de la réponse inflammatoire. Ces interactions ont été modélisées par une approche expérimentale basée sur la formation d'un biofilm multi-espèces.

Implication de *Candida tropicalis*

Dans notre étude, la levure *C. tropicalis* était statistiquement plus retrouvée chez les patients atteints de MC. De plus cette augmentation était significativement corrélée à la présence d'anticorps anti- *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), suggérant la perte de tolérance vis à vis de la flore commensale fongique du tube digestif chez des hôtes susceptibles. L'étude d'Iliev avait également montré l'augmentation du taux de *C. tropicalis*, constituant 65% du mycobiome total dans un modèle de colite chimioinduite, chez des souris déficientes en dectin-1 (Iliev et al. 2012). L'inflammation intestinale provoquée par la flore fongique chez ces souris immunopermissives s'accompagnait d'une réponse sérologique ASCA.

La biologie de *C. tropicalis* et ses facteurs de virulence :

La biologie de *C. tropicalis* est bien connue et cette levure peut être considérée comme un opportuniste pathogène (Chai, Denning, and Warn 2010). Il s'agit d'un saprophyte non obligatoire du tube digestif de l'homme, colonisant jusqu'à 30% des

sujets sains, pouvant être responsable de candidoses invasives, en particulier chez le patient neutropénique (Muñoz et al. 2011, Kontoyiannis et al. 2001). C'est une levure polymorphe, existant sous forme blastoconidie et sous forme de pseudomycélium. Dans de rares cas *C. tropicalis* peut former un mycélium vrai et filamenter au même titre que *C. albicans*, lui donnant un caractère de pathogénicité et de virulence (Suzuki, Miyamae, and Ishida 1991). La filamentation chez *C. tropicalis* est sous le contrôle d'un facteur de transcription *WOR1*, intervenant également dans le switch phénotypique « white/opaque » (Porman et al. 2013). Dans notre étude, notre modèle de biofilm a montré que les interactions avec les entérobactéries favorisaient le passage vers une forme mycélienne de *C. tropicalis*, potentiellement impliquée dans un processus invasif tissulaire. Il est possible que ces entérobactéries puissent influencer ce switch phénotypique, et les interactions moléculaires à l'origine de la filamentation de *C. tropicalis* nécessitent d'être approfondies.

Par ailleurs, ces deux espèces appartiennent à un cluster génétique connu sous le nom de « CTG clade » (traduction d'un codon CTG en sérine au lieu de la leucine) (Turner and Butler 2014). La virulence accrue de ce cluster de levures opportunistes est associée à une augmentation de l'expression des gènes codant pour la paroi fongique, en particulier les structures mannosylées (Okawa and Goto 2006). D'autres facteurs de virulence ont été décrits, impliqués dans l'adhésion cellulaire (Secreted aspartic proteases, SAP), l'invasion tissulaire (phospholipases) et la formation du biofilm. Dans le contexte de candidose invasive, *C. tropicalis* secrète des SAP (Chai, Denning, and Warn 2010). Cette activité enzymatique SAP est primordiale pour l'adhérence aux cellules cibles (Kontoyiannis et al. 2001), les souches de *C. tropicalis* déficientes en SAP perdant leurs propriétés d'adhérence. Une nouvelle protéinase, la tropiase, a été isolée chez *C. tropicalis*, présentant des propriétés hémorragiques tissulaires et pouvant provoquer une augmentation de la perméabilité capillaire (Okumura, Inoue, and Nikai 2007). Ces données n'ont pas été confirmées dans des modèles animaux de colites chimio induites pour l'instant. Par ailleurs, il est intéressant de constater que les deux pathogènes *C. albicans* et *C. tropicalis* sont les seules levures présentant des phospholipomannanes dans leur paroi (Cantelli et al. 1995). Ces glycolipides, présents quasi-exclusivement dans la paroi des cellules eucaryotes, pourraient jouer un rôle dans l'initiation de la réponse inflammatoire intestinale au cours de la MC (Lewis et al. 2015).

Réponse immunitaire et *C. tropicalis* :

D'un point de vue immunologique, la reconnaissance de *C. tropicalis* et de *C. albicans* dans un modèle murin se ferait au niveau des plaques de Peyer par des cellules dendritiques spécialisées présentant des récepteurs lectiniques, de type langérine (De Jesus et al. 2015). La persistance de ces levures dans les plaques de Peyer jouerait un rôle important dans la tolérance et l'activation de la réponse immunitaire. Cependant, il semblerait que *C. tropicalis* induise une immunité innée anti-muqueuse, passant principalement par l'axe Dectin-CARD9. Contrairement à *C. albicans*, *C. tropicalis* n'induirait pas de réponse Th17, primordiale dans la réponse immunitaire muqueuse anti-fongique. Dans un modèle de candidose invasive, l'infection à *C. tropicalis* est aggravée chez des souris déficientes en CARD9, sans induire d'activation de l'axe Th17 (Whibley et al. 2015). On sait que dans la MC il y aurait un lien très fort entre l'axe Th17 et le contrôle de la colonisation intestinale par *C. albicans*. En effet, un nouvel anticorps monoclonal anti-IL-17, développé pour le traitement de la MC à visée anti-inflammatoire, s'est avéré capable de promouvoir la colonisation fongique intestinale (Colombel et al. 2013). L'ensemble de ces données suggère une réponse immunitaire anti-levures distincte en présence de *C. tropicalis*, n'impliquant pas la voie Th17. Toutes ces observations soulignent donc l'importance de cette levure dans la physiopathologie de la MC, mais son rôle dans le déclenchement de la réaction inflammatoire intestinale au cours de la maladie est encore incertain.

Equilibre entre symbiotes et pathobiontes

La dysbiose :

Nos résultats soulignent la dysbiose entre d'une part l'augmentation de pathogènes opportunistes (Entérobactéries de type AIEC, *Candida*) et d'autre part la diminution de la flore commensale bénéfique (*F. prausnitzii*, *S. cerevisiae*). Nous avons confirmé chez les patients MC une diminution du taux de *F. prausnitzii*, bactérie essentielle dans l'homéostasie intestinale du fait de ses propriétés anti-inflammatoires en favorisant la dégradation des fibres alimentaires, en acides gras à chaîne courte de type butyrate. En outre, il semblerait exister des interactions statistiquement significatives entre les

différents constituants du microbiome. En particulier, nous avons mis en évidence dans le groupe des patients MC une antibiose entre *Saccharomyces* et *Candida* et une synergie entre entérobactéries et *C. tropicalis*, suggérant un déséquilibre entre opportunistes « pathogènes » et la flore commensale « bénéfique ».

Les interactions microbiennes synergiques :

Les synergies *C. tropicalis-E. coli*, et *C. tropicalis-S. marcescens* révélées par l'analyse statistique nécessitent d'être confirmées en utilisant des modèles expérimentaux de colite chimio-induite, de modèles invalidés pour certains gènes de l'immunité décrits dans la MC et en co-culture, afin d'explorer l'existence d'un mécanisme de « quorum sensing » entre ces bactéries et levures. Il existe toutefois des preuves que le lipopolysaccharide bactérien des entérobactéries (*Serratia*) puisse stimuler *in vitro* la croissance du biofilm de *C. tropicalis* (Bandara et al. 2010). La documentation à l'échelle moléculaire de ces observations n'a pas encore été démontrée. Cependant, nos résultats montrent *-in vitro-* que *C. tropicalis*, *E. coli* et *S. marcescens* coopèrent pour former un biofilm épais (Hoarau et al. 2016). Des données préliminaires de notre groupe montrent que le niveau de sécrétion de TNF- α est augmenté dans un modèle cellulaire (Cellules intestinales CACO-2) en présence de ces trois pathobiontes (données non publiées).

Le rôle des bactéries du genre *Bacteroides*

Nous avons également mis en évidence une diminution du taux du phylum Bacteroidetes chez les patients MC. Cependant, il ne nous a pas été possible de confirmer les interactions significatives entre *Candida* et *Bacteroides*, comme cela a été suggéré dans la littérature (Fan et al. 2015, Cuskin et al. 2015). Au cours de la maladie, il y a une baisse significative du taux du genre *Bacteroides* (Frank et al. 2007), non retrouvé dans notre étude. Or chez le sujet sain la flore bactérienne anaérobie, constituée de *Bacteroides sp*, contrôle la colonisation intestinale à *C. albicans* (Fan et al. 2015) en stimulant la sécrétion de peptides antimicrobiens (LL-37) et la synthèse d'un facteur de transcription (HIF-1- α). De plus, certaines espèces de *Bacteroides* comme *B. thetaiotaomicron*, possédant une activité enzymatique α -mannanase, utilisent les

mannanes des levures du tube digestif comme source carbonée dans leur métabolisme, montrant les relations fortes entre flore commensale anaérobie et levures (Cuskin et al. 2015). Ces mêmes auteurs proposent une théorie intéressante, faisant intervenir la dégradation des mannanes dans l'homéostasie intestinale. On sait que chez certains patients MC, il y a une réponse sérologique accrue (ASCA) vis à vis du mannane de *C. albicans*. L'épitope Man α 1-3Man reconnu par les ASCA pourrait inhiber la phagocytose des bactéries pathogènes par les macrophages (Mpofu et al. 2007), et en particulier permettrait la meilleure survie des entérobactéries *E. coli* AIEC en diminuant le burst oxydatif. En plus de l'activité du catabolisme des mannanes, *B. thetaiotaomicron* posséderait une endo α -1,2 mannosidase pouvant dégrader l'épitope reconnu par les ASCA. Au cours de la dysbiose intestinale constatée au cours de la maladie, on observerait notamment la diminution du taux de *Bacteroides*. Ainsi cette baisse pourrait affecter le catabolisme des mannanes des levures du tube digestif par ces bactéries. De plus la dégradation des ASCA (marqueur sérologique de la MC) serait diminuée et pourrait favoriser la prolifération des entérobactéries AIEC, participant à l'aggravation de la maladie.

Modèle murin de dysbiose :

L'équilibre entre symbiontes et pathobiontes a pu être étudié récemment dans un modèle murin, et confirme nos résultats. Hoffmann et al. ont pu démontrer le potentiel pro-inflammatoire de pathogènes digestifs (entérobactéries AIEC LF82 et *C. albicans*), et l'action anti-inflammatoire de *S. boulardii* (Hoffmann et al. 2016) chez des souris gnotobiotiques (sans flore digestive). En effet, dans cette étude, l'implantation d'*E. coli* LF82 provoque la synthèse d'interféron γ et d'indoleamine 2,3 dioxygénase 1, impliquée dans la réponse immunitaire immunomodulatrice (Lymphocytes T-reg). Cette bactérie délétère pourrait utiliser cette voie métabolique pour induire sa propre tolérance et conquérir une niche écologique. Dans cette même étude, *C. albicans* était associé à un profil pro-inflammatoire (taux augmentés d'IFN γ , IL-17, IL-22), et *S. boulardii* à un profil anti-inflammatoire (taux diminués IFN γ , IL-17). Sokol a également démontré que *S. cerevisiae* pouvait induire la sécrétion d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) par les cellules dendritiques (Sokol et al. 2016).

L'interaction négative entre *S. cerevisiae* et certaines levures commensales opportunistes comme *C. albicans* et *C. tropicalis* semble donc cohérente. En effet l'administration de *S. boulardii* diminue l'inflammation intestinale et la colonisation à *C. albicans* dans un modèle de colite chimio-induite (Jawhara and Poulain 2007). De plus *S. boulardii* inhibe la filamentation, l'adhésion et la formation de biofilm de *C. albicans* par la sécrétion d'acide caprique (Murzyn et al. 2010). Par ailleurs, dans un modèle murin de colite chimio-induite, *S. boulardii* pourrait inhiber l'angiogenèse dans l'inflammation intestinale et promouvoir la cicatrisation de la muqueuse digestive, via la signalisation de facteurs de croissance vasculaires VEGF (Chen et al. 2013). Ces données renforcent le rôle probiotique et anti-inflammatoire de *S. boulardii* dans les modèles murins de colite chimio-induite. Cependant, l'utilisation de *S. boulardii* dans la MC est décevante et ne prévient pas les rechutes de la maladie, chez les patients en rémission clinique (Bourreille et al. 2013).

Modèle physiopathologique de la maladie de Crohn

A la lumière de ces résultats, nous proposons un modèle physiopathologique impliquant la dysbiose et la formation d'un biofilm à la surface du mucus intestinal, schématisé dans la figure 40.

Chez le sujet sain (A) le niveau de synthèse du facteur de transcription NF- κ B est contrôlé par *S. cerevisiae* et *F. prausnitzii*, permettant de stabiliser le taux de cytokines pro-inflammatoires. Chez le patient MC (B), la sécrétion de ces cytokines est accrue sous l'influence de *C. tropicalis* (mannoprotéines du biofilm) et des LPS d'*E. coli* et de *S. marcescens*, conduisant à la destruction tissulaire. Par ailleurs, l'augmentation du taux de *Ruminococcus gnavus*, bactérie mucolytique, favorise la destruction du mucus intestinal protecteur. La diminution de sécrétion des peptides anti-microbiens (AMP : anti-microbial peptides) favorise et entretient le développement de ces entéropathogènes.

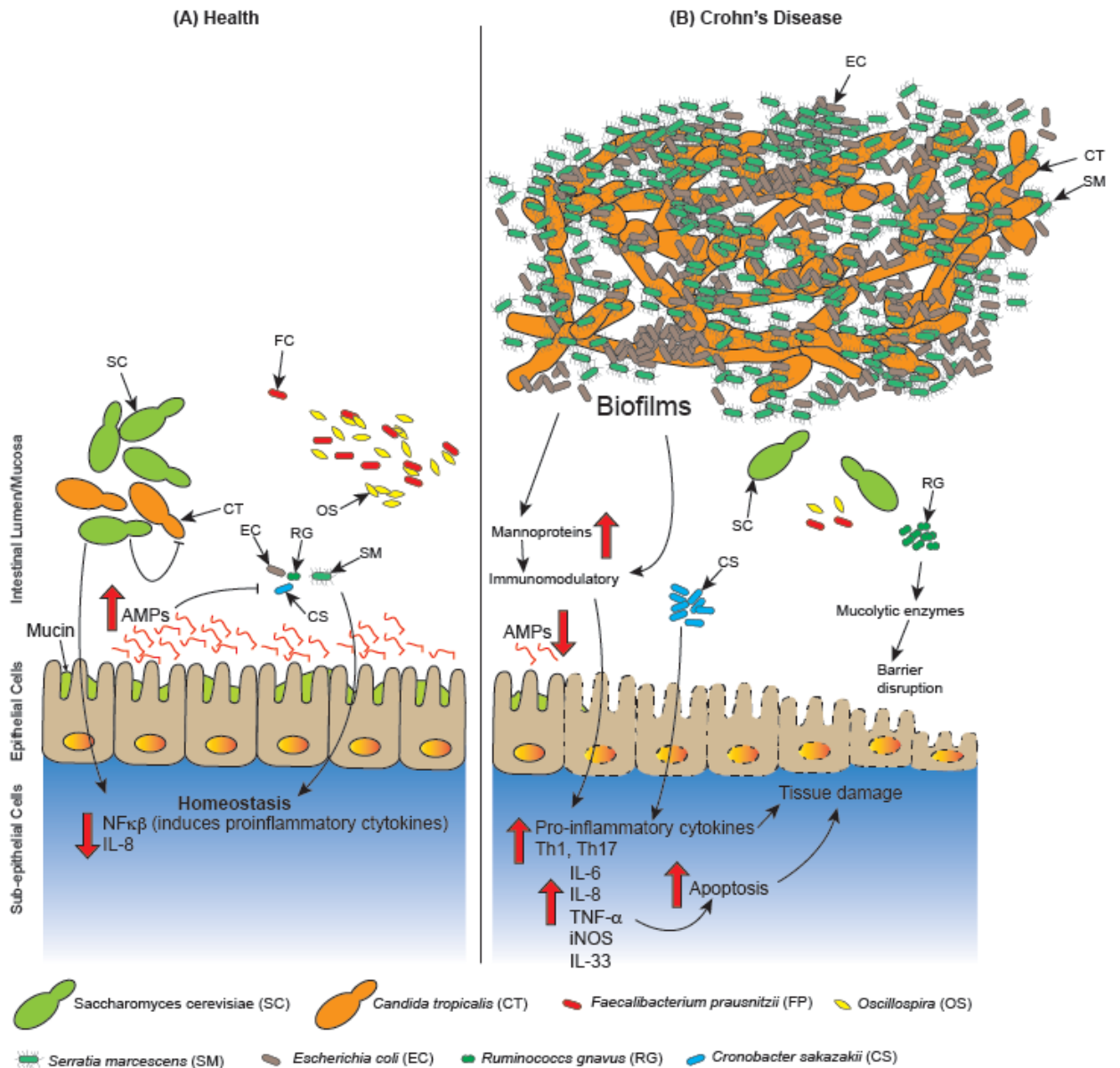


FIGURE 40: MODELE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE DYSBIOSE AU COURS DE LA MALADIE DE CROHN

Controverse

Etudes antérieures sur le mycobiome :

Une partie de nos résultats peut paraître contradictoire avec les études antérieures sur le microbiote fongique dans la MC. Ces différences sont probablement liées aux types d'approches moléculaires utilisées et aux types de patients étudiés. De façon générale, les premières études moléculaires sur la flore fongique au cours de la MC

montrent une augmentation de la diversité du mycobiome (Ott et al. 2008, Li et al. 2014). Notre étude, celle de Chehoud (Chehoud et al. 2015) et celle de Sokol (Sokol et al. 2016) montrent plutôt une réduction de la diversité fongique. De même, une étude murine de colite chimio induite au DSS confirme cette tendance. L'inflammation intestinale était associée à une diminution de la charge fongique dans les selles et une augmentation dans les tissus (Qiu et al. 2015). Cependant la méthodologie de ces études varie en fonction: (i) des amorces utilisées (18S/ ITS), (ii) des plateformes de séquençage (Sanger/Haut débit), (iii) des cohortes (pédiatrique/adulte, forme familiale/forme sporadique), (iv) de la localisation géographique de l'étude, (v) du matériel biologique utilisé (Biopsies intestinales/Selles) et (vi) du traitement préalable par antibiotiques ou anti inflammatoires. Tous ces facteurs de variations peuvent introduire de potentiels biais dans l'analyse.

Stabilité temporo-spatiale du mycobiome ?

Par ailleurs ces études ne reflètent qu'une vision ponctuelle de la composition du microbiote fécal, et la dynamique de colonisation n'y est pas étudiée. Il serait donc intéressant d'étudier cette cinétique au cours de l'évolution de la maladie. Même si l'on sait que la flore fongique est stable au cours du temps chez le sujet sain, on n'a aucune idée à l'heure actuelle de l'évolution du microbiote intestinal chez le patient MC à long terme (Scanlan and Marchesi 2008). A ce jour une seule étude (Lewis et al. 2015) a permis de définir de façon séquentielle le microbiote intestinal au cours de formes pédiatriques de MC, et a constaté des variations de la flore au cours d'interventions ciblées avec un impact significatif du régime alimentaire et des biothérapies anti-inflammatoires (anti-TNF- α). Il y a également peu de données sur l'influence de l'origine géographique et ethnique sur les variations du mycobiome au cours du processus inflammatoire de la MC. Une étude, sur le mycobiome oral chez le volontaire sain, a montré l'influence de l'origine ethnique sur la composition de la flore fongique (Ghannoum et al. 2010). Par ailleurs, Angebault et al. ont montré que les indiens Wayampi avaient un mycobiome fécal distinct des populations européennes, caractérisé par une flore appauvrie en *C. albicans* influencée par le régime alimentaire (Angebault et al. 2013). Notre cohorte est unique dans le recrutement, puisqu'il s'agit de formes familiales de MC. Cet aspect est intéressant, car il permet de prendre en compte l'aspect

« génétique » et « environnemental » de la maladie. Ces familles partagent pour la majorité d'entre elles un mode de vie similaire et elles sont exposées aux mêmes facteurs environnementaux (polluants atmosphériques, agents microbiens) notamment en raison de leur proximité géographique. Par ailleurs une étude préliminaire de notre cohorte sur certains gènes de susceptibilité à la MC (*NOD1*, *NOD2*, *TLR4*) n'a pas mis en évidence de modifications significatives du mycobiome chez les patients porteurs de la mutation (données non publiées). Cependant notre étude présente quelques biais dans le recrutement des patients. En effet, l'influence de traitements immunosuppresseurs, l'antibiothérapie et le régime alimentaire n'ont pas pu être pris en considération lors de l'analyse des données. Ces facteurs peuvent, au moins en partie, expliquer la difficulté de comparer les résultats du mycobiome intestinal au cours de la MC.

