



HAL
open science

Impact du déficit en IgA sur la symbiose hôte/microbiote intestinal chez l'homme

Jehane Fadlallah

► **To cite this version:**

Jehane Fadlallah. Impact du déficit en IgA sur la symbiose hôte/microbiote intestinal chez l'homme. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066740 . tel-01743594

HAL Id: tel-01743594

<https://theses.hal.science/tel-01743594v1>

Submitted on 26 Mar 2018

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie (ED394)

Centre d'immunologie et de maladies infectieuses-Paris-UMR INSERM/UPMC 1135-Equipe 7

Impact du déficit en IgA sur la symbiose hôte/microbiote intestinal chez l'homme

Par Jehane Fadlallah

Née le 09/08/1984 à Paris

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par le Pr Guy GOROCHOV

Présentée et soutenue publiquement le 12 décembre 2016

Devant un jury composé de :

CLEMENT Karine, Professeur des Universités, Paris 6, présidente du jury

MONTEIRO Renato, Professeur des Universités, Paris 7, rapporteur

PAUL Stéphane, Professeur des Universités, Saint Etienne, rapporteur

AMOURA Zahir, Professeur des Universités, Paris 6, examinateur

DORE Joël, Directeur de recherche, INRA Jouy en Josas, examinateur

FIESCHI Claire, Professeur des Universités, Paris7, examinatrice

GOROCHOV Guy, Professeur des Universités, Paris 6, directeur de thèse

Remerciements

J'ai longtemps réfléchi à cette partie, et j'en arrive à la conclusion que je ne trouverai jamais les mots justes pour traduire fidèlement ma pensée et exprimer ma gratitude. Cette expérience scientifique a été très enrichissante tant au plan intellectuel qu'aux plans personnel et humain. Elle a été très difficile aussi, car, à mon sens, l'esprit critique qui est inhérent à la discipline met à très rude épreuve toutes les convictions, et ce dans tous les domaines de la vie, et appelle à la plus grande humilité concernant tout ce que nous considérons comme étant des certitudes. J'ai donc essayé d'apprendre à apprivoiser le doute, dans la limite de mes capacités, pour en conserver les vertus en goûtant le moins possible à ses affres, et c'est une des plus grandes leçons que je retiendrai de cette expérience. L'autre leçon fascinante qui en découle, c'est qu'il n'y a pas de limite à la découverte, ni dans le temps, ni dans l'espace. Je n'aurai évidemment jamais réussi sans le soutien inestimable de mon entourage professionnel et personnel, à qui je tiens à écrire ces quelques phrases.

Je remercie les membres du jury de me faire l'honneur d'évaluer ce travail :

- Mme le Professeur Karine Clément, merci de me faire l'honneur de présider le jury et d'apporter vos lumières à ce travail.

- Mrs les Professeurs Renato Monteiro et Stéphane Paul, rapporteurs, qui m'ont fait l'honneur de lire et corriger ce travail avec une extrême précision et énormément d'intérêt, et qui ont permis de l'améliorer grandement.

-Mr Joël Doré, merci de me faire l'honneur d'être examinateur, et de nous permettre de bénéficier de votre savoir. J'espère que vous excuserez la maladresse de mon écriture de "non-microbiologiste".

-Mr le Professeur Zahir Amoura, qui m'a appris la médecine et encouragée à m'initier à la recherche, m'a permis de recruter les patients, et dont la porte est toujours ouverte pour moi. Merci d'évaluer et d'apporter ton précieux regard critique sur ce travail.

- Mme le Professeur Claire Fieschi, qui a toujours été un modèle pour moi, tant professionnellement qu'humainement, et qui est toujours là pour m'apprendre, me stimuler, me soutenir et veiller sur moi. Merci d'avoir eu l'idée de ce travail, et d'avoir permis sa réalisation.

- Mr le Professeur Guy Gorochoy, mon directeur de thèse, dont la rigueur scientifique et l'intelligence acérée ont à la fois été un moteur et une source d'angoisse. Merci de m'avoir accueillie et

intégrée dans l'équipe, de m'avoir proposé ce travail, de m'avoir permis de prendre le temps qu'il fallait pour apprendre, de m'avoir permis de n'en faire qu'à ma tête parfois, et enfin d'avoir dirigé ma thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire, qui m'ont accueillie et intégrée dans l'équipe, et qui ont permis de m'y sentir "comme à la maison". Qui m'ont appris tout ce que je sais à la paillasse. Karim en biochimie (tu as pu filtrer des selles grâce à moi, je suis sûre que tu ne m'oublieras jamais) et Christophe en cytométrie (ça en a mis du temps, mais j'ai fini par comprendre comment ça fonctionnait), les meilleurs ingénieurs de tous les temps, prêts à relever tous les défis les plus fous. Qui m'ont soutenue dans les moments les plus difficiles. Et surtout avec qui j'ai énormément rigolé. Un énorme merci "aux filles" pour tout ce qu'on a partagé, Delphine, ma co-thésarde, une très grande "femme de science au grand coeur" en herbe, Laetitia ma petite ingénieure malicieuse qui a toujours une solution à tout, Hela, notre bio-informaticienne de haut vol, et Yurdagül, un autre modèle féminin inspirant elle aussi, qui ont été des collègues au début et de vraies amies maintenant. Merci à toute la team "immuno-microbiota", Martin Larsen qui a énormément contribué à la genèse et la réalisation de ce travail et qui m'a beaucoup appris, et à Doriane et Cyrielle, qui étaient là au début. Merci aussi à toute l'équipe "NK", et spécialement à Baptiste. Et Abla aussi. Merci aux super secrétaires, Fabienne, Nadia et Virginie. Aux "filles" des T4/T8, Christine, Chrystel, Isabelle, Murielle et Virginie, pour leur enthousiasme et leur gentillesse. Aux garçons aussi, David et Jean Luc. Un grand merci à Gaëlle, qui a aussi contribué à ce travail. Et enfin, last but not least, Hans, le professeur Tournesol du laboratoire, qui est un puits de savoir et de culture.

Merci à tous les cliniciens, qui m'ont appris la médecine et qui ont permis que ce travail puisse se réaliser, s'améliorer et aboutir : l'équipe du Pr Eric Oksenhendler, Pr Claire Fieschi, Dr Lionel Galicier, Dr David Boutboul, Dr Laurence Gérard, et Dr Marion Malphettes ainsi que l'équipe de médecine interne du Pr Amoura, Dr Alexis Mathian, Dr Makoto Miyara, et Dr Miguel Hié.

Un énorme merci à mes amis, que j'ai énormément de chance d'avoir, qui m'entourent de leur affection, de leur amour, de leurs éclats de rire et de leur joie de vivre, qui ont été un soutien indéfectible dans les meilleurs moments comme dans les difficiles, avec qui j'ai partagé des moments inoubliables dans plein de lieux différents, et qui me rappellent sans cesse à quel point la vie est encore plus belle quand on la partage avec les autres. A leurs enfants aussi. Je ne vais pas les citer, par pudeur, je sais qu'ils se reconnaîtront. "On ne voit bien qu'avec le coeur, l'essentiel est invisible pour les yeux".

Et enfin, bien sûr, ma famille. Mes parents, dont l'amour, l'affection et le soutien sans bornes et inconditionnels m'ont permis de me construire, de réaliser mes rêves et dont la fierté lorsqu'ils me regardent me porte. A mes "petits frères", qui veillent sur moi, et sans qui rien ne serait pareil. Et à toute ma famille (et elle est nombreuse), qui a toujours cru en moi.