D'un point de vue clinique, nous n'avons pas mis en évidence de relations entre les phénotypes cliniques tels que définis dans la classification de Montréal (localisation de la maladie, activité de la maladie-en particulier la présence de formes sténosantes/fistulisantes, et l'âge au diagnostic) et la composition du mycobiome intestinal (données non publiées). Cependant, la localisation iléale ou colique des lésions pourrait avoir un impact sur la composition de la flore fongique. En effet on sait que la présence d'ASCA est associée aux formes intestinales proximales (grêle), les formes coliques étant plutôt séronégatives (Quinton et al. 1998). Les ASCA, corrélées dans notre étude à la présence de *C. tropicalis*, pourraient être un reflet de la perte de tolérance vis à vis des ascomycètes du tube digestif, ce qui suggère une différence potentielle dans la composition du mycobiome intestinal entre formes coliques pures et formes proximales grêliques. Ceci pose également problème au niveau des capacités de recrutement puisque les formes coliques sont plus rares et ne sont retrouvées que dans 30% des cas (Baumgart and Sandborn 2012). Cette proportion n'atteint que 10% dans notre étude.

Perspectives

Les perspectives de ce travail sont nombreuses:

Les résultats de cette étude méritent d'être confirmés de manière prospectives sur de larges cohortes de familles MC et reproduits dans des modèles animaux de colite

chimio-induite (DSS, TNBS) chez des souris génétiquement modifiées pour les gènes de susceptibilité aux infections fongiques tels que *DECTIN-1*, *CARD9* ou *NOD2*, en impliquant la flore commensale bénéfique (*S. cerevisiae*) et les pathogènes opportunistes (*C. tropicalis*, *C. glabrata* et entérobactéries de type AIEC).

Discordance entre la culture et la métagénomique :

Notre étude a permis de “pointer du doigt” le manque de concordances entre les résultats générés par les études métagénomiques et les résultats de la culture (données non publiées). Par exemple, l’analyse des séquences ont montré que *C. tropicalis* était beaucoup plus représentée chez les patients MC, alors que cette levure n’avait été isolée qu’une seule fois en culture sur l’ensemble des échantillons de selles. Une étude sur la composition du mycobiome chez le sujet sain, utilisant des techniques de culture et de séquençage, a déjà souligné ces différences (Scanlan and Marchesi 2008). En effet, dans cette étude, le séquençage a mis en évidence une flore composée de *Gloeotinia*, *Paecilomyces*, *Galactomyces* et *Candida*, alors que les techniques conventionnelles de culture montraient la présence de *C. parapsilosis* et de *C. albicans*. Ce constat n’est pas surprenant, puisque les méthodes conventionnelles ont été affinées au fil du temps pour permettre l’isolement des principales levures en pathologie humaine. Ces méthodes sont donc d’emblée moins discriminantes que le séquençage du fait de l’existence de nombreux champignons « non cultivables ». La flore fongique dominante, représentée par *Candida* sp, peut inhiber la culture des champignons de plus faible abondance. Les techniques de séquençage ne sont pas non plus dénuées de limites. Leurs approches peuvent introduire des biais notamment dans la sélection des cibles à amplifier (Bellemain et al. 2010). En effet, dans ce travail, certaines cibles fongiques comme l’ITS 1 peuvent faciliter l’amplification des basidiomycètes au « détriment » des ascomycètes. Une autre étude sur le mycobiome digestif chez les patients infectés par le virus de l’hépatite B a montré que l’isolement en culture d’espèces fongiques appartenant au genre *Candida* (*C. glabrata*, *C. krusei*) n’avait pas été confirmé avec les techniques de séquençage (Chen et al. 2011). Il convient donc de comparer les études métagénomiques et les études classiques de culture, en multipliant les milieux de culture et les conditions (pH, température...) comme cela avait été suggéré par le concept de culturomique (Lagier et al. 2012). Quelques travaux ont déjà été réalisés dans le champ du mycobiome

intestinal. Gouba et coll. ont comparé les deux techniques, en diversifiant les conditions de culture (Gouba and Drancourt 2015). Sept milieux de culture différents ont été utilisés : Sabouraud, dextrose, malt, pommes de terre, Czapek, Columbia et glycine-vancomycine- polymyxine B. Les auteurs ont mis en évidence 40 espèces fongiques par la culture, 188 taxons par le séquençage, 19 champignons étant communs aux deux approches, ce qui souligne encore cette discordance. En dépit des faibles performances des méthodes fondées sur la culture, leur contribution nous paraît essentielle car elles permettent de disposer des souches fongiques nécessaires aux études de virulence ou d'interactions champignon-bactérie.

Etude de la flore muqueuse : intérêt des biopsies intestinales

Notre étude n'a analysé que des prélèvements fécaux (flore de transit), et ne prend pas en compte finalement la flore résidente associée aux muqueuses. Dans la MC, des anomalies ont été rapportées concernant la composition et les propriétés du mucus intestinal, avec notamment une diminution de synthèse de peptides anti-microbiens et de mucines. En effet, le microbiote présent au niveau de la couche externe du mucus intestinal est distinct de la flore fécale (Li et al. 2015), et il est primordial de déterminer la composition du microbiote au niveau des lésions actives de la maladie pour faire la part de la flore muqueuse et de la flore de transit. Il n'existe à ce jour qu'une étude, utilisant une technologie NGS, analysant des biopsies intestinales dans les formes pédiatriques de MICI (Mukhopadhyaya et al. 2014). Les auteurs ont mis en évidence une augmentation du rapport basidiomycètes/ascomycètes au niveau des biopsies intestinales. Ces mêmes auteurs suggèrent que ce rapport inversé, chez les patients atteints de MC, est possiblement liée à la rupture de tolérance vis à vis des ascomycètes et qui serait à l'origine de la génération des ASCA. Le niveau de preuve de cette étude est assez faible, du fait de son faible effectif (n=7). Sokol a confirmé cette tendance (augmentation du rapport basidiomycetes/ascomycetes) dans une cohorte de patients MC plus importantes (n=235), reliée à l'activité de la maladie (Sokol et al. 2016). Une deuxième étude, utilisant une technologie de séquençage moins résolutive (DGGE), a montré que la flore fongique était plus importante au niveau des ulcérations digestives chez les patients MC (Li et al. 2014). Il y a donc un intérêt majeur à élargir notre étude, en incluant des biopsies digestives, au niveau des lésions actives et des zones saines

pour déterminer l'action de la flore fongique *in situ*. Parmi les projets que nous souhaitons développer, nous envisageons la définition du microbiome de façon séquentielle pour étudier l'évolution de la flore au cours du temps, en fonction de la localisation et du phénotype clinique ainsi que l'impact des traitements adjuvants. Enfin, une fois cette problématique résolue, l'étude du transcriptome et du métabolome fongiques pourrait être envisagée afin d'identifier la part du microbiote actif et les voies métaboliques induites.

Conclusion

En conclusion, ce travail a permis de définir la dysbiose intestinale dans des formes familiales de maladie de Crohn. Il est difficile à l'heure actuelle d'impliquer un pathogène dans le déclenchement de la maladie, et il faut plutôt raisonner en termes de microbiote déséquilibré. Cependant cette approche est intéressante, car elle permet de mettre en évidence de nouveaux marqueurs qui consistent en la définition de "signature microbienne" en relation avec la physiopathologie de la MC. Elle permet aussi d'entrevoir de nouvelles approches préventives ou thérapeutiques visant à rétablir l'équilibre des populations microbiennes intestinales. Le succès de la transplantation fécale dans le traitement des colites récidivantes à *Clostridium difficile* représente un espoir dans la prise en charge des MICI. Son intérêt en pratique clinique dans la MC reste cependant à démontrer et est décevant à la lumière des études cliniques en cours (Vermeire et al. 2016).

Annexes: Articles publiés

Article 1: Implication de la flore fongique intestinale dans la maladie de Crohn (Médecine/Sciences)

Hoarau G, Colombel JF, Poulain D, Sendid B

Cette nouvelle, fait la synthèse de l'état de l'art sur l'implication de la flore fongique intestinale dans la maladie de Crohn.

Nouvelle

Implication de la flore fongique intestinale dans le développement de la maladie de Crohn.

Fungal intestinal flora in the development of Crohn's disease

Gautier Hoarau, Jean Frédéric Colombel, Daniel Poulain, Boualem Sendid

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique intestinale, touchant principalement les jeunes adultes (Cosnes et al. 2011). Sa prévalence est plus importante dans les pays industrialisés et son origine reste inconnue. Néanmoins l'hypothèse la plus communément admise est que la MC serait liée à une dérégulation de la réaction immunitaire muqueuse vis-à-vis d'un microbiote intestinal déséquilibré (dysbiose) sous l'influence de facteurs environnementaux (tabac, alimentation...) et génétiques (Cosnes et al. 2011).

La flore intestinale contient une variété importante de microorganismes, et joue un rôle prépondérant dans cet écosystème, en maintenant une homéostasie. L'altération de cette flore pourrait être responsable d'un état de dysbiose (Chassaing and Darfeuille-Michaud 2011), un déséquilibre entre la flore protectrice et la flore « pathogène », favorisant la survenue de MC. Les études métagénomiques ont permis de caractériser l'ensemble du microbiote bactérien intestinal, notamment les espèces non cultivables. Chez les patients atteints de MC, on retrouve une diminution de la diversité bactérienne (Chassaing and Darfeuille-Michaud 2011) (phyla Bacteroidetes et Firmicutes), ce qui pourrait favoriser l'implantation de souches d'*Escherichia coli* dites AIEC : Adherent Invasive *Escherichia coli* (Boudeau et al. 1999) (*E. coli* LF82).

L'implication de *Candida albicans*, levure commensale du tube digestif et pathogène opportuniste a été aussi suggérée dans le développement de la maladie. Il existe plusieurs études étayant cette hypothèse.

Preuves cliniques de l'implication de la flore fongique dans la maladie de Crohn

La colonisation de l'intestin par *C. albicans* (Standaert-Vitse et al. 2009) est plus importante chez les patients atteints de MC, et leurs parents sains du premier degré (Standaert-Vitse et al. 2009). Le niveau de colonisation est également plus important

durant la phase aigüe de la maladie (Gerard R 2013). Par ailleurs la prévalence d'anticorps, dirigés contre les fragments glycaniques de la paroi des champignons (anti- *Saccharomyces cerevisiae* –ASCA-, anti-laminaribioside –ALCA-, anti-chitobioside-ACCA) ou certains antigènes bactériens (I2, OmpC, CBir1) est élevée dans le sérum des patients MC et leurs parents sains (Standaert-Vitse et al. 2009). Le nombre et l'amplitude de ces biomarqueurs seraient corrélés à la sévérité de la maladie (Landers et al. 2002, Sendid et al. 1998). Par ailleurs, il existe une immunité muqueuse (IgA sécrétoires) vis-à-vis de ces mêmes fragments glycaniques (Tang et al. 2012).

De façon anecdotique, on a pu observer empiriquement l'amélioration des symptômes de la maladie sous traitement antifongique. Par exemple Samuel *et al.* (Samuel, Loftus, and Sandborn 2010) rapportent une amélioration de la symptomatologie digestive de patients atteints de MC, traités par itraconazole pour une histoplasmosse. Il reste cependant à savoir si cet effet est lié à une réduction de la flore fongique, ou à une action non antifongique (anti-inflammatoire/anti-angiogénique). Ces données témoignent, au moins partiellement, de l'implication de la flore fongique dans le déséquilibre immunitaire menant à une réaction inflammatoire non contrôlée.

Preuves expérimentales de l'implication de la flore fongique dans la maladie de Crohn

Un modèle murin de colite chimio-induite a suggéré l'activité pro-inflammatoire de *C. albicans*, liée à son implantation dans l'intestin. Inversement l'inflammation intestinale augmente la colonisation *par C. albicans* (Jawhara et al. 2008)

Par ailleurs il existe une intrication forte entre le mycobiome intestinal et l'hôte, par le biais de l'immunité innée. En effet la susceptibilité génétique de l'hôte à la colonisation *par C. albicans* est variable, ce qui suggère la notion d'inégalité immunogénétique. En particulier l'absence de récepteurs aux lectines (Dectin-1) favoriserait le développement

de colite dans un modèle murin, amélioré par ailleurs par l'administration d'un traitement antifongique (Iliev et al. 2012). D'autres polymorphismes génétiques ont été identifiés chez les patients atteints de MC, il s'agit principalement des gènes PRR (pathogen recognition receptors) impliqués dans la reconnaissance des PAMPs (Pathogen associated molecular pattern) tels que la MBL (mannose binding lectin), la galectine-3, les TLRs et les peptides antimicrobiens (β -défensines) (Chassaing and Darfeuille-Michaud 2011). De manière intéressante, certains de ces polymorphismes favorisent également la colonisation digestive par *C. albicans*, en particulier les mutations des gènes MBL2 et TLR-1. Ces données suggèrent un rôle prépondérant de l'interaction de la flore fongique avec l'hôte dans le développement de maladies inflammatoires chroniques intestinales.

Enfin, plusieurs observations expérimentales démontrent que la flore fongique pourrait jouer un rôle dans l'initiation d'une réponse immunitaire excessive (Kumamoto 2011). Chez les patients atteints de MC, il y a un défaut de régulation de la réponse inflammatoire muqueuse, en particulier une orientation des lymphocytes T naïfs vers une réponse cellulaire Th1 et Th17 (cf. schéma). Au cours de la maladie, il y a une sécrétion excessive d'interféron gamma au niveau de la muqueuse intestinale par les lymphocytes Th1, induite par l'IL-12. L'axe Th17, induit par l'IL-6 et le TGF- β , stabilisé par l'IL-23 aurait un rôle dans le déclenchement de la réponse inflammatoire intestinale (Peyrin-Biroulet et al. 2007). Il a été également démontré que *C. albicans* serait un puissant inducteur de la différenciation des cellules T helper vers la voie Th17, impliquant un récepteur lectinique, Dectin-1 (van der Meer et al. 2010). Cet axe prend alors une dimension importante dans l'immunité antifongique (Drummond and Brown 2011), et il a été montré dans des modèles murins (Kumamoto 2011), que la colonisation gastrique par *C.*

albicans pourrait augmenter la production des cytokines IL-17 et IL-23. De ce fait la colonisation fongique accrue de l'intestin pourrait favoriser une activité pro-inflammatoire exagérée, par le biais de la réponse Th17 (Kumamoto 2011).

Perspectives de recherche et conclusions

Contrairement au microbiote bactérien la flore fongique intestinale chez les patients atteints de MC a été peu étudiée. Récemment l'avènement des nouvelles techniques de séquençage à haut débit (Siqueira, Fouad, and Rôças 2012) a permis de caractériser le mycobiome de la flore buccale (Ghannoum et al. 2010), et de révéler la présence de nombreuses espèces fongiques non cultivables, et leurs implications potentielles dans la survenue de la maladie. La méthodologie décrite dans ces études princeps utilise une technologie innovante basée sur le pyroséquençage, en particulier la technologie 454. (Siqueira, Fouad, and Rôças 2012) Cette approche a révolutionné l'analyse métagénétique, puisqu'elle s'affranchit des étapes de clonage. L'utilisation de cibles universelles fongiques ribosomales (ITS, 18S) permet une étude quasi exhaustive du métagénome. Le terme « mycobiome » a donc été consacré comme le pendant fongique du microbiome. Récemment Iliev (Iliev et al. 2012) a pu caractériser le mycobiome intestinal dans un modèle murin de colite chimio-induite, et a suggéré une augmentation des espèces fongiques pathogènes (*Candida*, *Trichosporon*) et une réduction du genre *Saccharomyces* (utilisé comme agent probiotique). L'existence de nombreuses espèces fongiques, non détectables par les techniques classiques de culture laisse entrevoir un important champ d'investigation. En effet la caractérisation du microbiote fongique, par une approche métagénétique permettrait donc de mieux comprendre et de définir les mécanismes moléculaires de l'implication de la flore intestinale dans la MC, et sa participation dans la réponse immunitaire de l'hôte.

Bibliographie

1. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1785-94.
2. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1720-28.
3. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, *et al.* Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 1999; 67: 4499-509.
4. Standaert-Vitse A, Sendid B, Joossens M, *et al.* *Candida albicans* colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1745-53.
5. Gerard R, Sendid B, Techy A, Massouille-Vernier G, François N, Colombel JF, Poulain D. *Candida albicans* colonization and anti-glycan antibodies in active and quiescent Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 2013; vol.7: p. S290-S1.
6. Landers CJ, Cohavy O, Misra R, *et al.* Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002; 123: 689-99.
7. Sendid B, Quinton JF, Charrier G, *et al.* Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1306-10.
8. Tang LY, Cai H, Navaneethan U, *et al.* Utility of fecal and serum anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in the diagnosis of Crohn's disease-like condition of the pouch. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 1455-63.
9. Samuel S, Loftus EV, Sandborn WJ. The effects of itraconazole on inflammatory bowel disease activity in patients treated for histoplasmosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 1207-9.
10. Jawhara S, Thuru X, Standaert-Vitse A, *et al.* Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* 2008; 197: 972-80.
11. Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, *et al.* Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* 2012; 336: 1314-7.
12. Kumamoto CA. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14: 386-91.
13. Peyrin-Biroulet L, Parmentier-Decrucq E, Branche J, Desreumaux P. [IL-23R, a novel susceptibility gene for inflammatory bowel disease]. *Med Sci (Paris)* 2007; 23: 250-2.
14. van der Meer JW, van de Veerdonk FL, Joosten LA, *et al.* Severe *Candida* spp. infections: new insights into natural immunity. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36 Suppl 2: S58-62.

15. Drummond RA, Brown GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14: 392-9.
16. Siqueira JF, Fouad AF, Rôças IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol* 2012; 4.
17. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000713.