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	2
SOMMAIRE.....	4
1 INTRODUCTION.....	6
1.1 LE MICROBIOTE INTESTINAL.....	6
1.1.1 DEFINITIONS.....	6
1.1.2 TECHNIQUES DE SEQUENÇAGE DE L'ADN BACTERIEN (6).....	7
1.1.3 TAXONOMIE BACTERIENNE.....	9
1.1.4 COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL.....	11
1.1.4.1 Structure.....	11
1.1.4.2 Fonctions.....	20
1.2 PHYSIOLOGIE DE L'IGA.....	23
1.2.1 INTRODUCTION : STRUCTURE DE L'IGA.....	23
1.2.2 PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'IGA SERIQUE.....	24
1.2.2.1 Sites d'induction et spécificités des IgA sériques.....	24
1.2.2.2 Propriétés effectrices de l'IgA sérique.....	24
1.2.3 PHYSIOLOGIE DE L'IGA SECRETOIRE.....	26
1.2.3.1 Induction des réponses IgA dans les muqueuses.....	26
1.2.3.2 Sécrétion de l'IgA dans la lumière intestinale.....	30
1.2.3.3 Cinétique et évolution spatio-temporelle des réponses IgA.....	32
1.2.4 INTERACTIONS ENTRE LES IGA SECRETOIRES ET LE MICROBIOTE INTESTINAL.....	34
1.2.4.1 Impact des IgA sécrétoires sur l'établissement de la flore microbienne.....	34
1.2.4.2 Spécificités des IgA sécrétoires.....	36
1.2.4.3 Mécanismes de contrôle de la flore microbienne par les IgA sécrétoires.....	38
1.2.4.4 Triple rôle de l'IgA sécrétoire: confinement de la flore, contrôle des pathogènes et optimisation du commensalisme.....	40
1.3 PHENOTYPES DES MODELES MURINS DE DEFICIT EN IGA.....	41
1.3.1 DESCRIPTION DES MODELES DE DEFICIT EN IGA.....	41
1.3.1.1 Déficit quantitatif en IgA.....	41
1.3.1.2 Déficit qualitatif : anomalie du répertoire et de l'affinité des IgA.....	43
1.4 PHENOTYPES CLINICO-BIOLOGIQUES DES DEFICITS EN ANTICORPS CHEZ L'HOMME.....	45
1.4.1 LE DEFICIT EN IGA SELECTIF.....	45
1.4.2 LE DEFICIT IMMUNITAIRE COMMUN VARIABLE.....	49
2 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....	53
3 RESULTATS.....	55
4 DISCUSSION.....	139
5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	150
6 ANNEXES.....	153
6.1 ANNEXE 1 : STRUCTURE DES IGA SECRETOIRES.....	153
6.2 ANNEXE 2: TABLEAU DES TAXONS COMMENSAUX INTESTINAUX HUMAINS IGA+.....	154
6.3 ANNEXE 3: EVALUATION DE LA REPOSE VACCINALE ANTI-PNEUMOCOCCIQUE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	155
6.4 ANNEXE 4: RÉCAPITULATIF DES CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES DE LA COHORTE.....	156
7 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	157

Abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique
AID : Activation induced Cytidine deaminase
ARN : Acide ribonucléique
CAG: Co-abundant genes units
Cellules M : Microfold cells
CFU : Colony forming unit
DICV : Déficit immunitaire commun variable
dIgA: Dimères d'IgA
DIgA : Déficit en IgA sélectif
Fab : Fragment antigen binding
Fc : Fragment crystallizable
Fox-P3: Forkhead box P3
GALT : Gut associated lymphoid tissue
KO : Knock out
LPS : Lipopolysaccharide
MALT : Mucosa associated lymphoid tissue
MGS : Metagenomic species
OTU: Operational taxonomic unit
PAMP: Pathogen-associated molecular patterns
PCR : Polymerase chain reaction
PD-1 : Programmed cell death protein-1
pIgR : Récepteur aux Ig polymériques
SIgA: IgA sécrétoire
T_{FH} : Follicular helper T-cells
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

1 Introduction

1.1 Le microbiote intestinal

1.1.1 Définitions

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des micro-organismes vivants dans le tractus digestif et regroupe par conséquent les bactéries, les archaea, les parasites, les champignons et les virus (bactériophages et virus eucaryotes). Le royaume bactérien est dominant dans l'intestin (>95% des microorganismes) mais l'étude du "virome", du "mycobiome" ainsi que des archaea représente également un intérêt médical majeur en physiologie ainsi que dans certaines pathologies (implication du mycobiome dans les maladies inflammatoires de l'intestin (4) et du virome dans l'entéropathie associée à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (5)). Ces éléments du microbiote intestinal ne seront pas traités ici car ce travail porte exclusivement sur l'étude de la flore intestinale bactérienne chez l'homme.