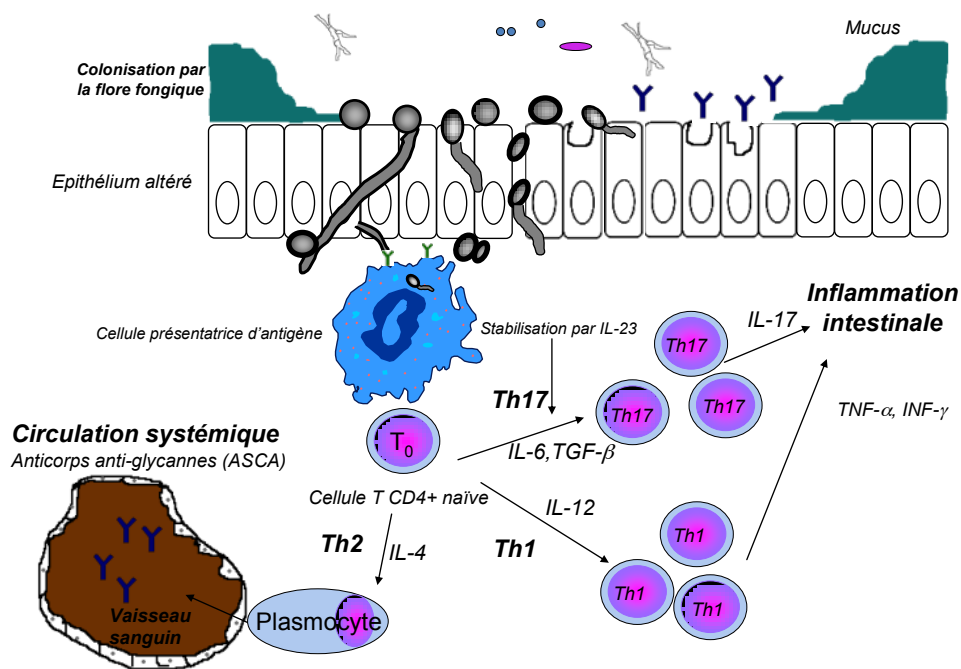


Schéma représentatif de l'implication de la flore fongique dans le processus immunopathogénique de la maladie de Crohn

La colonisation intestinale par la flore fongique, et la dysbiose pourraient être impliquées dans la pathogénèse de la maladie de Crohn. Les éléments fongiques, après passage d'une barrière épithéliale intestinale altérée et perméable seraient reconnus par les cellules présentatrices d'antigène, qui orienteraient, chez les sujets génétiquement susceptibles, les cellules T CD4+ naïves vers une réponse cellulaire Th1/Th17, responsable de l'inflammation intestinale. La réponse Th2 induirait la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, permettant la synthèse d'anticorps anti glycannes sériques (IgG, retrouvées chez plus de 60% des malades) et tissulaires (IgA sécrétoires).

Légende :

- Levures (*Candida*)
- Pseudomycelium (*Candida*)
- Champignons filamenteux
- Cocci gram positif
- Bacille gram négatif
- Anticorps anti-glycannes
- Antigène du CMH

Article 2 : Mycobiota in gastrointestinal diseases (Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology)

Mukherjee PK, Sendid B, Hoarau G, Colombel JF, Poulain D, Ghannoum MA.

Cette revue fait la synthèse du rôle de la flore fongique dans le développement des maladies gastro-intestinales au sens large. Cet article décrit la composition du mycobiome chez le sujet sain, puis dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la maladie digestive du greffon contre l'hôte (GVHd), et l'hépatite B. L'aspect mécanistique de la physiopathologie est également abordé.

The mycobiome in gastrointestinal diseases

Pranab K. Mukherjee, Boualem Sendid, Gautier Hoarau, Jean-Frédéric Colombel, Daniel Poulain, Mahmoud A. Ghannoum

Center for Medical Mycology, University Hospitals Case Medical Center, Case Western Reserve University, 11100 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44106-5028, USA (P.K.M., M.A.G.). Inserm U995, Université Lille 2, Faculté de Médecine H. Warembourg, Pôle Recherche, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Lille, Place Verdun, 59037 Lille, France (B.S., G.H., D.P.). Department of Gastroenterology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029-6574, USA (J.-F.C.).

Correspondence to:

M.A.G.

Mahmoud.Ghannoum@case.edu

P.K.M. and B.S. contributed equally to the article.

Abstract

New insights gained through the use of state-of-the-art technologies, including next-generation sequencing, are starting to reveal that the association between the gastrointestinal tract and the resident mycobiome (fungal community) is complex and multifaceted, in which fungi are active participants influencing health and disease. Characterizing the human mycobiome in healthy individuals showed that the gastrointestinal tract contains 66 fungal genera and 184 fungal species, with *Candida* as the dominant fungal genera. Although fungi have been associated with a number of gastrointestinal diseases, characterization of the mycobiome has mainly been focused in patients with IBD and graft-versus-host disease. In this Review, we summarize the findings from studies investigating the relationship between the gut mycobiome and gastrointestinal diseases, which indicate that fungi contribute to the aggravation of the inflammatory response, leading to increased disease severity. A model explaining the mechanisms underlying the role of the mycobiome in gastrointestinal diseases is also presented. Our understanding of the contribution of the mycobiome to health and disease is still in its infancy and leaves a number of questions to be addressed. Answering these questions might lead to novel approaches to prevent and/or manage acute as well as chronic gastrointestinal disease.

Key points

- The mycobiome is a key component of the human microbiome
- Within a microbiome, intra and inter-species/genera interactions among fungi and bacteria
- Alterations within the mycobiome are associated with different diseases
- The mycobiome might directly or indirectly interact with the host immune system
- Interactions between the mycobiome and host immune system can lead to exacerbation of gastrointestinal diseases such as IBD

Introduction [heading 1]

The association between fungi and gastrointestinal disease has been documented since the 18th century with a special focus on candidiasis. One of the first observations of this association was the study by Rosen von Rosenstein,¹ who described oral candidiasis that extended to the stomach and intestines. In addition, the first reported case of gastrointestinal candidiasis in an infant was described in this period.¹ Subsequent case reports published in the 19th century documented *Candida* infection of the stomach, colon^{2, 3} and ileum.⁴ *Candida* gastrointestinal infections occur less frequently than oesophageal infection, with stomach being the most common site of infection in the gastrointestinal tract.¹

Historically, fungi such as *Candida* were considered passive colonizers of the microbial community that could become pathogenic as the result of a change, for example the loss or reduction of bacterial neighbours (due to use of antibiotics) or suppression of immune defense (as a result of an immunosuppressive regimen). However, studies performed in the last decade have demonstrated that fungi have a complex, multifaceted role in the gastrointestinal tract and are active participants in directly influencing health and disease through fungal–bacterial, fungal–fungal and fungal–host interactions.

Advances in sequencing technology have provided the ability to profile the microbiome, with emphasis on the bacterial component (bacteriome). However, studies are now beginning to define the fungal component of the human microbiome (mycobiome). A historical perspective of the interactions between fungi and the gastrointestinal tract and a description of the current state of

research on the mycobiome as it pertains to the gastrointestinal tract in health and disease is provided in this Review.

A search of the mycobiome literature shows clear variability between different studies, which can be attributed to the lack of standardized methods to characterize the mycobiome. A multitude of differences occur across studies, including: sample types, collection times and protocols, DNA extraction methods, varying amplification targets, sequencing methods, differences in algorithms and online database composition, and variation in data cleaning steps and bioinformatics approaches. Therefore, development of standardized methods in microbiome (both bacterial and fungal) analyses is critical. Efforts to address standardization have been initiated and variables that influence microbiome research are being optimized.⁵⁻⁷

Fungal–bacterial interactions [heading 1]

Interactions between fungi and bacteria have been reported for a long time, particularly since the introduction of antibiotics in the mid-1900s.⁸⁻¹⁴ Dollive *et al.*¹⁵ investigated the effect of antibiotic treatment on the gut mycobiome in a mouse model using quantitative PCR and pyrosequencing. Prior to treatment it was found that bacteria outnumbered fungi by more than three orders of magnitude. Antibiotic treatment reduced bacterial abundance by more than three orders of magnitude and concomitantly increased the abundance of fungi by ~40-fold. After the end of treatment, the abundance of bacterial and fungal communities were found to be similar to their pre-treatment levels within two

months post antibiotic treatment, probably owing to the removal of antibiotic pressure. However, the microbial profile reported was affected by the cages in which the animals were housed. In this regard, these investigators reported that different cages had different fungal profiles that varied temporally, with a heterogenous fungal community initially, followed by successively dominant fungi. This pattern of changes was ascribed to coprophagia or fungi acquired from the cage environment. Therefore, researchers aiming to characterize the microbiota in health and disease should consider how husbandry practices might affect experimental results.

Microbiome analyses conducted in 2014 demonstrated significant correlations between the abundance of fungi and bacteria in the oral cavity (a major port of entry for microorganisms into the human body). A positively correlated microbial pair indicates that the microbes in this pair depend on each other for growth, probably by maintaining nutrient balance or modulating growth-related cellular pathways. Pairs that exhibit a negative correlation could reflect indirect mechanisms of inhibition, in which one microbe scavenges the nutrients needed for the other's growth or direct mechanisms involving growth inhibition mediated by secretory proteins and/or metabolites. Such 'co-occurrence' or 'co-exclusion' relationships have been described for members of the bacteriome in the human microbiome.¹⁶ Faust *et al.* identified a global network of 3,005 significant co-occurrence and co-exclusion relationships between 197 clades occurring throughout the human microbiome, and dependent on the body site. These investigators reported co-occurrence among potential pathogens (e.g.

Treponema and *Prevotella* in the dental plaque) and co-exclusion among commensal microbes (e.g. Prevotellaceae and *Bacteroides* in the gut). In a separate study, Mukherjee *et al.*¹⁷ characterized the oral bacteriome and mycobiome in oral wash samples collected from study participants with or without HIV infection and reported that the abundance of a number of bacteria and fungi were negatively correlated (that is, the increasing abundance of certain bacteria was associated with the decreasing abundance of some fungi). In samples from uninfected patients a negative correlation was found between *Rothia* and *Cladosporium*, and between *Granulicatella* and *Cryptococcus*. A similar correlation was identified between *Campylobacter* and *Candida* in patients infected with HIV. The notion of interdependence between bacteria and fungi is further supported by research from Navazesh *et al.*¹⁸ and Cruz *et al.*¹⁹ Navazesh *et al.*¹⁸ used a culture-based method to determine the microbial profile in whole saliva collected from women infected with HIV. The use of highly active antiretroviral therapy was found to affect the prevalence of different microbes. Similar to the observations above, an increase in the prevalence of *Campylobacter* with a concomitant decrease in the prevalence of *Candida* spp was reported.¹⁸ Cruz *et al.*¹⁹ used a *Caenorhabditis elegans* model of polymicrobial infection to investigate whether *Enterococcus faecalis* (a commensal, Gram-positive gut bacterium associated with IBD^{20, 21}) interacts with its fungal cohabitant *C. albicans* in the gastrointestinal tract and oral cavity. *E. faecalis* was found to exert an antagonistic effect on *C. albicans*, mediated by the inhibition of fungal hyphal morphogenesis and biofilm formation. Inhibition of *C.*

albicans was partially dependent on quorum-sensing molecules, described to be major regulators of virulence in *E. faecalis*.¹⁹

Taken together, these studies suggest the existence of interdependent relationships within the oral microbiome. Such interactions could be mediated by multiple mechanisms including secretory products and competition for nutrients. In this regard, Workman *et al.*²² reported that secretory proteins produced by *Campylobacter* inhibit the growth of *C. albicans*.

Fungal–fungal interactions [heading 1]

Interactions between different fungal members of the human mycobiome were described for the first time in healthy individuals by Ghannoum *et al.*²³ and in a subsequent study in patients infected with HIV by Mukherjee *et al.*¹⁷ In the latter study, the oral microbiome of 12 patients infected with HIV and 12 matched uninfected individuals were compared using pyrosequencing. Up to 14 bacterial and nine fungal genera were detected in both uninfected controls and HIV-infected patients. Organisms detected in at least 20% (a randomly selected threshold) of the tested samples were considered to be the ‘core microbiome’. Interestingly, although the core oral bacteriome remained similar in both groups, the core oral mycobiome differed between the two groups (although *Candida* remained the predominant fungus). Analysis also revealed 23 statistically significant correlations among different fungi (indicating “fungal–fungal” interactions) in uninfected individuals, and six such correlations in patients infected with HIV. Interactions observed in patients infected with HIV included:

Candida-Epicoccum, *Candida-Trichosporon*, *Penicillium-Corynespora*,
Penicillium-Fusarium, *Epicoccum-Trichosporon*, and *Alternaria-Serpula*.

Moreover, an increase in the abundance of *Candida* was associated with a concomitant decrease in the abundance of *Pichia*, suggesting antagonism between these two fungi, which was subsequently confirmed using *in vitro* assays. The *in vitro* results were validated in an experimental mouse model of oral candidiasis showing that *Pichia* was efficacious in the treatment of oral candidiasis. The existence of fungal–fungal interactions and the evidence that a fungus present in the same host microenvironment antagonizes *Candida* was first presented in a disease setting (HIV infection) by Mukherjee *et al.*¹⁷

The above study provides a glimpse into fungal–fungal interactions, which have been studied only to a limited extent. Research into this area should be encouraged as it could lead to the discovery of novel antimicrobial therapies. For example, although *Pichia* is a known biocontrol agent against plant fungal pathogens, it has not been investigated against medically important human pathogens. Another instance of possible translational application of fungal–fungal interactions is the use of ‘probiotic’ *S. cerevisiae* strains (for example *S. boulardii*), which have been shown to influence *C. albicans* colonization and *Candida*-induced inflammation.²⁴⁻²⁷

The mycobiome in health [heading 1]

Mycobiome of the oral cavity [heading 2]

The first study describing the oral fungal community using deep-sequencing was published in 2010²³ and used the fungal-specific internally transcribed spacer region to determine the mycobiome profile. The oral mycobiome was shown to contain a complex fungal community beyond simply *Candida* and *Saccharomyces*. Across the 20 healthy individuals examined, 101 fungal species were identified, with 9–23 species present per individual, a finding in agreement with the description of healthy oral mycobiome by Nasidje *et al.*²⁸ Studies performed by our group showed that the core oral mycobiome included 15 genera, of which *Candida* species were the most frequent, followed by *Cladosporium*, *Aureobasidium* and *Saccharomycetales*.²³ *C. albicans* was the most common *Candida* spp. present, followed by *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. khmerensis* and *C. metapsilosis*. Other fungi that were present included those known to be pathogenic (*Aspergillus*, *Fusarium* and *Cryptococcus*). The presence of non-*Candida* pathogenic fungal genera in the mouth was an unexpected finding as these fungi have not previously been reported as colonizers of the oral cavity.

The presence of pathogenic fungi could render individuals at increased risk of invasive fungal infections, especially if the host immune status is altered (for example in transplant recipients and patients infected with HIV). Of interest, a large number of nonculturable fungi (36.1% of the whole sample) belonging to the Ascomycota and Basidiomycota phyla (and 11 genera belonging to

ascomycete, basidiomycete, ectomycorrhiza, endophytic, glomeromycete, Glomus, Leptosphaeriaceae, soil, and unknown taxa) were also detected. The role of nonculturable fungi in health and disease has not been studied and is hampered by our inability to grow them using routine microbiological methods. Nonculturable fungi might influence the overall balance and composition of the mycobiome and bacteriome and also interact directly or indirectly with the host. To answer these questions, methods need to be developed and optimized that will enable characterization of nonculturable fungi.

Mycobiome of the gastrointestinal tract [heading 2]

Two studies have characterized the mycobiome of the gastrointestinal tract in healthy individuals. In the first study, Dollive *et al.*²⁹ used pyrosequencing and analyzed faecal samples from 10 healthy volunteers. The gastrointestinal tract was found to contain *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Pneumocystis* and Saccharomycetaceae yeasts (*Candida* and *Saccharomyces*). In the second study, Hoffmann *et al.*³⁰ used deep-sequencing to evaluate the effect of diet on the fungal, bacterial and archaeal components of the gut microbiota and reported the presence of 12, 15, and five genera, respectively. As expected, the most prevalent fungal genera detected were: *Saccharomyces* (present in 89% of the specimens), followed by *Candida* (57%) and *Cladosporium* (42%). Correlation analyses highlighted a negative correlation between Ascomycota and Basidiomycota. Furthermore, the yeasts *Candida* and *Saccharomyces* were positively associated with the *Archaea* member *Methanobrevibacter* and

negatively associated with *Nitrososphaera*. The dearth of further information regarding the correlation between fungi and *Archaea* in humans and how it might affect trans-kingdom coexistence requires more research.

Hoffmann *et al.*³⁰ also analyzed the influence of diet on fungal and bacterial levels in people who consume a diet rich in animal proteins, acids and fats or a diet rich in carbohydrate. These investigators showed that bacteria were strongly correlated with the diet rich in animal proteins, acids and fats, with *Bacteroides* being more abundant in individuals on this diet. *Prevotella* was more abundant among those consuming a carbohydrate-rich diet. By contrast, fungal abundance showed significant correlation with consumption of a diet rich in carbohydrates only. Specifically, *Candida* was positively correlated with carbohydrate consumption and negatively correlated with total saturated fatty acids. *Aspergillus* was negatively correlated with short-chain fatty acid levels in people on the carbohydrate-rich diet but no correlation was observed for *Saccharomyces* with either diet. In addition, these investigators reported significant correlations between nine fungal and 22 bacterial taxa ($P \leq .05$). These correlations included three positive and two negative correlations with both *Aspergillus* and *Candida* ($P \leq .05$ for all comparisons between fungi and bacteria). Of interest, the most significant positive fungal-bacterial correlations was reported for *Fusarium* (with *Syntrophococcus* and *Anaerostipes*, $P = .001$) and *Pichia* (with *Syntrophococcus*, $P = .001$) while the highest negative correlation was noted between *Candida* and *Bacteroides*, ($P = .001$). Interactions within and between fungi and bacteria in the gastrointestinal tract, as well as with

dietary components, has been demonstrated and complement findings from separate investigations that reveal a link between diet and the bacteriome in IBD.^{31, 32}

The influence of trans-kingdom relationships and diet on the coexistence of the microbial community within the human gut has not been defined. Two possible scenarios have been suggested.³⁰ First, *Candida* breaks down starch in carbohydrate-rich foods leading to the release of simple sugars, which are in turn fermented by bacteria (for example *Prevotella* and *Ruminococcus*). Fermentation byproducts produced by these bacteria are then used by *Methanobrevibacter*, leading to the production of carbon dioxide and/or methane. Second, the bacteria *Prevotella* degrades starch and mannan-containing polysaccharides from food to smaller polysaccharides and monosaccharides. *Prevotella* then takes up the smaller sugars and catabolizes them to produce succinate and other byproducts, thus providing *Candida* with simple sugars for fermentation. *Ruminococcus* might then consume the succinate produced by *Prevotella* and produce hydrogen or acetate for consumption by *Methanobrevibacter*.

Interestingly, across all the microbiome studies conducted so far in healthy individuals, the core mycobiome is dominated by *Candida* species, which might explain the fact that candidiasis is the most common manifestation of microbial dysbiosis. Although *C. albicans* is the predominant commensal yeast colonizing the human intestine, with a 40% prevalence, Angebault *et al.*³³ reported an unexpected colonization pattern in 151 Wayampi Amerindians living in a remote community in French Guiana. These individuals exhibited persistently low

prevalence (3–7%) of *C. albicans*. The low prevalence of this species was associated with female sex and living in a crowded household. By contrast, the study participants exhibited high prevalence (30%) of *C. krusei* and *S. cerevisiae*, which was particularly associated with food (local fruits and plants) or environment (inter-human and human-animal transmission due to close proximity).

Mycobiome and disease [heading 1]

Fungi have been linked with a number of gastrointestinal diseases including IBD,³⁴ peptic ulcers,³⁵ IBS,³⁶ antibiotic-associated diarrhoea³⁷ and chemotherapy-induced enteric disorders.³⁸ Characterization of the microbiome in gastrointestinal diseases has primarily focused on IBD, hepatitis and graft-versus-host disease (GVHD) (Table 1).

The mycobiome in IBD [heading 2]

The two most common forms of IBD are Crohn's disease and ulcerative colitis, which are progressive inflammatory diseases that usually lead to irreversible damage to the gastrointestinal tract. Crohn's disease primarily affects the small intestine and colon, whereas ulcerative colitis is limited to the colon.³⁹⁻⁴¹

The pathogenesis of Crohn's disease is thought to result from an inappropriate inflammatory response to intestinal microorganisms in a genetically susceptible host. The description of antibodies directed against *S. cerevisiae* mannan (a cell wall component of yeasts) in sera from patients with Crohn's disease was at the origin of studies in the 1990s highlighting a possible link

between *C. albicans* and Crohn's disease.⁴⁴⁻⁴²⁻⁴⁴ These anti-*S. cerevisiae* antibodies (ASCA) are probably the most commonly used serological biomarker of Crohn's disease.⁴⁵⁻⁴⁸ Several studies have shown that an alteration of the mannan repertoire of *C. albicans* in pathogenic conditions causes this yeast to become an immunogen for ASCA.⁴⁹ Additional evidence for the association between ASCA and Crohn's disease can be gleaned from the finding that ASCA are reported to be present in up to 60% of patients with Crohn's disease.⁵⁰ In addition, anti-mannobioside (Man(α 1,3)Man(α)) carbohydrate IgG antibodies (AMCA), anti-laminaribioside (Glc(β 1,3)Glc(β)) carbohydrate IgG antibodies (ALCA) and anti-chitobioside (GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(β)) carbohydrate IgA antibodies (ACCA) have also been identified as potential serological markers of IBD.⁵¹⁻⁵⁴ Interestingly, these oligosaccharides are present in the *Candida* cell wall as part of mannan, glucan and chitin, respectively. Moreover, patients with Crohn's disease have been reported to be heavily colonized with *C. albicans*; this species is more frequently encountered in these patients than healthy individuals.⁴⁶ Further support for the link between *C. albicans* and Crohn's disease is derived from studies based on experimental mouse models of Crohn's disease involving chemical induction of inflammation using dextran sodium sulphate (DSS). Colonic inflammation promotes *C. albicans* colonization in the DSS model of colitis.⁵⁵ *C. albicans* colonization is accompanied by an immune response detected by antibodies directed against *C. albicans* and *S. cerevisiae* antigens (such as ASCA).

One of the early studies that attempted to show a difference in the mycobiome in patients with IBD was performed by Ott *et al.*³⁴ These investigators PCR-amplified the variable regions of the 18S rDNA to determine the profile of fungi present in the intestinal mucosa and stool samples of patients with Crohn's disease, ulcerative colitis and healthy controls. The mycobiome of faecal samples was found to be substantially different from that of the mucosal samples across all three groups. The fungal species in faecal samples from the three groups belonged to two taxa, with the majority belonging to Ascomycota (92.3%) and Basidiomycete (7.7%). *C. cladosporioides*, *Raciborskiomyces longisetosum* and *Penicillium ialicum* were common in both faecal and mucosal samples from the three groups. In a separate study, Trojanowska *et al.*⁵⁶ analyzed the potential for the transmission of oral *Candida* to downstream segments of the gastrointestinal tract in patients with IBD. Throat smears, colonic biopsies, colonic aspirate, brush smears and faecal samples obtained from 126 patients (72 with ulcerative colitis, 18 with Crohn's disease and 36 control individuals) were analyzed with conventional methods as well as PCR-Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to identify fungal genotypes. A shift in the profile of non-*albicans* *Candida* was noted; control individuals had only *C. tropicalis* whereas patients with IBD were colonized with *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* and *Geotrichium candidum*. The *C. albicans* strains isolated from the oral cavity were similar in their genotype to those isolated from different segments of the gastrointestinal tract, suggesting fungal transmission. The observation that the fungal profile of the oral cavity mirrors that

of the gastrointestinal tract implies that fungi present in the oral cavity could be used as diagnostic markers. The use of oral samples for diagnosing IBD has the added advantage of ease of collection compared with faecal samples. Notably, given that the studies by Ott *et al.*³⁴ and Trojanowska *et al.*⁵⁶ used conventional culture (which favors the growth of dominant fungi) and PCR-based techniques (using a universal eukaryotic or *Candida*-specific primer, which provide limited sensitivity and coverage) for sequencing, the fungal profile identified probably represents the most abundant members of the mycobiome.

Deep-sequencing technology has been used to analyze the fungal profile in a murine dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis model of IBD by Iliev *et al.*⁵⁷ These investigators analyzed the fungi present in the intestinal tract of a number of healthy animals (BALB/c mice, 129S2/Sv mice, rat, guinea pig, pig, rabbit and dog) and showed that fungi thrive alongside bacteria in the intestinal tract and that the highest fungal concentration was detected in the colon. Pyrosequencing using the fungal internal transcriber spacer 1–2 region showed that the gut is colonized with 10 different fungal species, which were dominated by *Candida tropicalis* (65%).

To gain insight into how the fungal community affects inflammation in Crohn's disease, Iliev *et al.*⁵⁷ performed studies in a murine model of DSS-induced colitis using mice deficient in dectin-1 [a key receptor that mediates the biological effects of fungal (1,3) β -D-glucans, and encoded by *Clec7a*].⁵⁸ Dectin-1 deficient mice (*Clec7a*^{-/-}) suffered greater severity of IBD symptoms with increased weight loss, histological alterations and production of proinflammatory

cytokines compared with wild-type mice. Importantly, an increase in the proportion of pathogenic fungi (*Candida* and *Trichosporon*) and a concomitant decrease in the nonpathogenic *Saccharomyces* were noted in *Clec7a*^{-/-} mice during colitis. Moreover, the increase in proportion of fungal pathogens was accompanied by an increase of inflamed tissue in *Clec7a*^{-/-} mice. By contrast, no differences in commensal bacterial phyla were observed between the wild-type and *Clec7a*^{-/-} animals. These results suggest that the mycobiome rather than the bacteriome contributes to the inflammatory process in IBD and that dectin-1 deficiency leads to altered immunity, enabling fungi to gain a foothold and cause subsequent invasion. However, these data contrast with a previous clinical study that showed increased expression of dectin-1 in actively inflamed colon tissue of patients with IBD.⁶³ Furthermore, c.714T>G polymorphism in dectin-1 (which leads to a loss-of-function and impaired cytokine responses) is associated with susceptibility for developing IBD.⁵⁹

In further experiments, Iliev *et al.*⁵⁷ showed that transplantation of faeces from wild-type to *Clec7a*^{-/-} mice did not reduce symptom severity, implying that disease severity was host-mediated rather than owing to microbiome dysbiosis. In addition, these investigators reported that dendritic cells (DCs) conditioned by gut epithelial cells (these DCs are protective against experimental colitis)⁶⁰ from *Clec7a*^{-/-} mice were restricted in their ability to kill *C. tropicalis* and that gut administration of *C. tropicalis* to these mice resulted in more severe DSS-induced colitis, thus demonstrating that *C. tropicalis* exacerbates the disease by exploiting the lack of dectin-1 in these mice. Finally,

treatment of dectin-1 deficient mice with the antifungal fluconazole resulted in attenuated disease severity. Taken together, these findings indicate that although fungi do not cause IBD, they contribute to aggravation of the inflammatory response.

The mycobiome and GVHD [head 2]

The pathogenesis of gastrointestinal GVHD is a complex and multidirectional process that involves interactions between the host innate immune system, the gut microbiota and donor T cells. Perturbation of mucosal innate immunity (as a consequence of, for example, aggressive cytotoxic therapy) combined with dysbiosis in the gut microbiota results in aggravated inflammation of the intestinal mucosal barriers and stimulation of alloreactive T-cell responses. Mucosal damage to the gastrointestinal tract is induced,^{61, 62} which in turn influences host immune response, manifesting as a reduction in the secretion of antimicrobial cationic peptides (including α -defensin). Decreases in antimicrobial peptides leads to dysbiosis and predisposes the patient to bacterial and fungal infections.

Marr *et al.*⁶³ were among the first to demonstrate an association between treating *Candida* infections with fluconazole and improving GVHD. The study consisted of long-term follow-up (8 years) of a randomized, placebo-controlled trial in 300 patients who received fluconazole (400 mg per day) or placebo for 75 days after bone marrow transplant. The effect of long-term fluconazole prophylaxis on GVHD, candidiasis and overall survival was evaluated. Results

showed that long-term administration of fluconazole was associated with decreased gastrointestinal GVHD, persistent protection against disseminated *Candida* infections and candidiasis-related death, resulting in an overall survival benefit in these patients.

In a subsequent study, Van der Velden *et al.*⁶⁴ examined whether *Candida* colonization and dectin-1 function had any effect on the development of GVHD. They conducted a retrospective analysis of a highly homogeneous group of patients ($n = 153$) who had undergone matched-related partially T cell depleted allogeneic stem cell transplantation after myeloablative conditioning. Patients had received ciclosporin for GVHD and ciprofloxacin as antibacterial prophylaxis during the first weeks after stem cell transplant until hospital discharge. *Candida* colonization, defined as the presence of *Candida* spp. in a faecal and mouthwash sample on the same day, or isolation of this pathogenic fungi from the same site on two consecutive samples, was evaluated within the first 7–10 days after admission. Fluconazole was prescribed only for those patients colonized with fluconazole-susceptible species (*C. albicans*, *C. tropicalis* or *C. parapsilosis*). In addition, dectin-1 Tyr238X single nucleotide polymorphism (SNP) (which results in loss-of-function) genotyping was performed on a subset of 127 patients and their donors. The overall incidence of acute GVHD and GI-GVHD in the study population ($n = 153$) was 38.5% and 24%, respectively. Among the study participants, 35% (54 of 153) were colonized by fungi, with *C. albicans* being the predominant pathogen (85%), followed by *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. Patients colonized with *Candida* spp. had a significantly higher

rate of grade II–IV acute GVHD compared with uncolonized patients (50% versus 32%; OR 2.0; $P = 0.038$).⁶⁴ Multivariate analysis showed that *Candida* colonization was the only significant factor associated with acute GVHD. Furthermore, when treated with fluconazole, patients colonized with *Candida* tended to have a lower likelihood of developing GVHD (47% versus 67% for fluconazole-treated and untreated patients, respectively). By demonstrating that a reduction in *Candida* colonization substantially reduces the occurrence of GVHD, the study underscores the important contribution of the mycobiome in disease pathogenesis. However, it is important to remember that GVHD is influenced by a number of variables, including the bacteriome.^{65, 66}

Van der Velden *et al.*⁶⁴ also investigated the role of dectin-1 in *Candida* colonization and GVHD in 15 patients (12%) who had the Tyr238X SNP in dectin-1, compared with 112 (88%) patients who did not have the SNP. The Tyr238X SNP was associated with increased *Candida* colonization (73% versus 31% for Tyr238X versus wild type, respectively; $P = 0.002$). However, the incidence of acute GVHD was similar (30%) in both groups, suggesting that a non-dectin-1 pathway mediates the influence of *Candida* on the pathogenesis of GVHD.

The mycobiome and hepatitis

The correlation between infection due to hepatitis B virus (HBV) and the composition and diversity of the gastrointestinal mycobiome was investigated by Chen *et al.*⁶⁷ in 161 participants including: (1) hepatitis B cirrhosis patients ($n = 38$), (2) chronic hepatitis B patients ($n = 35$), (3) HBV carriers ($n = 33$), and (4)

healthy volunteers (n = 55). Both culture-dependent and -independent (18S rRNA sequencing) methods were used. As expected, the culture-dependent approach detected *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. tropicalis*) and *S. cerevisiae*. The culture-independent method identified 37 operational taxonomic units (OTUs, clusters of nearly-identical sequence tags or phylotypes, commonly used to define microbial taxa)⁷ representing different fungi, including: *Saccharomyces* spp., *Penicillium* spp., *Galactomyces* spp. and *Cryptococcus* spp., results that are in agreement with other studies investigating the gastrointestinal mycobiome.³⁴ The number of fungi detected was positively correlated with disease progression. Abundance of *Candida* and *Saccharomyces* spp. were higher in volunteers with increasing severity of HBV infection. Moreover, patients with HBV-related cirrhosis or chronic HBV infection had greater fungal diversity than HBV carriers and healthy controls. These results confirmed earlier findings regarding the relationship between increasing fungal burden and disease severity in HBV infection.^{68, 69} A potential link between increase in fungal abundance and HBV infection could be an underlying deficiency in the host immune response. For example, Thomas *et al.*⁷⁰ reported an association between mutation in the mannose binding protein (MBP) and persistent HBV infection in Caucasian patients. This protein is a pattern recognition receptor (PRR) that binds to mannan on fungal cell walls, triggering a host immune response, and thus plays a key role in defense against fungal pathogens. It is possible that lack or dysfunction of MBP during HBV infection leads to attenuated defense against fungi and thus results in increased

colonization by these pathogens. Further research is required to confirm the underlying mechanisms.

Mechanisms of fungal–host interactions [head 1]

The immune response to the gut microbiota is a balance between tolerance and antimicrobial defense. Fungi are recognized through interactions between their pathogen-associated molecular patterns (PAMPs, such as β -glucan) and host immune cells with specific pattern recognition receptors (PRRs) such as C-type lectins (for example, dectin-1, dectin-2, DC-SIGN [Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin] and galectin-3) and Toll-like receptors (TLRs). Subsequently, antigen-presenting cells present fungal antigens as MHC class II conjugates, which interact with T-cell receptors on naïve T cells.⁷¹ These interactions lead to differentiation and polarization of naïve T cells to the helper T cells T_{H1} , T_{H2} or T_{H17} and regulatory T cells (T_{REGS}) in the presence of specific cytokines. IL-12 induces the differentiation of naïve T cells to T_{H1} , which secrete IFN- γ , TNF and IL-2, whereas differentiation of T_{H2} cells is induced by IL-4, and leads to secretion of IL-4, IL-5 and IL-13. A dynamic interaction exists between T_{H1} and T_{H2} cells as IL-12 and IL-4 inhibit T_{H1} and T_{H2} differentiation, respectively.⁷²⁻⁷⁶

A subset of helper T cells, T_{H17} , has been shown to interact with fungi and differentiate in the presence of IL-17A/F, IL-21, IL-22 and TNF. T_{H17} cells undergo ‘amplification’ in an IL-21-dependent manner, whereas IL-23 (highly expressed highly in intestinal mucosa) has a stabilizing role by maintaining the T_{H17} phenotype in long-term cultures. T-cell activation eventually triggers an

inflammatory response, which results in the recruitment of humoral and cellular factors of innate immunity (including peptides, soluble lectins, neutrophils and macrophages) and that also provides help for specific antibody production.⁷⁷⁻⁸⁰ Immune homeostasis is maintained in healthy tissues by interdependent control exerted by T_H1 and T_H2 cytokines and by T_{REGS} (Fig. 1a) (reviewed elsewhere^{71, 73, 75, 81}).

Perturbations that cause dysbiosis in the microbiome can disrupt immune homeostasis, resulting in unregulated, untargeted immune defense and intestinal inflammation, manifesting as diseases such as IBD (Table 2). The mechanisms by which fungi influence gastrointestinal diseases are beginning to be investigated. Studies suggest that fungal-associated mucosal inflammation (effected by T_H17 or T_H2 cells) or tolerance (effected by T_H1 or T_{REG} cells) is dependent on the intracellular pathways activated by the interaction of fungal-derived molecules and PRRs. Immunoregulatory activity is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase, which is widely involved in host immune homeostasis and immune evasion by microbes, leading to commensalism.⁸²⁻⁸⁴

T_H2 pathway-dependent activation of plasma cells to detect fungal cell wall antigens results in production of antiglycan antibodies (for example ASCA, ALCA and ACCA), which are released into the blood. The T_H1 or T_H17 pathways become unregulated (for example owing to absence or insufficient levels of T_{REGS}), which triggers recruitment of immunocytes and unregulated production of proinflammatory molecules. This step in turn results in tissue damage mediated

by reactive oxygen species, proteolytic peptides and enzymes, eventually manifesting as gastrointestinal diseases (Fig. 1b).

The mechanism by which fungi aggravate the inflammatory response in gastrointestinal disease is likely to involve multiple steps. Aggravation can be dependent or independent of dectin and can be disease-specific. Moreover, during colonization or infection it is possible that *Candida* releases cell wall mannan, glucan and chitin inducing the production of antiglycan antibodies.^{46, 85} The end result of fungal and host immune system interactions is worsening of the inflammatory process in gastrointestinal disease.^{55, 86}

Another fungal PAMP that interacts with host immune cells is chitin, a fungal cell wall polysaccharide. Mora-Montes *et al.*⁸⁷ reported that *Candida* chitin blocked pathogen recognition by human peripheral blood mononuclear cells and mouse macrophages, thus indirectly reducing cytokine production. Interestingly, the immune blocking effect of chitin was dectin-1-dependent but independent of the effect of bacterial cells, lipopolysaccharide, TLR2, TLR4 or Mincle (the macrophage-inducible C-type lectin).

The ability of fungal PAMPs to indirectly modulate immune function in the setting of IBD is demonstrated in studies with Crohn's-disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC, strain HM605), which—in contrast to commensal *E. coli*—colonizes the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease and replicates extensively within epithelial and macrophage cells.⁸⁸⁻⁹⁰ Mpofu *et al.*⁹¹ evaluated the effect of *S. cerevisiae* mannan on the phagocytic function of immunocytes (monocytes, monocyte-derived macrophages and

neutrophils) in vitro, and showed that mannan induced a dose-dependent increase in the survival of AIEC within adherent monocytes by ~fivefold (from 24% ± 10.5% without mannan to 114% ± 22.7% with mannan; $P = 0.0002$), as well as in macrophage vesicles. Moreover, mannan (1 mg/ml) inhibited the respiratory burst in neutrophils and monocytes and bacterial killing within monocyte-derived macrophages. Survival of AIEC was increased in macrophages isolated from *TLR4*^{-/-} and *MyD88*^{-/-} knockout mice compared with wild-type mice, demonstrating that TLR4 and MyD88 recognize mannan and are involved in bacterial killing by macrophages. Moreover, gut colonization with *C. albicans* in mice increases secondary inflammation primarily induced with DSS as evidenced by the presence of myeloperoxidase activity and increased TNF and TLR2 expression in tissues of AIEC-colonized mice.⁵⁵ Immune responses to *C. albicans* have been shown to be different depending on the morphotypes.^{92, 93} Production of IL-12 was preferentially induced by yeasts whereas production of IL-23 was preferentially induced by hyphae. However, the mechanisms underlying this dichotomy have not yet been elucidated. Taken together, an important role for fungal PAMPs in modulating the phagocytic function of immune cells might exist in the setting of Crohn's disease.

The ability of fungi to modulate immune cells can also be species dependent. Separate studies have investigated the response of macrophages to different species of *Candida* (*C. albicans* or *C. parapsilosis*).^{94, 95} Monk *et al.*⁹⁴ analyzed expression of small regulatory RNAs (miRNAs) in mouse macrophages challenged with heat-killed *C. albicans* or lipopolysaccharide (a TLR4 ligand),

and showed that both *C. albicans* and LPS up-regulated levels of miR-146, miR-155, miR-455 and miR-125a, transcription factors associated with these miRNAs (NFkappaB), as well as ERK1/2 and p38 MAPK pathways. These investigators also showed that the anti-inflammatory cytokine IL-10 induced miR-146a and b, while inhibiting miR-155 levels. In a separate study, Nemeth *et al.*⁹⁵ identified 155 and 511 differentially regulated genes in macrophages exposed to *C. parapsilosis* for 3 and 8 hours, respectively. Genes regulating the production of inflammatory cytokines such as TNF, IL-1, IL-15, and TNF-receptor family member TNFRSF9 (associated with T_H1 responses) were considerably upregulated. These results demonstrated significant differences between the response of macrophages to *C. parapsilosis* and *C. albicans*. Such species-dependent induction of host immune pathways might be of particular relevance in the setting of IBD, as it is possible that the changes in immune status of affected tissues could be triggered by genus-level as well as species-level changes in the mycobiome.