La flore bactérienne colique humaine est un consortium complexe de 10^{14} bactéries représentant 200 000 à 1 000 000 de gènes bactériens en fonction des individus (soit 10 à 50 fois plus que l'hôte), pèse environ 2 kgs, présente plusieurs fonctions et doit de ce fait être considérée comme un organe à part entière (6). La description de la flore bactérienne a beaucoup évolué au cours du 20^{ème} siècle grâce aux progrès technologiques, notamment aux techniques de séquençage génomique de nouvelle génération. En effet, la découverte et la culture de la première bactérie par T. Escherich (*Escherichia coli*) remonte à 1885 (7); par la suite, grâce à l'amélioration des milieux de culture (milieux sélectifs et anaérobiose stricte) et des tests d'identification biochimique, plus de 110 espèces sont caractérisées dans les années 1970. L'identification taxonomique a rapidement été limitée par l'impossibilité de cultiver

toutes les espèces. L'émergence des techniques de biologie moléculaire dans les années 1980 a permis d'élargir l'identification bactérienne en extrayant et séquençant l'ADN bactérien, indépendamment de la culture bactérienne; grâce au séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16s puis au séquençage haut débit de l'ensemble de l'ADN bactérien (depuis 2010), on dénombre à l'heure actuelle plus de 1000 espèces, et leur définition est en perpétuelle réactualisation (8), ce qui a considérablement approfondi notre connaissance du microbiote intestinal.

1.1.2 Techniques de séquençage de l'ADN bactérien (6)

Il existe deux techniques principales de séquençage génomique bactérien : le séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S (pyroséquençage 16S) et le séquençage haut débit "métagénomique" de tout le génome bactérien. Les deux techniques sont réalisables après recueil des selles et extraction de l'ADN bactérien.

Le pyroséquençage 16S consiste à séquencer les gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S qui est une sous-unité des ribosomes bactériens. Ce gène a pour avantage de contenir à la fois des régions très conservées dans le royaume bactérien et neuf régions très variables (V1 à V9) permettant de distinguer les espèces entre elles tout en utilisant des amorces nucléotidiques universelles complémentaires des régions conservées. Les séquences obtenues après amplification couvrent en général 3 régions hypervariables associées aux régions constantes (V1 à V3 ou V3 à V6) ce qui peut limiter la résolution de l'identification taxonomique étant donné que deux espèces proches peuvent avoir une homologie complète sur trois régions variables. Ainsi, une "espèce" identifiée par séquençage 16S et non par culture est appelée une OTU (operational taxonomic unit). Notons par ailleurs que le nombre de copies du gène 16s peut varier d'une bactérie à l'autre au sein de la même espèce rendant son utilisation pour la quantification des abondances bactériennes délicate. Cette technique est

néanmoins peu onéreuse, rapide et permet une identification taxonomique d'échantillons en quantité très faible.

Le séquençage haut débit aléatoire de tout le génome bactérien, dit "métagénomique" consiste à séquencer tout le génome bactérien après une étape de fractionnement de l'ADN bactérien en fragments de 50 paires de bases. Les courtes séquences obtenues après amplification en chaîne en émulsion (*bead emulsion* PCR) sont ensuite comparées à un catalogue de gènes bactériens de référence. Une reconstruction bioinformatique des génomes est réalisée en se basant sur le principe de co-abondance et de co-variance des gènes bactériens constituant une espèce métagénomique (on s'attend à ce que tous les gènes d'une même espèce aient la même abondance et que leurs abondances évoluent dans le même sens d'un échantillon à l'autre). Elle est possible car chaque gène bactérien est unique et hautement polymorphe, de sorte que tous les fragments de 50 paires de bases appartenant à des espèces différentes sont distinguables. On définit ainsi des unités fonctionnelles générées *in silico* dénommées "CAG" sur la base de la co-abondance et de la co-variance des gènes qui sont des équivalents d'espèces bactériennes (CAG: co-abundant genes, MGS:metagenomic species=CAG>700 gènes (9)). La plupart de ces unités fonctionnelles correspondent à des espèces décrites *in vivo* ou des OTU générées par pyroséquençage 16-S mais une partie reste inconnue. En effet, grâce à l'analyse de la co-abondance et de la co-variance des gènes dans un grand nombre d'échantillons, ce séquençage aléatoire permet de reconstruire des espèces *in silico* sans la nécessité d'un catalogue de référence, permettant ainsi la découverte de nouvelles espèces. Cette technique, contrairement au pyroséquençage 16S ne se limite pas à l'identification taxonomique mais permet d'explorer tout le génome bactérien. Ainsi, on peut par exemple étudier des régions génomiques particulières conférant une résistance aux antibiotiques (10) et étudier les voies métaboliques de l'ensemble du microbiote en se basant sur l'étude des gènes bactériens indépendamment de l'identification des espèces (11).

Les deux techniques de séquençage présentent des limites communes, à savoir : un manque de sensibilité pour la quantification des faibles abondances, l'introduction de biais associés à l'amplification en chaîne de l'ADN, et enfin la limitation aux données génomiques sans prendre en compte les modifications post-génomiques prenant place *in vivo*.

Les deux techniques présentent également leurs biais et limitations propres. Le pyroséquençage 16S est techniquement relativement simple à réaliser, mais l'utilisation de sondes d'amorçage introduit des biais dans l'analyse 16s. La manipulation des données de grande taille générée par l'approche métagénomique est particulièrement fastidieuse et techniquement ardue. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces techniques peut donc faire varier les résultats d'analyse pour un même échantillon. Cette notion doit être prise en compte pour interpréter les données disponibles dans la littérature. De plus, même si ces techniques permettent une description approfondie des espèces, elles ne peuvent directement rendre compte de leur état fonctionnel *in vivo*. La fonction des espèces peut toutefois être abordée *in silico*, et plus particulièrement à partir des données métagénomiques, en se basant sur la fonction connue, ou attendue, des gènes retrouvés.

1.1.3 Taxonomie bactérienne

Les espèces bactériennes présentes dans le tube digestif sont des bactéries dites "commensales" ce qui signifie qu'elles colonisent l'hôte symbiotiquement. Certaines de ces espèces peuvent néanmoins se révéler pathologiques pour l'hôte dans certaines conditions et sont appelées "pathobiontes". Par exemple, la perturbation de l'équilibre écologique par antibiothérapie peut favoriser la survenue d'une colite à *Clostridium difficile* qui est une bactérie commensale à l'équilibre (12). Enfin, certaines bactéries sont des pathogènes obligatoires pour l'homme et ne sont retrouvées qu'en cas de pathologie infectieuse avérée (ex: *Shigella dysenteriae*).

On peut classer les bactéries taxonomiquement en fonction du degré d'homologie de leurs génomes et construire un arbre phylogénétique contenant plusieurs niveaux d'identification correspondant aux embranchements majeurs. On définit ainsi une bactérie unique (*souche bactérienne, niveau le plus précis d'identification*) par son appartenance à une *espèce* bactérienne (voire à une *sous-espèce*), puis à un *genre*, une *famille*, une *classe*, un *ordre* et un *phylum*. Plusieurs espèces bactériennes proches génétiquement se regroupent en un genre bactérien, puis plusieurs genres bactériens proches se regroupent en famille et ainsi de suite. Le phylum est ainsi le niveau d'identification le plus large, et la souche le niveau d'identification le plus résolutif (Exemple schématique pour *Escherichia coli*, *figure 1*). Ainsi, pour décrire la composition taxonomique d'un ensemble complexe de bactéries comme le microbiote intestinal, on peut se situer à plusieurs niveaux d'analyse de résolution croissante.