Conclusions [head 1]

Studies performed to date on the role of the mycobiome in gastrointestinal diseases have just started to scratch the surface and demonstrate that the fungal community is a critical player in the pathogenesis of these diseases. Although studies performed so far have started to characterize the mycobiome in health and disease and show potential links, it is important to note that such links reflect association rather than causation. Moreover, most studies have focused on the role of *Candida* and its effect on the host immune system. Focusing on one

microbial kingdom (bacteria or fungi) while analyzing the microbiome in a sample (for example, oral wash, gut biopsies or faecal pellets) provides limited insight.⁹⁶ To expand our knowledge and obtain deeper insight into the role of the microbiome in health and disease, future studies should also characterize the different organisms (bacteria, fungi and viruses) in the same sample types.

There is still a long way to go and several questions remain to be answered regarding the contribution of the gut mycobiome to the pathogenesis of gastrointestinal diseases (Box 1).

- Do fungal–fungal interactions influence the host immune system? Are these influences, driven by direct or indirect mechanisms? Are the interactions species-specific?
- Does the mycobiome modulate the host immune system in a disease-specific manner?
- How do fungi and bacteria interact to influence gastrointestinal disease?
- What is the effect of antifungal therapies on gastrointestinal disease?
- What is the effect of treatment of gastrointestinal disease on the mycobiome?
- Is the role of the human mycobiome in gastrointestinal disease influenced by diet, ethnicity, or types of living (urban vs rural)?

Research funding to address these questions will be instrumental and will lead the way to develop novel approaches to prevent, manage and treat gastrointestinal disease.

ACKNOWLEDGMENTS

Funding support is acknowledged from the NIH/NIDCR [R01DE17846, R01DE024228 and the Oral HIV AIDS Research Alliance (BRS-ACURE-S-11-000049-110229 and AI-U01-68636) to M.A.G. Support from NIH/NEI and NIH/NIAID (R21EY021303 and R21AI074077), pilot funding from the Infectious Diseases Drug Development Center (IDDDC, Case), the National Eczema Association (Research Grant) and the National Psoriasis Foundation (Discovery Award) to P.K.M. Support from the CWRU/UH Center for AIDS Research (CFAR, NIH grant number P30 AI036219) and funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7-2007-2013) under HEALTH-F2-2010-260338-ALLFUN and by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique du Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville PHRC 1918, 2011 Candigène, France, to B.S.

| Table 1. Variables influencing the microbiome | | | |
|--|---|---|---|
| Reference | Microbial Community Studied | Sample Type | Variable |
| Mukherjee <i>et al.</i> (2014) ¹⁷ | Oral bacteriome and mycobiome | Oral wash samples collected from uninfected and HIV-infected patients | <ul style="list-style-type: none"> • HIV affected correlations between microbes • 23 statistically significant fungal–fungal interactions in uninfected individuals and six interactions in patients infected with HIV were noted |
| Navazesh <i>et al.</i> (2005) ¹⁸ | Microbial | Whole saliva collected from women infected with HIV | <ul style="list-style-type: none"> • HAART affected the prevalence of different microbes |
| Dollive <i>et al.</i> (2012) ²⁹ | Mycobiome | Faecal samples from healthy volunteers | <ul style="list-style-type: none"> • GI tract contained <i>Aspergillus</i>, <i>Cryptococcus</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Pneumocystis</i> and Saccharomycetaceae yeasts |
| Hoffmann <i>et al.</i> (2013) ³⁰ | Fungal, bacterial and archaeal components of the gut microbiota | Fecal samples from individuals on diet rich in animal proteins or carbohydrates | <ul style="list-style-type: none"> • Fungi showed significant correlation with consumption of carbohydrate-rich diet only • Methanobrevibacter and <i>Candida</i> were positively associated with carbohydrate-rich diet, but negatively with protein-rich diet |
| Angebault <i>et al.</i> (2013) ³³ | Mycobiome | Fecal samples from Wayampi Amerindians living in French Guiana | <ul style="list-style-type: none"> • Colonization by <i>Candida</i> spp. Varies between industrialized and remote communities • Persistently low prevalence of <i>C. albicans</i>, but high prevalence of <i>C. krusei</i> and <i>S. cerevisiae</i> in |

| | | | |
|--|-------------------------------------|---|---|
| | | | remote communities |
| Ott <i>et al.</i> (2008) ³⁴ | Mycobiome | Intestinal mucosa and stool samples from patients with Crohn's disease or ulcerative colitis | <ul style="list-style-type: none"> • Gut mycobiome was substantially different from mucosal mycobiome • Higher mean fungal diversity in patients with Crohn's disease (CD) compared to controls • No disease-specific fungal species found in the CD and ulcerative colitis (UC) group |
| Trojanowska <i>et al.</i> (2010) ⁵⁶ | Mycobiome | Throat smears, colonic biopsies, colonic aspirate, brush smears, and faecal samples obtained from healthy individuals and patients with ulcerative colitis or Crohn's disease | <ul style="list-style-type: none"> • IBD results in a shift in the profile of non-<i>albicans Candida</i> • Gastrointestinal location doesn't affect <i>C. albicans</i> colonization • <i>C. albicans</i> strains isolated from the oral cavity were similar to those isolated from different segments of the gastrointestinal tract |
| Van der Velden <i>et al.</i> (2013) ⁶⁴ | <i>Candida</i> colonization in GVHD | Allogeneic stem cell transplant patients | <ul style="list-style-type: none"> • Acute GVHD substantially associated with increase in <i>Candida</i> colonization • Patients treated with fluconazole tended to have a lower likelihood of developing GVHD |
| Chen <i>et al.</i> (2011) ⁶⁷ | Mycobiome | Patients with chronic HBV | <ul style="list-style-type: none"> • Fungal diversity was positively correlated with progression of disease |
| Abbreviations: HAART, highly active antiretroviral therapy; GVHD, graft-versus-host disease. | | | |

| Table 2. Fungi and host immune system interactions in gastrointestinal disease | | |
|--|--|--|
| Reference | Fungi and/or cellular component | Effect on host immune system |
| Standaert-Vitse <i>et al.</i> (2009) ⁴⁶ & Sendid <i>et al.</i> (2009) ⁸⁵ | Mannan, glucan and chitin proteins from <i>Candida</i> cell wall | <ul style="list-style-type: none"> • Induce production of anti-glycan antibodies |
| Mora-Montes <i>et al.</i> (2011) ⁸⁷ | Chitin from <i>C. albicans</i> cell walls | <ul style="list-style-type: none"> • Dectin-1-dependent block of pathogen recognition by human monocytes and mouse macrophages |
| Mpofu <i>et al.</i> (2007) ⁹¹ | Mannan protein from <i>S. cerevisiae</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Induces dose-dependent increase in the survival of Crohn's disease-associated AIEC within monocytes and macrophages • Inhibits the respiratory burst in neutrophils and monocytes and bacterial killing within monocyte-derived macrophages. • Survival of AIEC was increased in the absence of TLR4 and MyD88 |
| Jawhara <i>et al.</i> (2008) ⁵⁵ | <i>C. albicans</i> colonization | <ul style="list-style-type: none"> • Increased secondary inflammation resulting in elevated myeloperoxidase activity and levels of TNF-α and TLR2 in mouse gut |
| d'Ostiani <i>et al.</i> (2000) ⁹² & Acosta-Rodriguez <i>et al.</i> (2007) ⁹³ | <i>Candida</i> challenge | <ul style="list-style-type: none"> • Immune responses to <i>C. albicans</i> were different depending on morphotype • Production of IL-12 was preferentially induced by yeasts whereas production of IL-23 was preferentially induced by hyphae |
| Nemeth <i>et al.</i> (2014) ⁹⁵ | <i>C. parapsilosis</i> challenge | <ul style="list-style-type: none"> • 155 and 511 differentially regulated genes in macrophages exposed to <i>C. parapsilosis</i> for 3 and 8 hours • Upregulation of genes regulating the production of proinflammatory cytokines |
| Monk <i>et al.</i> (2010) ⁹⁴ | <i>C. albicans</i> challenge | <ul style="list-style-type: none"> • <i>C. albicans</i> induces |

| | | |
|--|--|---|
| | | <p>expression of small regulatory RNAs (miRNA), in mouse macrophages, which modulate pattern recognition receptor signalling.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linked to NF-κB, ERK1/2 and p38 MAPK pathways, and anti-inflammatory IL-10 expression |
| <p>Abbreviations: AIEC, adherent-invasive <i>E. coli</i>; ERK1/2, extracellular signal regulated kinase 1/2; MAPK, mitogen activated protein kinase; miRNA, microRNA; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TLR, toll-like receptor; TNF, tumour necrosis factor;</p> | | |

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Normal and abnormal interactions between fungi and the host immune system in gastrointestinal tissue. APCs present fungal antigens as MHC class II conjugates to T-cell receptors on naïve T cells. T cells then differentiate into helper T cells (T_H1 or T_H17), which secrete different proinflammatory and anti-inflammatory cytokines leading to recruitment of humoral and cellular factors of innate immunity. (a) In healthy tissues, immune homeostasis is maintained by interdependent control exerted by T_H1 cytokines and regulatory T cells (T_{REGS}). (b) In patients with IBD, dysfunctional regulation of T_H1 or T_H17 pathways triggers an unregulated inflammatory response and recruitment of innate immune cells. Increases in cytokine levels can trigger oxidative tissue damage, and recruitment of proteolytic peptides and enzymes, eventually manifesting as gastrointestinal disease. Furthermore, activation of the T_H2 pathway can lead to plasma cells detecting fungal cell wall antigens and producing antiglycan antibodies (ASCA, ALCA and ACCA). Abbreviations: APC, antigen presenting cell; PRR, pattern recognitions receptor; PAMP, pathogen associated molecular pattern; T_H , T helper cell; IFN- γ , interferon γ ; TNF- α , tumour necrosis factor α ; T_{REG} , regulatory T cell; ROS, reactive oxygen species; NO, nitrogen oxide; T0, naïve T cell; ASCA, anti-*S. cerevisiae* antibodies; ALCA, anti-laminaribioside carbohydrate IgG antibodies; ACCA, anti-chitobioside carbohydrate IgA antibodies.

REFERENCES CITED

1. Odds, F.C. Candidosis and the Gastrointestinal Tract *in: Candida and Candidosis*. Ch. 15. 156-63 (Bailliere Tindall, London, 1988).
2. Parrot, J. Note sur un cas de muguet du gros intestin. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique* **3**, 621-5 (1870).
3. Parrot, J. Du muguet gastrique et de quelques autres localisations de ce parasite. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique* **2**, 579-99 (1869).
4. Ludlam, G. & Henderson, J. Neonatal thrush in a maternity hospital. *The Lancet* **239**, 64-70 (1942).
5. Goodrich, J.K. et al. Conducting a Microbiome Study. *Cell* **158**, 250-262 (2014).
6. Norman, J.M., Handley, S.A. & Virgin, H.W. Kingdom-agnostic metagenomics and the importance of complete characterization of enteric microbial communities. *Gastroenterology* **146**, 1459-69 (2014).
7. Morgan, X.C. & Huttenhower, C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002808 (2012).
8. Gencosmanoglu, R. et al. Mid-esophageal ulceration and candidiasis-associated distal esophagitis as two distinct clinical patterns of tetracycline or doxycycline-induced esophageal injury. *J Clin Gastroenterol* **38**, 484-9 (2004).
9. Sano, T., Ozaki, K., Kodama, Y., Matsuura, T. & Narama, I. Antimicrobial agent, tetracycline, enhanced upper alimentary tract *Candida albicans* infection and its related mucosal proliferation in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicol Pathol* **40**, 1014-9 (2012).
10. Wiesner, S.M., Jechorek, R.P., Garni, R.M., Bendel, C.M. & Wells, C.L. Gastrointestinal colonization by *Candida albicans* mutant strains in antibiotic-treated mice. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 192-5 (2001).
11. Mellado, E. et al. Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. *Diagn Microbiol Infect Dis* **38**, 21-8 (2000).
12. DeMaria, A., Buckley, H. & von Lichtenberg, F. Gastrointestinal candidiasis in rats treated with antibiotics, cortisone, and azathioprine. *Infect Immun* **13**, 1761-70 (1976).
13. Helstrom, P.B. & Balish, E. Effect of oral tetracycline, the microbial flora, and the athymic state on gastrointestinal colonization and infection of BALB/c mice with *Candida albicans*. *Infect Immun* **23**, 764-74 (1979).
14. Clark, J.D. Influence of antibiotics or certain intestinal bacteria on orally administered *Candida albicans* in germ-free and conventional mice. *Infect Immun* **4**, 731-7 (1971).
15. Dollive, S. et al. Fungi of the murine gut: episodic variation and proliferation during antibiotic treatment. *PLoS One* **8**, e71806 (2013).
16. Faust, K. et al. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002606 (2012).

17. Mukherjee, P.K. et al. Oral Mycobiome Analysis of HIV-Infected Patients: Identification of *Pichia* as an Antagonist of Opportunistic Fungi. *PLoS Pathogens* **10**, e1003996 (2014).
18. Navazesh, M. et al. The effect of HAART on salivary microbiota in the Women's Interagency HIV Study (WIHS). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **100**, 701-8 (2005).
19. Cruz, M.R., Graham, C.E., Gagliano, B.C., Lorenz, M.C. & Garsin, D.A. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* (2012).
20. Mondot, S. et al. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **17**, 185-92 (2011).
21. Kang, S. et al. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflamm Bowel Dis* **16**, 2034-42 (2010).
22. Workman, S.N., Been, F.E., Crawford, S.R. & Lavoie, M.C. Bacteriocin-like inhibitory substances from *Campylobacter* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**, 435-6 (2008).
23. Ghannoum, M.A. et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *PLoS Pathogens* **6**, e1000713 (2010).
24. Jawhara, S. et al. Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions. *PLoS One* **7**, e40648 (2012).
25. Jawhara, S. & Poulain, D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med Mycol* **45**, 691-700 (2007).
26. Samonis, G. et al. *Saccharomyces boulardii* and *Candida albicans* experimental colonization of the murine gut. *Med Mycol* **49**, 395-9 (2011).
27. Demirel, G. et al. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* versus nystatin for the prevention of fungal colonization and invasive fungal infection in premature infants. *Eur J Pediatr* **172**, 1321-6 (2013).
28. Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K. & Stoneking, M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* **19**, 636-643 (2009).
29. Dollive, S. et al. A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. *Genome Biol* **13**, R60 (2012).
30. Hoffmann, C. et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* **8**, e66019 (2013).
31. Sartor, R.B. Gut microbiota: Diet promotes dysbiosis and colitis in susceptible hosts. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 561-2 (2012).
32. Goldsmith, J.R. & Sartor, R.B. The role of diet on intestinal microbiota metabolism: downstream impacts on host immune function and health, and therapeutic implications. *J Gastroenterol* **49**, 785-98 (2014).
33. Angebault, C. et al. *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians. *J Infect Dis* **208**, 1705-16 (2013).
34. Ott, S.J. et al. Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* **43**, 831-41 (2008).

35. Ramaswamy, K., Correa, M. & Koshy, A. Non-healing gastric ulcer associated with *Candida* infection. *Indian J Med Microbiol* **25**, 57-8 (2007).
36. Santelmann, H. & Howard, J.M. Yeast metabolic products, yeast antigens and yeasts as possible triggers for irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **17**, 21-6 (2005).
37. Krause, R. & Reisinger, E.C. *Candida* and antibiotic-associated diarrhoea. *Clin Microbiol Infect* **11**, 1-2 (2005).
38. Stringer, A.M. et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**, 430-41 (2009).
39. Cominelli, F. Inhibition of leukocyte trafficking in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **369**, 775-6 (2013).
40. Nielsen, O.H. & Ainsworth, M.A. Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* **369**, 754-762 (2013).
41. Abraham, C. & Cho, J.H. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **361**, 2066-78 (2009).
42. McKenzie, H., Main, J., Pennington, C.R. & Parratt, D. Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut* **31**, 536-8 (1990).
43. Poulain, D. et al. Yeasts: neglected pathogens. *Dig Dis* **27 Suppl 1**, 104-10 (2009).
44. Colombel, J.F., Sendid, B., Jouault, T. & Poulain, D. Secukinumab failure in Crohn's disease: the yeast connection? *Gut* **62**, 800-1 (2013).
45. Sendid, B. et al. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **93**, 1306-10 (1998).
46. Standaert-Vitse, A. et al. *Candida albicans* colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **104**, 1745-53 (2009).
47. Sendid, B. et al. Antibodies against glucan, chitin, and *Saccharomyces cerevisiae* mannan as new biomarkers of *Candida albicans* infection that complement tests based on *C. albicans* mannan. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 1868-77 (2008).
48. Vasseur, F. et al. Variants of NOD1 and NOD2 genes display opposite associations with familial risk of Crohn's disease and anti-*saccharomyces cerevisiae* antibody levels. *Inflamm Bowel Dis* **18**, 430-8 (2012).
49. Standaert-Vitse, A. et al. *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**, 1764-75 (2006).
50. Quinton, J.F. et al. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* **42**, 788-91 (1998).
51. Seow, C.H. et al. Novel anti-glycan antibodies related to inflammatory bowel disease diagnosis and phenotype. *Am J Gastroenterol* **104**, 1426-34 (2009).
52. Dotan, I. et al. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* **131**, 366-78 (2006).
53. Ferrante, M. et al. New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* **56**, 1394-403 (2007).

54. Kaul, A. et al. Serum anti-glycan antibody biomarkers for inflammatory bowel disease diagnosis and progression: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* **18**, 1872-84 (2012).
55. Jawhara, S. et al. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* **197**, 972-80 (2008).
56. Trojanowska, D. et al. The role of *Candida* in inflammatory bowel disease. Estimation of transmission of *C. albicans* fungi in gastrointestinal tract based on genetic affinity between strains. *Med Sci Monit* **16**, CR451-7 (2010).
57. Iliiev, I.D. et al. Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. *Science* **336**, 1314-1317 (2012).
58. Brown, G.D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**, 1119-24 (2003).
59. de Vries, H.S. et al. Genetic association analysis of the functional c.714T>G polymorphism and mucosal expression of dectin-1 in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* **4**, e7818 (2009).
60. Iliiev, I.D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M. & Rescigno, M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol* **2**, 340-350 (2009).
61. Penack, O., Holler, E. & van den Brink, M.R. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* **115**, 1865-72 (2010).
62. Shlomchik, W.D. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* **7**, 340-52 (2007).
63. Marr, K.A. et al. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Blood* **96**, 2055-61 (2000).
64. van der Velden, W.J. et al. Role of the mycobiome in human acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **19**, 329-32 (2013).
65. Tawara, I. et al. Influence of donor microbiota on the severity of experimental graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **19**, 164-8 (2013).
66. Holler, E. et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **20**, 640-5 (2014).
67. Chen, Y. et al. Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* **70**, 492-8 (2011).
68. Brown, K.S., Ryder, S.D., Irving, W.L., Sim, R.B. & Hickling, T.P. Mannan binding lectin and viral hepatitis. *Immunol Lett* **108**, 34-44 (2007).
69. Knoke, M. [Gastrointestinal microecology of humans and *Candida*]. *Mycoses* **42 Suppl 1**, 30-4 (1999).
70. Thomas, H.C. et al. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* **348**, 1417-9 (1996).

71. Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **11**, 275-88 (2011).
72. Ashman, R.B. & Papadimitriou, J.M. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiological Reviews* **59**, 646- 672 (1995).
73. Romani, L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 363-367 (1999).
74. Nelson, R.D., Shibata, N., Podzorski, R.P. & Herron, M.J. *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 1-19 (1991).
75. Quintin, J. et al. Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice. *Eur J Immunol* (2014).
76. Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J. & Gow, N.A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**, 67-78 (2008).
77. Hernandez-Santos, N. et al. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunol* **6**, 900-10 (2013).
78. Zelante, T. et al. Sensing of mammalian IL-17A regulates fungal adaptation and virulence. *Nat Commun* **3**, 683 (2012).
79. Dominguez-Villar, M. & Hafler, D.A. An Innate Role for IL-17. *Science* **332**, 47-48 (2011).
80. Puel, A. et al. Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Humans with Inborn Errors of Interleukin-17 Immunity. *Science* **332**, 65-8 (2011).
81. Underhill, D.M. & Iliev, I.D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol* **14**, 405-16 (2014).
82. Romani, L. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in inflammation and allergy to *Aspergillus*. *Medical Mycology* **47 Suppl 1**, S154-S161 (2009).
83. Zelante, T., Fallarino, F., Bistoni, F., Puccetti, P. & Romani, L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect* **11**, 133-41 (2009).
84. Bonifazi, P. et al. Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal *Candida albicans*. *Mucosal Immunol* **2**, 362-74 (2009).
85. Sendid, B. et al. [Anti-glycan antibodies establish an unexpected link between *C. albicans* and Crohn disease]. *Med Sci (Paris)* **25**, 473-81 (2009).
86. Gerard, R., Sendid, B., Colombel, J.F., Poulain, D. & Jouault, T. An immunological link between *Candida albicans* colonization and Crohn's disease. *Crit Rev Microbiol* (2013).
87. Mora-Montes, H.M. et al. Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* **79**, 1961-70 (2011).
88. Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B. & Darfeuille-Michaud, A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* **67**, 4499-509 (1999).
89. Barnich, N. & Darfeuille-Michaud, A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* **23**, 16-20 (2007).

90. Clarke, D.J. et al. Complete genome sequence of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain HM605. *J Bacteriol* **193**, 4540 (2011).
91. Mpofo, C.M. et al. Microbial mannan inhibits bacterial killing by macrophages: a possible pathogenic mechanism for Crohn's disease. *Gastroenterology* **133**, 1487-98 (2007).
92. d'Ostiani, C.F. et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 1661-1674 (2000).
93. Acosta-Rodriguez, E.V. et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* **8**, 639-46 (2007).
94. Monk, C.E., Hutvagner, G. & Arthur, J.S. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. *PLoS One* **5**, e13669 (2010).
95. Nemeth, T. et al. Transcriptome profile of the murine macrophage cell response to *Candida parapsilosis*. *Fungal Genet Biol* (2014).
96. Ghannoum, M.A. & Mukherjee, P.K. The Microbiome: More than Bacteria (Letter). *Microbe* **5** (2010).

COMPETING INTERESTS:

P.K.M., B.S., G.H., D.P. and M.A.G. declare no competing interests.

J.F.C. has served as consultant, advisory board member or speaker for Abbvie, ABScience, Amgen, Bristol Meyers Squibb, Celltrion, Danone, Ferring, Genentech, Giuliani SPA, Given Imaging, Janssen, Immune Pharmaceuticals, Merck, Millenium Pharmaceuticals, Nutrition Science Partners, Pfizer Prometheus Laboratories, Protagonist, Receptos, Sanofi, Schering Plough Corporation, Second Genome, Takeda, Teva Pharmaceuticals, UCB Pharma, Vertex and Dr. August Wolff.

BIOGRAPHIES:

Pranab K. Mukherjee, PhD, is Assistant Professor at Center for Medical Mycology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA. Dr. Mukherjee was key member of the team that described the mycobiome for the first time, microbiome in chronic wounds, and more recently the association of mycobiome and bacteriome with immunosuppressive disease (HIV infection). His research interests are the role of fungal microbiome in health and disease, and the interplay between microbiome and host immune system.

Boualem Sendid, PhD, obtained his Medical biologist diploma and PhD from University Lille 2, France. He joined the department of parasitology and mycology, University Hospital of Lille, France in 2002. He was appointed Hospital Practitioner at Lille University Hospital and was promoted to Professor of Parasitology Mycology in 2011. He is now Head of Parasitology Mycology Department at University Lille 2 and Deputy Director of Microbiology Institute at University Hospital of Lille. His expertise concerns, pathophysiology of invasive fungal diseases, glycan recognition by adaptive immunity and its diagnosis significance for *Candida* invasion and yeast associated inflammation.

Gautier Hoarau, MD, received his M.D. and MSc from the University of Grenoble, France. He joined the department of parasitology and mycology, University Hospital of Lille, France in 2012. His research focused on the fungal microbiome in Crohn's disease.

Jean-Frédéric Colombel, MD is Professor of Medicine and Director of the Helmsley IBD Center at Icahn School of Medicine in New York, NY, USA. He is past-president of ECCO (European Crohn's and colitis organization) and past-chair of the International Organization for Inflammatory Bowel Disease (IOIBD). He is the author or co-author of more than 60 peer-reviewed articles, books, and book chapters. He is also associate editor of *Alimentary Pharmacology Therapy*, and serves as an editorial board member or a reviewer for several journals including *Gut*, *Journal of Crohn's and Colitis*, and *Nature Reviews in Gastroenterology and Hepatology*. His research interest is in inflammatory bowel diseases.

Daniel Poulain, PhD, is former Head of Inserm Unit 799 "Candida and Candidosis" and Parasitology-Mycolology Department of Lille University Hospital, and is currently an Honorary Professor at Lille Faculty of Medicine-Lille2 University and consultant for Clinical Research and Innovation at Lille University Hospital. His main research interest were on Candida cell wall ultrastructure, architecture and biogenesis of mannosides in relation with host recognition. This concerned b and a mannosides acting as immunomodulatory adhesins through interaction with innate and adaptive immunity. Translational clues from this approach concerned mechanisms of invasive candidiasis and inflammatory bowel diseases leading to the description of new clinical biomarkers. More than 200 papers concern this research in a wide variety of journals. His current interest is tracking Candida derived molecules from their expression in yeast to their role in patient sera by using physico-chemical analysis.

Mahmoud A. Ghannoum, PhD, is Professor and Director of the Center for Medical Mycology (CMM) at Case Western Reserve University and University Hospitals Case Medical Center, Cleveland, Ohio, USA. Dr. Ghannoum spent his academic career studying medically important fungi, and published over 290 peer-reviewed articles addressing various aspects of microbial pathogenesis. He led the research to publish the first study describing the oral mycobiome in health, and in separate studies investigated the bacterial bacteriome of chronic venous insufficiency wounds in patients, and identified the core bacteriome and mycobiome in HIV setting, and identified HIV-specific changes in the mycobiome. Hi research interests are mycobiome, microbiome, biofilms, and their role in health and disease.

REVIEW CRITERIA:

Articles discussed in this review were selected based on online PubMed search using the search terms "microbiome", "gastrointestinal diseases", "mycobiome", and "immune response". Search results were further filtered to select for "fungi". The date range for search was for the "past 20 years", although historic literature was also reviewed when necessary to generate evidence for long-term themes in microbial pathogenesis. Only full-text papers in English were the focus of this review.

Article 3: Bacteriome and Mycobiome Interactions Reveal Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease (MBio)

Hoarau G, Mukherjee PK, Gower-Rousseau C, Hager C, Chandra J, Retuerto MA, Neut C, Vermeire S, Clemente J, Colombel JF, Fujioka, H, Poulain D, Sendid B, Ghannoum MA

Cet article original décrit, par une approche métagénomique la composition des flores fongique et bactérienne, au cours de formes familiales de maladie de Crohn. Les résultats de cette publication sont repris dans la partie résultats de cette thèse.

Dans cet article, nous avons caractérisé le mycobiome et le bactériome dans des formes familiales de maladie de Crohn. Nous avons identifié des espèces fongiques (*Candida tropicalis*), et des espèces bactériennes (*E. coli*, et *S. marcescens*), potentiellement impliquées dans la dysbiose. Les taux d'ASCA, marqueur sérologique de maladie de Crohn, étaient corrélés à la présence de *C. tropicalis*. De plus nous avons identifié des interactions entre *C. tropicalis*, *E. coli*, et *S. marcescens* chez les patients atteints de maladie de Crohn, et validé ces interactions dans un modèle de biofilm. Ces résultats originaux soulignent le rôle de ces interactions dans le déclenchement de la réponse inflammatoire intestinale.

Bibliographie

- Aamodt, G., G. Bukholm, J. Jahnsen, B. Moum, M. H. Vatn, and IBSEN Study Group. 2008. "The association between water supply and inflammatory bowel disease based on a 1990-1993 cohort study in southeastern Norway." *Am J Epidemiol* 168 (9):1065-72. doi: 10.1093/aje/kwn218.
- Alvarez, H. M., and A. Steinbüchel. 2002. "Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms." *Appl Microbiol Biotechnol* 60 (4):367-76. doi: 10.1007/s00253-002-1135-0.
- Angebault, C., F. Djossou, S. Abélanet, E. Permal, M. Ben Soltana, L. Diancourt, C. Bouchier, P. L. Woerther, F. Catzefflis, A. Andremont, C. d'Enfert, and M. E. Bougnoux. 2013. "Candida albicans is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians." *J Infect Dis* 208 (10):1705-16. doi: 10.1093/infdis/jit389.
- Arrieta, M. C., L. T. Stiemsma, N. Amenyogbe, E. M. Brown, and B. Finlay. 2014. "The intestinal microbiome in early life: health and disease." *Front Immunol* 5:427. doi: 10.3389/fimmu.2014.00427.
- Balish, E., R. D. Wagner, A. Vázquez-Torres, C. Pierson, and T. Warner. 1998. "Candidiasis in interferon-gamma knockout (IFN-gamma-/-) mice." *J Infect Dis* 178 (2):478-87.
- Bandara, H. M., O. L. Lam, R. M. Watt, L. J. Jin, and L. P. Samaranayake. 2010. "Bacterial lipopolysaccharides variably modulate in vitro biofilm formation of Candida species." *J Med Microbiol* 59 (Pt 10):1225-34. doi: 10.1099/jmm.0.021832-0.
- Baumgart, D. C., and W. J. Sandborn. 2007. "Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies." *Lancet* 369 (9573):1641-57. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60751-X.
- Baumgart, D. C., and W. J. Sandborn. 2012. "Crohn's disease." *Lancet* 380 (9853):1590-605. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60026-9.
- Becker, C., S. Wirtz, M. Blessing, J. Pirhonen, D. Strand, O. Bechthold, J. Frick, P. R. Galle, I. Autenrieth, and M. F. Neurath. 2003. "Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells." *J Clin Invest* 112 (5):693-706. doi: 10.1172/JCI17464.
- Bellemain, E., T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberlet, and H. Kausrud. 2010. "ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases." *BMC Microbiol* 10:189. doi: 10.1186/1471-2180-10-189.
- Benjamin, J., G. K. Makharia, V. Ahuja, M. Kalaivani, and Y. K. Joshi. 2008. "Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's disease." *World J Gastroenterol* 14 (9):1399-405.
- Bonifazi, P., T. Zelante, C. D'Angelo, A. De Luca, S. Moretti, S. Bozza, K. Perruccio, R. G. Iannitti, G. Giovannini, C. Volpi, F. Fallarino, P. Puccetti, and L. Romani. 2009. "Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal Candida albicans." *Mucosal Immunol* 2 (4):362-74. doi: 10.1038/mi.2009.17.
- Boudeau, J., A. L. Glasser, E. Masseret, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud. 1999. "Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease." *Infect Immun* 67 (9):4499-509.

- Bourreille, A., G. Cadiot, G. Le Dreau, D. Laharie, L. Beaugerie, J. L. Dupas, P. Marteau, P. Rampal, D. Moyses, A. Saleh, M. E. Le Guern, J. P. Galmiche, and FLORABEST Study Group. 2013. "Saccharomyces boulardii does not prevent relapse of Crohn's disease." *Clin Gastroenterol Hepatol* 11 (8):982-7. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.021.
- Branzk, N., A. Lubojemska, S. E. Hardison, Q. Wang, M. G. Gutierrez, G. D. Brown, and V. Papayannopoulos. 2014. "Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens." *Nat Immunol* 15 (11):1017-25. doi: 10.1038/ni.2987.
- Cadwell, K., K. K. Patel, N. S. Maloney, T. C. Liu, A. C. Ng, C. E. Storer, R. D. Head, R. Xavier, T. S. Stappenbeck, and H. W. Virgin. 2010. "Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine." *Cell* 141 (7):1135-45. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.009.
- Cantelli, C., P. A. Trinel, A. Bernigaud, T. Jouault, L. Polonelli, and D. Poulain. 1995. "Mapping of beta-1,2-linked oligomannosidic epitopes among glycoconjugates of *Candida* species." *Microbiology* 141 (Pt 10):2693-7. doi: 10.1099/13500872-141-10-2693.
- Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Peña, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld, and R. Knight. 2010. "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." *Nat Methods* 7 (5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
- Carrière, J., A. Darfeuille-Michaud, and H. T. Nguyen. 2014. "Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease." *World J Gastroenterol* 20 (34):12102-17. doi: 10.3748/wjg.v20.i34.12102.
- Chai, L. Y., D. W. Denning, and P. Warn. 2010. "Candida tropicalis in human disease." *Crit Rev Microbiol* 36 (4):282-98. doi: 10.3109/1040841X.2010.489506.
- Chandra, J., P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum. 2008. "In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms." *Nat Protoc* 3 (12):1909-24. doi: 10.1038/nprot.2008.192.
- Chassaing, B., and A. Darfeuille-Michaud. 2011. "The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* 140 (6):1720-28. doi: S0016-5085(11)00161-2 [pii] 10.1053/j.gastro.2011.01.054.
- Chehoud, C., L. G. Albenberg, C. Judge, C. Hoffmann, S. Grunberg, K. Bittinger, R. N. Baldassano, J. D. Lewis, F. D. Bushman, and G. D. Wu. 2015. "Fungal Signature in the Gut Microbiota of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease." *Inflamm Bowel Dis* 21 (8):1948-56. doi: 10.1097/MIB.0000000000000454.
- Chen, X., G. Yang, J. H. Song, H. Xu, D. Li, J. Goldsmith, H. Zeng, P. A. Parsons-Wingerter, H. C. Reinecker, and C. P. Kelly. 2013. "Probiotic yeast inhibits VEGFR signaling and angiogenesis in intestinal inflammation." *PLoS One* 8 (5):e64227. doi: 10.1371/journal.pone.0064227.
- Chen, Y., Z. Chen, R. Guo, N. Chen, H. Lu, S. Huang, J. Wang, and L. Li. 2011. "Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection." *Diagn Microbiol Infect Dis* 70 (4):492-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.04.005.

- Chiba, M., K. Mikami, M. Iizuka, M. Yukawa, S. Watanabe, M. Takazoe, T. Fukushima, K. Koganei, and T. Kishibe. 2001. "Elevated plasma (1-->3)-beta-D-glucan, a fungal cell wall constituent, in a subgroup of Crohn disease." *Scand J Gastroenterol* 36 (4):447-8.
- Choteau, L., M. Parny, N. François, B. Bertin, M. Fumery, L. Dubuquoy, K. Takahashi, J. F. Colombel, T. Jouault, D. Poulain, B. Sendid, and S. Jawhara. 2015. "Role of mannose-binding lectin in intestinal homeostasis and fungal elimination." *Mucosal Immunol*. doi: 10.1038/mi.2015.100.
- Colombel, J. F., B. Grandbastien, C. Gower-Rousseau, S. Plegat, J. P. Evrard, J. L. Dupas, J. P. Gendre, R. Modigliani, J. Bélaïche, J. Hostenin, J. P. Hugot, H. van Kruiningen, and A. Cortot. 1996. "Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families." *Gastroenterology* 111 (3):604-7.
- Colombel, J. F., B. Sendid, T. Jouault, and D. Poulain. 2013. "Secukinumab failure in Crohn's disease: the yeast connection?" *Gut* 62 (5):800-1. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304154.
- Cornish, J. A., E. Tan, C. Simillis, S. K. Clark, J. Teare, and P. P. Tekkis. 2008. "The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis." *Am J Gastroenterol* 103 (9):2394-400. doi: 10.1111/j.1572-0241.2008.02064.x.
- Cosnes, J. 2004. "Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18 (3):481-96. doi: 10.1016/j.bpg.2003.12.003.
- Cosnes, J., C. Gower-Rousseau, P. Seksik, and A. Cortot. 2011. "Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* 140 (6):1785-94. doi: S0016-5085(11)00164-8 [pii] 10.1053/j.gastro.2011.01.055.
- Crohn, B. B., L. Ginzburg, and G. D. Oppenheimer. 2000. "Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932." *Mt Sinai J Med* 67 (3):263-8.
- Cui, B., Q. Feng, H. Wang, M. Wang, Z. Peng, P. Li, G. Huang, Z. Liu, P. Wu, Z. Fan, G. Ji, X. Wang, K. Wu, D. Fan, and F. Zhang. 2014. "Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn's disease: Safety, feasibility and efficacy trial results." *J Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1111/jgh.12727.
- Cui, L., A. Morris, and E. Ghedin. 2013. "The human mycobiome in health and disease." *Genome Med* 5 (7):63. doi: 10.1186/gm467.
- Cuskin, F., E. C. Lowe, M. J. Temple, Y. Zhu, E. A. Cameron, N. A. Pudlo, N. T. Porter, K. Urs, A. J. Thompson, A. Cartmell, A. Rogowski, B. S. Hamilton, R. Chen, T. J. Tolbert, K. Piens, D. Bracke, W. Verweken, Z. Hakki, G. Speciale, J. L. Munõz-Munõz, A. Day, M. J. Peña, R. McLean, M. D. Suits, A. B. Boraston, T. Atherly, C. J. Ziemer, S. J. Williams, G. J. Davies, D. W. Abbott, E. C. Martens, and H. J. Gilbert. 2015. "Human gut Bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism." *Nature* 517 (7533):165-9. doi: 10.1038/nature13995.
- Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie, and J. F. Colombel. 2004. "High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease." *Gastroenterology* 127 (2):412-21.
- Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, N. Barnich, E. Lederman, P. Di Martino, P. Desreumaux, L. Gambiez, B. Joly, A. Cortot, and J. F. Colombel. 1998. "Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease." *Gastroenterology* 115 (6):1405-13.