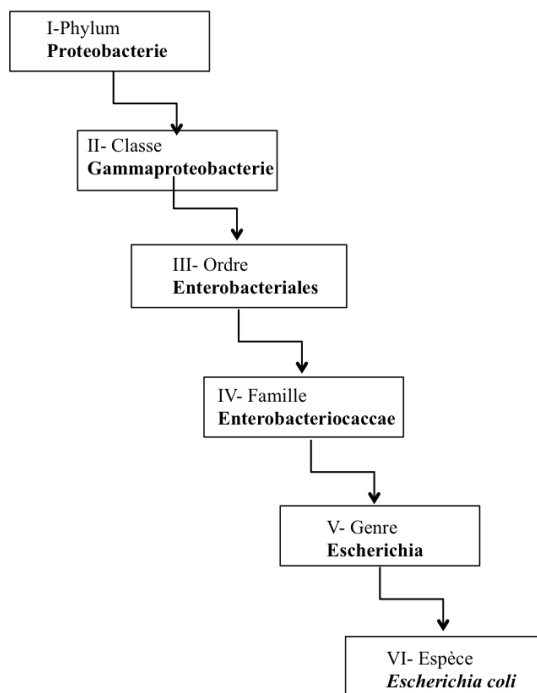


Figure 1: Représentation schématique de la taxonomie d'*Escherichia coli*

Définition d'une espèce (ici, *Escherichia coli*) par son appartenance à un genre (*Escherichia*) qui regroupe d'autres espèces proches (ex: *Escherichia albertii*), une famille (*Enterobacteriaceae*), un ordre (*Enterobacteriales*), une classe (*Gammaproteobacteries*) et un phylum (*Proteobacteries*). L'identification d'une espèce par les techniques de séquençage peut être insuffisamment résolutive pour déterminer le taxon au niveau d'identification le plus précis, c'est à dire l'espèce ou la sous-espèce.

On dénombre actuellement plus de 30 phyla bactériens dont 7 sont dominants dans la flore colique humaine : Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Spirochaetes, Tenericutes et Fusobacteria (les deux premiers représentant

plus de 70% de la flore). Un catalogue des espèces bactériennes intestinales humaines par analyse métagénomique a été publié en 2010 (13), et plusieurs réactualisations ont été faites depuis.

1.1.4 Composition du microbiote intestinal

1.1.4.1 Structure

1.1.4.1.1 Variation longitudinale et axiale du microbiote intestinal

Le tube digestif des mammifères représente un lieu privilégié pour la colonisation bactérienne, lui conférant une niche finement régulée, riche en nutriments et de température stable. Cependant, les conditions de pH, de taux d'oxygène, de concentration en peptides anti-microbiens (sécrétés par les entérocytes), de concentration en sels biliaires, de durée de transit intestinal, varient le long de l'intestin et façonnent longitudinalement la composition du microbiote en créant des micro-niches étagées. La concentration bactérienne augmente de l'estomac (milieu acide et partiellement aérobie) au colon (milieu anaérobie strict) avec moins de 10^5 bactéries dans l'estomac, et jusqu'à 10^{14} dans le colon.

Par ailleurs la répartition des familles bactériennes, ainsi que leur diversité, varient entre intestin grêle et colon. La flore bactérienne est peu diverse, dominée par les Lactobacillaceae et Enterobacteriaceae dans l'iléon. On retrouve une prédominance de Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae et Lachnospiraceae dans le colon. Ces différences s'observent aussi bien chez l'homme que chez la souris (14, 15). Par ailleurs, au sein du même segment intestinal, on observe une différence de composition microbienne lorsqu'on sectionne longitudinalement le tube digestif. En effet, les bactéries proches de l'épithélium ne sont pas sensibles à l'oxygène (muqueuse vascularisée riche en oxygène) et sont résistantes aux peptides anti-microbiens. Les bactéries retrouvées au plus près de l'hôte, à savoir dans les cryptes intestinales, tolèrent non seulement l'oxygène mais possèdent aussi

des capacités particulières de mobilité et d'adhésion à l'épithélium. Les bactéries résidant dans les couches de mucus (2 couches superposées dans le colon et une couche unique dans l'intestin grêle), ont quant à elles la capacité de dégrader la mucine (ex: *Akkermansia muciniphila*) (16).

L'étude du microbiote digestif humain repose le plus souvent sur l'analyse des selles et ne rend donc compte que de la composition du microbiote intra-luminal colique, sans aborder l'analyse fine des différents compartiments.

1.1.4.1.2 Evolution temporelle du microbiote

Le tractus digestif du fœtus est stérile *in utero*. Sa colonisation bactérienne débute dès la naissance, certaines études suggérant même que ce processus commence *in utero* (17). En fonction de la voie d'accouchement (voie basse ou césarienne), le nouveau né se colonise avec la flore vaginale ou cutanée de sa mère, respectivement. En cas d'allaitement maternel, la colonisation se poursuit à partir de la flore cutanée, mais également à partir de la flore du lait maternel (18). Ainsi, les études comparant le microbiote des nouveaux nés par césarienne ou par voie basse retrouvent des différences de composition microbienne. Les microbiotes des nourrissons nés par voie basse sont plus homogènes entre eux que ceux des enfants nés par césarienne (19). Cette donnée a été récemment renforcée par une étude ayant démontré qu'en badigeonnant la bouche de nouveaux nés par césarienne avec une compresse imbibée de microbiote vaginal maternel, on pouvait restaurer un microbiote identique à celui des enfants nés par voie basse (20). L'implication de ces différences pour la santé humaine n'est pas pour l'instant clairement établie, même si certains auteurs suggèrent que la naissance par césarienne favorise la survenue de maladies auto-immunes et de phénomènes allergiques. Une étude danoise portant sur le suivi de deux millions de naissances retrouve en effet une corrélation statistique positive entre l'accouchement par césarienne et l'incidence de maladies auto-immunes et de phénomènes allergiques (21).

Par ailleurs, plusieurs études montrent que lors des premières années de vie, la composition du microbiote des enfants est hautement dynamique. La flore est peu diverse mais déjà très abondante initialement. On observe ensuite une diversification des espèces rythmée par le sevrage en lait maternel et la diversification alimentaire (ainsi que par le système immunitaire, notion abordée ultérieurement). La maturation du microbiote se déroule dans les trois premières années de la vie pour atteindre à cet âge la composition "adulte", et ceci dans toutes les régions du monde étudiées (22, 23) (Figure 2). Ainsi, il semblerait que la colonisation et la diversification bactérienne soit un processus rapide et dynamique se déroulant dans les premières années de vie, déterminant la composition du microbiote au long cours.

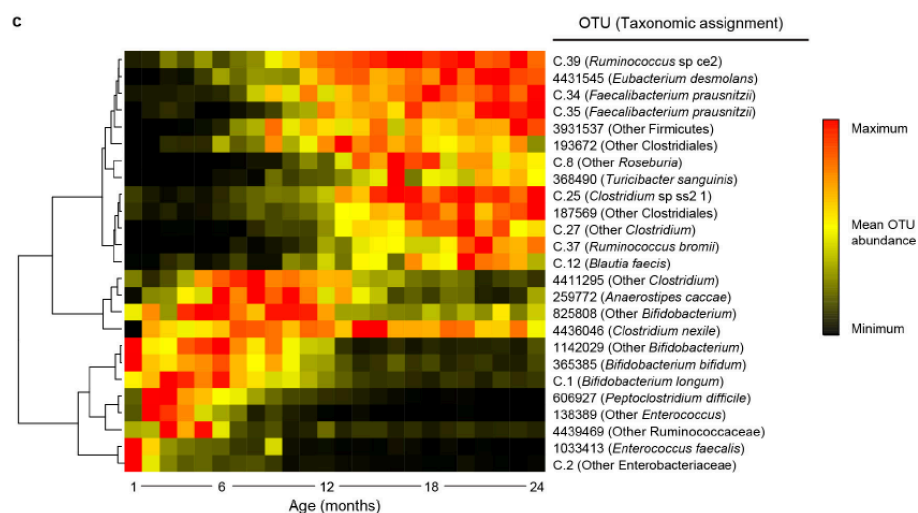


Figure 2: Evolution de la composition des taxons dominants dans les 24 premiers mois du développement humain (Planer et al, *Nature, Development of the gut microbiota and the mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice* (24), 2016.)

Cette figure représente les 25 taxons dont l'évolution des abondances relatives au cours des 24 premiers mois du développement humain (étude de jumeaux) détermine la composition du microbiote intestinal (rouge=abondance maximum, noir=abondance minimum). On observe un changement majeur dans la composition du microbiote à l'âge de 12 mois, avec n=8 taxons qui se raréfient, n=13 taxons qui s'expandent, et n=4 qui restent stables. Cette carte donne par ailleurs la liste des taxons qui colonisent en premier le nourrisson.

Une étude princeps de 2013 a démontré la stabilité du microbiote intestinal à l'âge adulte. Cette analyse longitudinale de la composition des selles (pyroséquençage 16-S) de 37 adultes américains sains suivis pendant 5 ans a révélé que plus de 60% des espèces

(appartenant aux phyla Bacteroidetes et Actinobacteria principalement) sont retrouvées à chaque échantillonnage chez un individu (25). Une autre étude longitudinale récente retrouve des résultats similaires même si elle n'est réalisée que sur 3 donneurs (26). L'étude des sujets âgés de plus de 65 ans dits "seniors" ainsi que des centenaires comparés à des "adultes jeunes" montrent une altération du microbiote intestinal, qui s'accroît avec l'âge, le lieu de vie, les co-morbidités ainsi que l'alimentation, et dont la composition est hautement variable au cours du temps (27-29).