- De Cruz, P., S. Kang, J. Wagner, M. Buckley, W. H. Sim, L. Prideaux, T. Lockett, C. McSweeney, M. Morrison, C. D. Kirkwood, and M. A. Kamm. 2015. "Association between specific mucosa-associated microbiota in Crohn's disease at the time of resection and subsequent disease recurrence: a pilot study." *J Gastroenterol Hepatol* 30 (2):268-78. doi: 10.1111/jgh.12694.
- De Jesus, M., G. R. Ostroff, S. M. Levitz, T. R. Bartling, and N. J. Mantis. 2014. "A population of Langerin-positive dendritic cells in murine Peyer's patches involved in sampling β -glucan microparticles." *PLoS One* 9 (3):e91002. doi: 10.1371/journal.pone.0091002.
- De Jesus, M., A. E. Rodriguez, H. Yagita, G. R. Ostroff, and N. J. Mantis. 2015. "Sampling of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by Langerin-positive dendritic cells in mouse Peyer's patches." *Immunol Lett* 168 (1):64-72. doi: 10.1016/j.imlet.2015.09.008.
- Delhaes, L., S. Monchy, E. Fréalle, C. Hubans, J. Salleron, S. Leroy, A. Prevotat, F. Wallet, B. Wallaert, E. Dei-Cas, T. Sime-Ngando, M. Chabé, and E. Viscogliosi. 2012. "The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management." *PLoS One* 7 (4):e36313. doi: 10.1371/journal.pone.0036313.
- Deplancke, B., and H. R. Gaskins. 2001. "Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer." *Am J Clin Nutr* 73 (6):1131S-1141S.
- Dignass, A., G. Van Assche, J. O. Lindsay, M. Lémann, J. Söderholm, J. F. Colombel, S. Danese, A. D'Hoore, M. Gassull, F. Gomollón, D. W. Hommes, P. Michetti, C. O'Morain, T. Oresland, A. Windsor, E. F. Stange, S. P. Travis, and European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). 2010. "The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management." *J Crohns Colitis* 4 (1):28-62. doi: 10.1016/j.crohns.2009.12.002.
- Dollive, S., G. L. Peterfreund, S. Sherrill-Mix, K. Bittinger, R. Sinha, C. Hoffmann, C. S. Nabel, D. A. Hill, D. Artis, M. A. Bachman, R. Custers-Allen, S. Grunberg, G. D. Wu, J. D. Lewis, and F. D. Bushman. 2012. "A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples." *Genome Biol* 13 (7):R60. doi: 10.1186/gb-2012-13-7-r60.
- Dotan, I., S. Fishman, Y. Dgani, M. Schwartz, A. Karban, A. Lerner, O. Weishauss, L. Spector, A. Shtevi, R. T. Altstock, N. Dotan, and Z. Halpern. 2006. "Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease." *Gastroenterology* 131 (2):366-78. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.030.
- Dridi, B., D. Raoult, and M. Drancourt. 2011. "Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes." *Anaerobe* 17 (2):56-63. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.001.
- Drummond, R. A., I. M. Dambuza, S. Vautier, J. A. Taylor, D. M. Reid, C. C. Bain, D. M. Underhill, D. Masopust, D. H. Kaplan, and G. D. Brown. 2015. "CD4(+) T-cell survival in the GI tract requires dectin-1 during fungal infection." *Mucosal Immunol*. doi: 10.1038/mi.2015.79.
- Ekbom, A., A. J. Wakefield, M. Zack, and H. O. Adami. 1994. "Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease." *Lancet* 344 (8921):508-10.
- Faith, J. J., J. L. Guruge, M. Charbonneau, S. Subramanian, H. Sedorf, A. L. Goodman, J. C. Clemente, R. Knight, A. C. Heath, R. L. Leibel, M. Rosenbaum, and J. I. Gordon. 2013. "The long-term stability of the human gut microbiota." *Science* 341 (6141):1237439. doi: 10.1126/science.1237439.

- Fan, D., L. A. Coughlin, M. M. Neubauer, J. Kim, M. S. Kim, X. Zhan, T. R. Simms-Waldrup, Y. Xie, L. V. Hooper, and A. Y. Koh. 2015. "Activation of HIF-1 α and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization." *Nat Med*. doi: 10.1038/nm.3871.
- Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H. C. Korting, W. Schäfer, and B. Hube. 2002. "Candida albicans hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs." *Infect Immun* 70 (7):3689-700.
- Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, B. J. Kullberg, M. G. Netea, and G. J. Adema. 2008. "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." *Cell Microbiol* 10 (10):2058-66. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x.
- Fletcher, S. M., D. Stark, J. Harkness, and J. Ellis. 2012. "Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective." *Clin Microbiol Rev* 25 (3):420-49. doi: 10.1128/CMR.05038-11.
- Fradin, C., E. S. Bernardes, and T. Jouault. 2015. "Candida albicans phospholipomannan: a sweet spot for controlling host response/inflammation." *Semin Immunopathol* 37 (2):123-30. doi: 10.1007/s00281-014-0461-5.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz, and N. R. Pace. 2007. "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (34):13780-5. doi: 10.1073/pnas.0706625104.
- Fresko, I., S. Ugurlu, F. Ozbakir, A. Celik, S. Yurdakul, V. Hamuryudan, and H. Yazici. 2005. "Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Behçet's syndrome." *Clin Exp Rheumatol* 23 (4 Suppl 38):S67-70.
- Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama. 2003. "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." *Gut* 52 (1):65-70.
- Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase, and H. Ohno. 2013. "Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells." *Nature* 504 (7480):446-50. doi: 10.1038/nature12721.
- Gent, A. E., M. D. Hellier, R. H. Grace, E. T. Swarbrick, and D. Coggon. 1994. "Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy." *Lancet* 343 (8900):766-7.
- Gerard R, Sendid B, Techy A, Massouille-Vernier G, François N, Colombel JF, Poulain D. 2013. "Candida albicans colonization and anti-glycan antibodies in active and quiescent Crohn's disease." *Journal of Crohn's and Colitis* vol.7 (February 2013):p. S290-S291. doi: DOI: 10.1016/S1873-9946(13)60718-7. ISSN: 1873-9946.
- Ghannoum, M. A., R. J. Jurevic, P. K. Mukherjee, F. Cui, M. Sikaroodi, A. Naqvi, and P. M. Gillevet. 2010. "Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals." *PLoS Pathog* 6 (1):e1000713. doi: 10.1371/journal.ppat.1000713.
- Glocker, E. O., D. Kotlarz, K. Boztug, E. M. Gertz, A. A. Schäffer, F. Noyan, M. Perro, J. Diestelhorst, A. Allroth, D. Murugan, N. Hätscher, D. Pfeifer, K. W. Sykora, M. Sauer, H. Kreipe, M. Lacher, R. Nustede, C. Woellner, U. Baumann, U. Salzer, S. Koletzko, N. Shah, A. W. Segal, A. Sauerbrey, S. Buderus, S. B. Snapper, B.

- Grimbacher, and C. Klein. 2009. "Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor." *N Engl J Med* 361 (21):2033-45. doi: 10.1056/NEJMoa0907206.
- Goren, I., L. Yahav, H. Tulchinsky, and I. Dotan. 2015. "Serology of Patients with Ulcerative Colitis After Pouch Surgery Is More Comparable with that of Patients with Crohn's Disease." *Inflamm Bowel Dis* 21 (10):2289-95. doi: 10.1097/MIB.0000000000000487.
- Gouba, N., and M. Drancourt. 2015. "Digestive tract mycobiota: a source of infection." *Med Mal Infect* 45 (1-2):9-16. doi: 10.1016/j.medmal.2015.01.007.
- Gow, N. A., F. L. van de Veerdonk, A. J. Brown, and M. G. Netea. 2012. "Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization." *Nat Rev Microbiol* 10 (2):112-22. doi: 10.1038/nrmicro2711.
- Gramlich, T., and R. E. Petras. 2007. "Pathology of inflammatory bowel disease." *Semin Pediatr Surg* 16 (3):154-63. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2007.04.005.
- Granito, A., L. Muratori, P. Muratori, M. Guidi, M. Lenzi, F. B. Bianchi, and U. Volta. 2006. "Anti-saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in coeliac disease." *Gut* 55 (2):296.
- Greenson, J. K. 2002. "Dysplasia in inflammatory bowel disease." *Semin Diagn Pathol* 19 (1):31-7.
- Gringhuis, S. I., J. den Dunnen, M. Litjens, M. van der Vlist, B. Wevers, S. C. Bruijns, and T. B. Geijtenbeek. 2009. "Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk." *Nat Immunol* 10 (2):203-13. doi: 10.1038/ni.1692.
- Halfvarson, J., L. Bodin, C. Tysk, E. Lindberg, and G. Järnerot. 2003. "Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics." *Gastroenterology* 124 (7):1767-73.
- Hedman, J., and P. Rådström. 2013. "Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR." *Methods Mol Biol* 943:17-48. doi: 10.1007/978-1-60327-353-4_2.
- Heisel, T., H. Podgorski, C. M. Staley, D. Knights, M. J. Sadowsky, and C. A. Gale. 2015. "Complementary amplicon-based genomic approaches for the study of fungal communities in humans." *PLoS One* 10 (2):e0116705. doi: 10.1371/journal.pone.0116705.
- Hoarau, G., P. K. Mukherjee, C. Gower-Rousseau, C. Hager, J. Chandra, M. A. Retuerto, C. Neut, S. Vermeire, J. Clemente, J. F. Colombel, H. Fujioka, D. Poulain, B. Sendid, and M. A. Ghannoum. 2016. "Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease." *MBio* 7 (5). doi: 10.1128/mBio.01250-16.
- Hoffmann, C., S. Dollive, S. Grunberg, J. Chen, H. Li, G. D. Wu, J. D. Lewis, and F. D. Bushman. 2013. "Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents." *PLoS One* 8 (6):e66019. doi: 10.1371/journal.pone.0066019.
- Hoffmann, T. W., H. P. Pham, C. Bridonneau, C. Aubry, B. Lamas, C. Martin-Gallausiaux, M. Moroldo, D. Rainteau, N. Lapaque, A. Six, M. L. Richard, E. Fargier, M. E. Le Guern, P. Langella, and H. Sokol. 2016. "Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice." *ISME J* 10 (2):460-77. doi: 10.1038/ismej.2015.127.
- Hogan, D. A., A. Vik, and R. Kolter. 2004. "A Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule influences Candida albicans morphology." *Mol Microbiol* 54 (5):1212-23. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04349.x.

- Hold, G. L., M. Smith, C. Grange, E. R. Watt, E. M. El-Omar, and I. Mukhopadhyaya. 2014. "Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years?" *World J Gastroenterol* 20 (5):1192-210. doi: 10.3748/wjg.v20.i5.1192.
- Hommel, D. W., and S. J. van Deventer. 2004. "Endoscopy in inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* 126 (6):1561-73.
- Hou, J. K., B. Abraham, and H. El-Serag. 2011. "Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature." *Am J Gastroenterol* 106 (4):563-73. doi: 10.1038/ajg.2011.44.
- Huffnagle, G. B., and M. C. Noverr. 2013. "The emerging world of the fungal microbiome." *Trends Microbiol* 21 (7):334-41. doi: 10.1016/j.tim.2013.04.002.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cézard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas. 2001. "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* 411 (6837):599-603. doi: 10.1038/35079107.
- Iliev, I. D., V. A. Funari, K. D. Taylor, Q. Nguyen, C. N. Reyes, S. P. Strom, J. Brown, C. A. Becker, P. R. Fleshner, M. Dubinsky, J. I. Rotter, H. L. Wang, D. P. McGovern, G. D. Brown, and D. M. Underhill. 2012. "Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis." *Science* 336 (6086):1314-7. doi: science.1221789 [pii] 10.1126/science.1221789.
- Irinyi, L., C. Serena, D. Garcia-Hermoso, M. Arabatzis, M. Desnos-Ollivier, D. Vu, G. Cardinali, I. Arthur, A. C. Normand, A. Giraldo, K. C. da Cunha, M. Sandoval-Denis, M. Hendrickx, A. S. Nishikaku, A. S. de Azevedo Melo, K. B. Merseguel, A. Khan, J. A. Parente Rocha, P. Sampaio, M. R. da Silva Briones, R. C. E Ferreira, M. de Medeiros Muniz, L. R. Castañón-Olivares, D. Estrada-Barcenas, C. Cassagne, C. Mary, S. Y. Duan, F. Kong, A. Y. Sun, X. Zeng, Z. Zhao, N. Gantois, F. Botterel, B. Robbertse, C. Schoch, W. Gams, D. Ellis, C. Halliday, S. Chen, T. C. Sorrell, R. Piarroux, A. L. Colombo, C. Pais, S. de Hoog, R. M. Zancopé-Oliveira, M. L. Taylor, C. Toriello, C. M. de Almeida Soares, L. Delhaes, D. Stubbe, F. Dromer, S. Ranque, J. Guarro, J. F. Cano-Lira, V. Robert, A. Velegraki, and W. Meyer. 2015. "International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi." *Med Mycol* 53 (4):313-37. doi: 10.1093/mmy/myv008.
- Israeli, E., I. Grotto, B. Gilburd, R. D. Balicer, E. Goldin, A. Wiik, and Y. Shoenfeld. 2005. "Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease." *Gut* 54 (9):1232-6. doi: 10.1136/gut.2004.060228.
- Jawhara, S., and D. Poulain. 2007. "Saccharomyces boulardii decreases inflammation and intestinal colonization by Candida albicans in a mouse model of chemically-induced colitis." *Med Mycol* 45 (8):691-700. doi: 10.1080/13693780701523013.
- Jawhara, S., X. Thuru, A. Standaert-Vitse, T. Jouault, S. Mordon, B. Sendid, P. Desreumaux, and D. Poulain. 2008. "Colonization of mice by Candida albicans is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3." *J Infect Dis* 197 (7):972-80. doi: 10.1086/528990.
- Jouault, T., S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P. A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira, and D. Poulain. 2003. "Candida albicans phospholipomannan is sensed through toll-like receptors." *J Infect Dis* 188 (1):165-72. doi: 10.1086/375784.

- Jouault, T., A. Sarazin, M. Martinez-Esparza, C. Fradin, B. Sendid, and D. Poulain. 2009. "Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*." *Cell Microbiol* 11 (7):1007-15. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01318.x.
- Kabeerdoss, J., S. Pugazhendhi, V. Subramanian, H. J. Binder, and B. S. Ramakrishna. 2011. "Exposure to hookworms in patients with Crohn's disease: a case-control study." *Aliment Pharmacol Ther* 34 (8):923-30. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04824.x.
- Kaplan, G. G., T. Jackson, B. E. Sands, M. Frisch, R. E. Andersson, and J. Korzenik. 2008. "The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis." *Am J Gastroenterol* 103 (11):2925-31. doi: 10.1111/j.1572-0241.2008.02118.x.
- Karakousis, A., L. Tan, D. Ellis, H. Alexiou, and P. J. Wormald. 2006. "An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR." *J Microbiol Methods* 65 (1):38-48. doi: 10.1016/j.mimet.2005.06.008.
- Kelly, D., J. I. Campbell, T. P. King, G. Grant, E. A. Jansson, A. G. Coutts, S. Pettersson, and S. Conway. 2004. "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA." *Nat Immunol* 5 (1):104-12. doi: 10.1038/ni1018.
- Kontoyiannis, D. P., I. Vaziri, H. A. Hanna, M. Boktour, J. Thornby, R. Hachem, G. P. Bodey, and I. I. Raad. 2001. "Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer." *Clin Infect Dis* 33 (10):1676-81. doi: 10.1086/323812.
- Kuczynski, J., C. L. Lauber, W. A. Walters, L. W. Parfrey, J. C. Clemente, D. Gevers, and R. Knight. 2012. "Experimental and analytical tools for studying the human microbiome." *Nat Rev Genet* 13 (1):47-58. doi: 10.1038/nrg3129.
- Kumamoto, C. A. 2011. "Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization." *Curr Opin Microbiol* 14 (4):386-91. doi: S1369-5274(11)00099-3 [pii] 10.1016/j.mib.2011.07.015.
- Lagier, J. C., F. Armougom, M. Million, P. Hugon, I. Pagnier, C. Robert, F. Bittar, G. Fournous, G. Gimenez, M. Maraninchi, J. F. Trape, E. V. Koonin, B. La Scola, and D. Raoult. 2012. "Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study." *Clin Microbiol Infect* 18 (12):1185-93. doi: 10.1111/1469-0691.12023.
- Landers, C. J., O. Cohavy, R. Misra, H. Yang, Y. C. Lin, J. Braun, and S. R. Targan. 2002. "Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens." *Gastroenterology* 123 (3):689-99. doi: S0016508502001592 [pii].
- Lees, C. W., J. C. Barrett, M. Parkes, and J. Satsangi. 2011. "New IBD genetics: common pathways with other diseases." *Gut* 60 (12):1739-53. doi: 10.1136/gut.2009.199679.
- Lerner, A. 2007. "Aluminum is a potential environmental factor for Crohn's disease induction: extended hypothesis." *Ann N Y Acad Sci* 1107:329-45. doi: 10.1196/annals.1381.035.
- Levine, B., N. Mizushima, and H. W. Virgin. 2011. "Autophagy in immunity and inflammation." *Nature* 469 (7330):323-35. doi: 10.1038/nature09782.
- Lewis, J. D., E. Z. Chen, R. N. Baldassano, A. R. Otley, A. M. Griffiths, D. Lee, K. Bittinger, A. Bailey, E. S. Friedman, C. Hoffmann, L. Albenberg, R. Sinha, C. Compher, E. Gilroy, L. Nessel, A. Grant, C. Chehoud, H. Li, G. D. Wu, and F. D. Bushman. 2015. "Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut

- Microbiome in Pediatric Crohn's Disease." *Cell Host Microbe* 18 (4):489-500. doi: 10.1016/j.chom.2015.09.008.
- Li, H., J. P. Limenitakis, T. Fuhrer, M. B. Geuking, M. A. Lawson, M. Wyss, S. Brugiroux, I. Keller, J. A. Macpherson, S. Rupp, B. Stolp, J. V. Stein, B. Stecher, U. Sauer, K. D. McCoy, and A. J. Macpherson. 2015. "The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche." *Nat Commun* 6:8292. doi: 10.1038/ncomms9292.
- Li, Q., C. Wang, C. Tang, Q. He, N. Li, and J. Li. 2014. "Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in Crohn's disease." *J Clin Gastroenterol* 48 (6):513-23. doi: 10.1097/MCG.0000000000000035.
- Lichtenstein, G. R., S. B. Hanauer, W. J. Sandborn, and Practice Parameters Committee of American College of Gastroenterology. 2009. "Management of Crohn's disease in adults." *Am J Gastroenterol* 104 (2):465-83; quiz 464, 484. doi: 10.1038/ajg.2008.168.
- Liguori, G., B. Lamas, M. L. Richard, G. Brandi, G. da Costa, T. W. Hoffmann, M. P. Di Simone, C. Calabrese, G. Poggioli, P. Langella, M. Campieri, and H. Sokol. 2015. "Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients." *J Crohns Colitis*. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv209.
- Lodes, M. J., Y. Cong, C. O. Elson, R. Mohamath, C. J. Landers, S. R. Targan, M. Fort, and R. M. Hershberg. 2004. "Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease." *J Clin Invest* 113 (9):1296-306. doi: 10.1172/JCI20295.
- Loman, N. J., R. V. Misra, T. J. Dallman, C. Constantinidou, S. E. Gharbia, J. Wain, and M. J. Pallen. 2012. "Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms." *Nat Biotechnol* 30 (5):434-9. doi: 10.1038/nbt.2198.
- Lozupone, C. A., J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, and R. Knight. 2012. "Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota." *Nature* 489 (7415):220-30. doi: 10.1038/nature11550.
- Makita, S., T. Kanai, S. Oshima, K. Uraushihara, T. Totsuka, T. Sawada, T. Nakamura, K. Koganei, T. Fukushima, and M. Watanabe. 2004. "CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells." *J Immunol* 173 (5):3119-30.
- Man, S. M., N. O. Kaakoush, and H. M. Mitchell. 2011. "The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8 (3):152-68. doi: 10.1038/nrgastro.2011.3.
- Manichanh, C., L. Rigottier-Gois, E. Bonnaud, K. Gloux, E. Pelletier, L. Frangeul, R. Nalin, C. Jarrin, P. Chardon, P. Marteau, J. Roca, and J. Dore. 2006. "Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach." *Gut* 55 (2):205-11. doi: 10.1136/gut.2005.073817.
- Maul, J., C. Lodenkemper, P. Mundt, E. Berg, T. Giese, A. Stallmach, M. Zeitz, and R. Duchmann. 2005. "Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* 128 (7):1868-78.
- Mazmanian, S. K., J. L. Round, and D. L. Kasper. 2008. "A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease." *Nature* 453 (7195):620-5. doi: 10.1038/nature07008.
- Metzker, M. L. 2010. "Sequencing technologies - the next generation." *Nat Rev Genet* 11 (1):31-46. doi: 10.1038/nrg2626.
- Morgan, X. C., and C. Huttenhower. 2012. "Chapter 12: Human microbiome analysis." *PLoS Comput Biol* 8 (12):e1002808. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002808.
- Mow, W. S., E. A. Vasilias, Y. C. Lin, P. R. Fleshner, K. A. Papadakis, K. D. Taylor, C. J. Landers, M. T. Abreu-Martin, J. I. Rotter, H. Yang, and S. R. Targan. 2004.

- "Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease." *Gastroenterology* 126 (2):414-24.
- Mpofu, C. M., B. J. Campbell, S. Subramanian, S. Marshall-Clarke, C. A. Hart, A. Cross, C. L. Roberts, A. McGoldrick, S. W. Edwards, and J. M. Rhodes. 2007. "Microbial mannan inhibits bacterial killing by macrophages: a possible pathogenic mechanism for Crohn's disease." *Gastroenterology* 133 (5):1487-98. doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.004.
- Mukherjee, P. K., J. Chandra, M. Retuerto, M. Sikaroodi, R. E. Brown, R. Jurevic, R. A. Salata, M. M. Lederman, P. M. Gillevet, and M. A. Ghannoum. 2014. "Oral mycobiome analysis of HIV-infected patients: identification of *Pichia* as an antagonist of opportunistic fungi." *PLoS Pathog* 10 (3):e1003996. doi: 10.1371/journal.ppat.1003996.
- Mukherjee, P. K., B. Sendid, G. Hoarau, J. F. Colombel, D. Poulain, and M. A. Ghannoum. 2014. "Mycobiota in gastrointestinal diseases." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1038/nrgastro.2014.188.
- Mukhopadhyaya, I., R. Hansen, C. Meharg, J. M. Thomson, R. K. Russell, S. H. Berry, E. M. El-Omar, and G. L. Hold. 2014. "The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease." *Microbes Infect*. doi: 10.1016/j.micinf.2014.12.001.
- Murzyn, A., A. Krasowska, P. Stefanowicz, D. Dziadkowiec, and M. Łukaszewicz. 2010. "Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation." *PLoS One* 5 (8):e12050. doi: 10.1371/journal.pone.0012050.
- Muñoz, P., M. Giannella, C. Fanciulli, J. Guinea, M. Valerio, L. Rojas, M. Rodríguez-Créixems, and E. Bouza. 2011. "Candida tropicalis fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital." *Clin Microbiol Infect* 17 (10):1538-45. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03338.x.
- Müller, S., T. Schaffer, A. M. Schoepfer, A. Hilty, T. Bodmer, and F. Seibold. 2008. "Partial overlap of anti-mycobacterial, and anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in Crohn's disease." *World J Gastroenterol* 14 (23):3650-61.
- Netea, M. G., L. A. Joosten, J. W. van der Meer, B. J. Kullberg, and F. L. van de Veerdonk. 2015. "Immune defence against Candida fungal infections." *Nat Rev Immunol* 15 (10):630-42. doi: 10.1038/nri3897.
- Nguyen, H. T., P. Lapaquette, M. A. Bringer, and A. Darfeuille-Michaud. 2013. "Autophagy and Crohn's disease." *J Innate Immun* 5 (5):434-43. doi: 10.1159/000345129.
- Nilsson, R. H., M. Ryberg, E. Kristiansson, K. Abarenkov, K. H. Larsson, and U. Kõljalg. 2006. "Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective." *PLoS One* 1:e59. doi: 10.1371/journal.pone.0000059.
- Norman, J. M., S. A. Handley, M. T. Baldrige, L. Droit, C. Y. Liu, B. C. Keller, A. Kambal, C. L. Monaco, G. Zhao, P. Fleshner, T. S. Stappenbeck, D. P. McGovern, A. Keshavarzian, E. A. Mutlu, J. Sauk, D. Gevers, R. J. Xavier, D. Wang, M. Parkes, and H. W. Virgin. 2015. "Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease." *Cell* 160 (3):447-60. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.002.
- Norman, J. M., S. A. Handley, and H. W. Virgin. 2014. "Kingdom-agnostic metagenomics and the importance of complete characterization of enteric microbial communities." *Gastroenterology* 146 (6):1459-69. doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.001.
- Okawa, Y., and K. Goto. 2006. "Antigenicity of *Candida tropicalis* strain cells cultured at 27 and 37 degrees C." *FEMS Immunol Med Microbiol* 46 (3):438-43. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00056.x.

- Okumura, Y., N. Inoue, and T. Nikai. 2007. "Isolation and characterization of a novel acid proteinase, tropinase, from *Candida tropicalis* IFO 0589." *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48 (1):19-25.
- Ott, S. J., T. Kühbacher, M. Musfeldt, P. Rosenstiel, S. Hellmig, A. Rehman, O. Drews, W. Weichert, K. N. Timmis, and S. Schreiber. 2008. "Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity." *Scand J Gastroenterol* 43 (7):831-41. doi: 10.1080/00365520801935434.
- Pande, K., C. Chen, and S. M. Noble. 2013. "Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism." *Nat Genet* 45 (9):1088-91. doi: 10.1038/ng.2710.
- Papp, M., G. L. Norman, I. Altorjay, and P. L. Lakatos. 2007. "Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic?" *World J Gastroenterol* 13 (14):2028-36.
- Parfrey, L. W., W. A. Walters, C. L. Lauber, J. C. Clemente, D. Berg-Lyons, C. Teiling, C. Kodira, M. Mohiuddin, J. Brunelle, M. Driscoll, N. Fierer, J. A. Gilbert, and R. Knight. 2014. "Communities of microbial eukaryotes in the mammalian gut within the context of environmental eukaryotic diversity." *Front Microbiol* 5:298. doi: 10.3389/fmicb.2014.00298.
- Persson, S., R. F. de Boer, A. M. Kooistra-Smid, and K. E. Olsen. 2011. "Five commercial DNA extraction systems tested and compared on a stool sample collection." *Diagn Microbiol Infect Dis* 69 (3):240-4. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.023.
- Petersen, A. M., C. R. Stensvold, H. Mirsepasi, J. Engberg, A. Friis-Møller, L. J. Porsbo, A. M. Hammerum, I. Nordgaard-Lassen, H. V. Nielsen, and K. A. Krogh. 2013. "Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection." *Scand J Gastroenterol* 48 (5):638-9. doi: 10.3109/00365521.2013.780094.
- Poirier, P., I. Wawrzyniak, C. P. Vivarès, F. Delbac, and H. El Alaoui. 2012. "New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome." *PLoS Pathog* 8 (3):e1002545. doi: 10.1371/journal.ppat.1002545.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* 282 (5396):2085-8.
- Porman, A. M., M. P. Hirakawa, S. K. Jones, N. Wang, and R. J. Bennett. 2013. "MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for *Wor1* in regulating switching and filamentation." *PLoS Genet* 9 (3):e1003369. doi: 10.1371/journal.pgen.1003369.
- Pothoulakis, C. 2009. "Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*." *Aliment Pharmacol Ther* 30 (8):826-33. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04102.x.
- Poulain, D., B. Sendid, A. Standaert-Vitse, C. Fradin, T. Jouault, S. Jawhara, and J. F. Colombel. 2009. "Yeasts: neglected pathogens." *Dig Dis* 27 Suppl 1:104-10. doi: 10.1159/000268129.
- Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Doré, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork,

- S. D. Ehrlich, and MetaHIT Consortium. 2010. "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *Nature* 464 (7285):59-65. doi: 10.1038/nature08821.
- Qiu, X., F. Zhang, X. Yang, N. Wu, W. Jiang, X. Li, and Y. Liu. 2015. "Changes in the composition of intestinal fungi and their role in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis." *Sci Rep* 5:10416. doi: 10.1038/srep10416.
- Quinton, J. F., B. Sendid, D. Reumaux, P. Duthilleul, A. Cortot, B. Grandbastien, G. Charrier, S. R. Targan, J. F. Colombel, and D. Poulain. 1998. "Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role." *Gut* 42 (6):788-91.
- Quévrain, E., M. A. Maubert, C. Michon, F. Chain, R. Marquant, J. Tailhades, S. Miquel, L. Carlier, L. G. Bermúdez-Humarán, B. Pigneur, O. Lequin, P. Kharrat, G. Thomas, D. Rainteau, C. Aubry, N. Breyner, C. Afonso, S. Lavielle, J. P. Grill, G. Chassaing, J. M. Chatel, G. Trugnan, R. Xavier, P. Langella, H. Sokol, and P. Seksik. 2015. "Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease." *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307649.
- Rajca, S., V. Grondin, E. Louis, G. Vernier-Massouille, J. C. Grimaud, Y. Bouhnik, D. Laharie, J. L. Dupas, H. Pillant, L. Picon, M. Veyrac, M. Flamant, G. Savoye, R. Jian, M. Devos, G. Paintaud, E. Piver, M. Allez, J. Y. Mary, H. Sokol, J. F. Colombel, and P. Seksik. 2014. "Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis* 20 (6):978-86. doi: 10.1097/MIB.0000000000000036.
- Rehaume, L. M., T. Jouault, and M. Chamaillard. 2010. "Lessons from the inflammasome: a molecular sentry linking *Candida* and Crohn's disease." *Trends Immunol* 31 (5):171-5. doi: 10.1016/j.it.2010.01.007.
- Reumaux, D., B. Sendid, D. Poulain, P. Duthilleul, O. Dewit, and J. F. Colombel. 2003. "Serological markers in inflammatory bowel diseases." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17 (1):19-35.
- Romani, L. 2011. "Immunity to fungal infections." *Nat Rev Immunol* 11 (4):275-88. doi: 10.1038/nri2939.
- Round, J. L., and S. K. Mazmanian. 2010. "Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota." *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (27):12204-9. doi: 10.1073/pnas.0909122107.
- Ruland, J. 2008. "CARD9 signaling in the innate immune response." *Ann N Y Acad Sci* 1143:35-44. doi: 10.1196/annals.1443.024.
- Samuel, S., E. V. Loftus, and W. J. Sandborn. 2010. "The effects of itraconazole on inflammatory bowel disease activity in patients treated for histoplasmosis." *Aliment Pharmacol Ther* 32 (9):1207-9. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04444.x.
- Sartor, R. B. 2006. "Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3 (7):390-407. doi: 10.1038/ncpgasthep0528.
- Scanlan, P. D., and J. R. Marchesi. 2008. "Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces." *ISME J* 2 (12):1183-93. doi: 10.1038/ismej.2008.76.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, and C. F. Weber. 2009. "Introducing mothur: open-

- source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities." *Appl Environ Microbiol* 75 (23):7537-41. doi: 10.1128/AEM.01541-09.
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, Fungal Barcoding Consortium, and Fungal Barcoding Consortium Author List. 2012. "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (16):6241-6. doi: 1117018109 [pii] 10.1073/pnas.1117018109.
- Schoepfer, A. M., B. Flogerzi, B. Seibold-Schmid, T. Schaffer, J. F. Kun, V. Pittet, S. Mueller, and F. Seibold. 2009. "Low Mannan-binding lectin serum levels are associated with complicated Crohn's disease and reactivity to oligomannan (ASCA)." *Am J Gastroenterol* 104 (10):2508-16. doi: 10.1038/ajg.2009.315.
- Schulze, J., and U. Sonnenborn. 2009. "Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents." *Dtsch Arztebl Int* 106 (51-52):837-42. doi: 10.3238/arztebl.2009.0837.
- Segain, J. P., D. Raingeard de la Blétière, A. Bourreille, V. Leray, N. Gervois, C. Rosales, L. Ferrier, C. Bonnet, H. M. Blottière, and J. P. Galmiche. 2000. "Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease." *Gut* 47 (3):397-403.
- Sellon, R. K., S. Tonkonogy, M. Schultz, L. A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D. M. Rennick, and R. B. Sartor. 1998. "Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice." *Infect Immun* 66 (11):5224-31.
- Sendid, B., J. F. Colombel, P. M. Jacquinet, C. Faille, J. Fruit, A. Cortot, D. Lucidarme, D. Camus, and D. Poulain. 1996. "Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease." *Clin Diagn Lab Immunol* 3 (2):219-26.
- Sendid, B., T. Jouault, A. Vitse, C. Fradin, J. F. Colombel, and D. Poulain. 2009. "[Anti-glycan antibodies establish an unexpected link between *C. albicans* and Crohn disease]." *Med Sci (Paris)* 25 (5):473-81. doi: 10.1051/medsci/2009255473.
- Sendid, B., J. F. Quinton, G. Charrier, O. Goulet, A. Cortot, B. Grandbastien, D. Poulain, and J. F. Colombel. 1998. "Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in familial Crohn's disease." *Am J Gastroenterol* 93 (8):1306-10. doi: S0002-9270(98)00296-2 [pii] 10.1111/j.1572-0241.1998.00415.x.
- Shendure, J., and H. Ji. 2008. "Next-generation DNA sequencing." *Nat Biotechnol* 26 (10):1135-45. doi: 10.1038/nbt1486.
- Sibartie, S., P. Scully, J. Keohane, S. O'Neill, J. O'Mahony, D. O'Hanlon, W. O. Kirwan, L. O'Mahony, and F. Shanahan. 2010. "Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (MAP) as a modifying factor in Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis* 16 (2):296-304. doi: 10.1002/ibd.21052.
- Smith, P. M., M. R. Howitt, N. Panikov, M. Michaud, C. A. Gallini, M. Bohlooly-Y, J. N. Glickman, and W. S. Garrett. 2013. "The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis." *Science* 341 (6145):569-73. doi: 10.1126/science.1241165.
- Sokol, H. 2014. "Probiotics and antibiotics in IBD." *Dig Dis* 32 Suppl 1:10-7. doi: 10.1159/000367820.
- Sokol, H., K. L. Conway, M. Zhang, M. Choi, B. Morin, Z. Cao, E. J. Villablanca, C. Li, C. Wijmenga, S. H. Yun, H. N. Shi, and R. J. Xavier. 2013. "Card9 mediates intestinal

- epithelial cell restitution, T-helper 17 responses, and control of bacterial infection in mice." *Gastroenterology* 145 (3):591-601.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.047.
- Sokol, H., V. Leducq, H. Aschard, H. P. Pham, S. Jegou, C. Landman, D. Cohen, G. Liguori, A. Bourrier, I. Nion-Larmurier, J. Cosnes, P. Seksik, P. Langella, D. Skurnik, M. L. Richard, and L. Beaugerie. 2016. "Fungal microbiota dysbiosis in IBD." *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310746.
- Sokol, H., P. Seksik, J. P. Furet, O. Firmesse, I. Nion-Larmurier, L. Beaugerie, J. Cosnes, G. Corthier, P. Marteau, and J. Doré. 2009. "Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota." *Inflamm Bowel Dis* 15 (8):1183-9. doi: 10.1002/ibd.20903.
- Standaert-Vitse, A., T. Jouault, P. Vandewalle, C. Mille, M. Seddik, B. Sendid, J. M. Mallet, J. F. Colombel, and D. Poulain. 2006. "Candida albicans is an immunogen for anti-Saccharomyces cerevisiae antibody markers of Crohn's disease." *Gastroenterology* 130 (6):1764-75. doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.009.
- Standaert-Vitse, A., B. Sendid, M. Joossens, N. François, P. Vandewalle-El Khoury, J. Branche, H. Van Kruiningen, T. Jouault, P. Rutgeerts, C. Gower-Rousseau, C. Libersa, C. Neut, F. Broly, M. Chamailard, S. Vermeire, D. Poulain, and J. F. Colombel. 2009. "Candida albicans colonization and ASCA in familial Crohn's disease." *Am J Gastroenterol* 104 (7):1745-53. doi: ajg2009225 [pii] 10.1038/ajg.2009.225.
- Suzuki, T., Y. Miyamae, and I. Ishida. 1991. "Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233." *J Gen Microbiol* 137 (1):161-7. doi: 10.1099/00221287-137-1-161.
- Tang, L. Y., H. Cai, U. Navaneethan, J. H. Boone, S. J. Rhodes, L. Moore, H. Rho, C. de La Motte, E. Queener, and B. Shen. 2012. "Utility of fecal and serum anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in the diagnosis of Crohn's disease-like condition of the pouch." *Int J Colorectal Dis* 27 (11):1455-63. doi: 10.1007/s00384-012-1444-4.
- Tedelind, S., F. Westberg, M. Kjerrulf, and A. Vidal. 2007. "Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease." *World J Gastroenterol* 13 (20):2826-32.
- Turner, S. A., and G. Butler. 2014. "The *Candida* pathogenic species complex." *Cold Spring Harb Perspect Med* 4 (9):a019778. doi: 10.1101/cshperspect.a019778.
- Van Limbergen, J., G. Radford-Smith, and J. Satsangi. 2014. "Advances in IBD genetics." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11 (6):372-85. doi: 10.1038/nrgastro.2014.27.
- van Schaik, F. D., B. Oldenburg, A. R. Hart, P. D. Siersema, S. Lindgren, O. Grip, B. Teucher, R. Kaaks, M. M. Bergmann, H. Boeing, F. Carbonnel, P. Jantchou, M. C. Boutron-Ruault, A. Tjønneland, A. Olsen, F. L. Crowe, P. H. Peeters, M. G. van Oijen, and H. B. Bueno-de-Mesquita. 2013. "Serological markers predict inflammatory bowel disease years before the diagnosis." *Gut* 62 (5):683-8. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302717.
- Vermeire, S., M. Joossens, K. Verbeke, J. Wang, K. Machiels, J. Sabino, M. Ferrante, G. Van Assche, P. Rutgeerts, and J. Raes. 2016. "Donor Species Richness Determines Faecal Microbiota Transplantation Success in Inflammatory Bowel Disease." *J Crohns Colitis* 10 (4):387-94. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv203.
- Weaver, C. T., and R. D. Hatton. 2009. "Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective." *Nat Rev Immunol* 9 (12):883-9. doi: 10.1038/nri2660.

- Whibley, N., J. R. Jaycox, D. Reid, A. V. Garg, J. A. Taylor, C. J. Clancy, M. H. Nguyen, P. S. Biswas, M. J. McGeachy, G. D. Brown, and S. L. Gaffen. 2015. "Delinking CARD9 and IL-17: CARD9 Protects against *Candida tropicalis* Infection through a TNF- α -Dependent, IL-17-Independent Mechanism." *J Immunol* 195 (8):3781-92. doi: 10.4049/jimmunol.1500870.
- Wlodarska, M., A. D. Kostic, and R. J. Xavier. 2015. "An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases." *Cell Host Microbe* 17 (5):577-91. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.008.
- Xavier, R. J., and D. K. Podolsky. 2007. "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature* 448 (7152):427-34. doi: 10.1038/nature06005.
- Zainah, H., M. Hassan, L. Shiekh-Sroujeh, S. Hassan, G. Alangaden, and M. Ramesh. 2015. "Intestinal microbiota transplantation, a simple and effective treatment for severe and refractory *Clostridium difficile* infection." *Dig Dis Sci* 60 (1):181-5. doi: 10.1007/s10620-014-3296-y.
- Zeissig, S., N. Bürgel, D. Günzel, J. Richter, J. Mankertz, U. Wahnschaffe, A. J. Kroesen, M. Zeitz, M. Fromm, and J. D. Schulzke. 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 (1):61-72. doi: 10.1136/gut.2006.094375.
- Ziesemer, K. A., A. E. Mann, K. Sankaranarayanan, H. Schroeder, A. T. Ozga, B. W. Brandt, E. Zaura, A. Waters-Rist, M. Hoogland, D. C. Salazar-García, M. Aldenderfer, C. Speller, J. Hendy, D. A. Weston, S. J. MacDonald, G. H. Thomas, M. J. Collins, C. M. Lewis, C. Hofman, and C. Warinner. 2015. "Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification." *Sci Rep* 5:16498. doi: 10.1038/srep16498.