1.1.4.1.3 Facteurs de modification du microbiote

Outre l'âge qui a été discuté au paragraphe précédent, plusieurs autres facteurs influencent la composition du microbiote. Tous les paramètres qui peuvent avoir un impact sur la sélection, la diversification et la croissance bactérienne peuvent être impliqués. Le nombre de ces paramètres ne cesse d'augmenter (30, 31), et nous ne détaillerons que les déterminants majeurs.

On peut distinguer les facteurs intrinsèques à l'hôte (caractéristiques démographiques, mode de vie, système immunitaire) des facteurs extrinsèques qui peuvent survenir au cours de la vie (iatrogénie médicamenteuse, infections digestives invasives).

Les **facteurs intrinsèques** retrouvés dans la littérature sont les suivants : (i) le régime alimentaire : Wu et al ont démontré en 2011(32) que le régime alimentaire était étroitement lié à la composition du microbiote chez 98 donneurs (consommation de protéines et de graisses animales versus carbohydrates) (ii) l'origine géographique (23) (comparaison de cohortes d'enfants et d'adultes d'Amérique du Nord versus d'Amérique du Sud et du Malawi, n=531 individus), (iii) le CMH (étude de microbiotes dans des groupes de souris congéniques exprimant des CMH différents (33), microbiotes plus similaires chez les jumeaux versus des enfants non apparentés (24), (iv) l'environnement familial (les microbiotes de frères et soeurs et d'enfants à parents sont plus proches que lorsqu'ils sont comparés à des individus non-

apparentés appariés en âge (23, 34), (v) et le transit intestinal (flore moins abondante et moins diverse en cas de diarrhée) (30, 35).

Les **facteurs extrinsèques** peuvent être iatrogéniques. Les antibiotiques sont au premier rang des facteurs iatrogéniques, comme l'illustrent bien l'altération du microbiote post-antibiothérapie responsable de colites à *Clostridium difficile* ou la survenue de mycoses vaginales post-antibiothérapie. Les inhibiteurs de la pompe à proton (36) et les anti-diabétiques oraux (37) ont également un impact sur la composition du microbiote digestif, notamment en diminuant l'acidité gastrique. La survenue d'infections digestives invasives peut également altérer la flore intestinale « normale » (modification drastique de la flore intestinale murine après infection par *Yersinia pseudotuberculosis* (38)). Enfin, l'inflammation intestinale chronique (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) est associée à une dysbiose majeure (39).

Notons que quelques mois après un événement aigu entraînant un déséquilibre écologique, la flore intestinale tend à retrouver sa composition antérieure, reflétant un phénomène de résilience du microbiote intestinal (40).

1.1.4.1.4 Comment peut-on définir un microbiote "sain"?

La composition d'un microbiote dit "sain" se base à l'heure actuelle sur des études de cohortes d'individus "sains" c'est-à-dire sans pathologie avérée, mais elles ne prennent pas systématiquement en compte les facteurs de variabilité sus-cités. Ainsi, un microbiote sain se définit simplement dans la plupart des cas par opposition à un microbiote "dysbiotique", c'est-à-dire associé à une pathologie.

Deux *consortia* internationaux se sont constitués pour établir la description exhaustive des espèces intestinales humaines. Le Human Microbiome Project Américain (41) se base sur l'analyse des selles par pyroséquençage 16S et séquençage métagénomique. Le programme Européen MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) repose sur le séquençage

métagénomique. Plus de 4000 individus sains tous âge et origine ethnique confondus ont été étudiés à l'heure actuelle (30). Les résultats des différentes études ne sont pas comparables en termes de méthodologie technique et analytique mais on peut retenir globalement que (i) quelques phyla sont dominants dans l'intestin humain, notamment les phyla Bacteroidetes et Firmicutes qui comptent pour plus de 70% de la composition globale (la prédominance de l'un ou de l'autre dépend de la technique utilisée) (ii) plus de 600 genres et plus de 1000 espèces différentes ont été retrouvés à l'échelon de la population globale mais chaque individu n'abrite environ que 200 espèces différentes. De plus, lorsqu'on analyse la composition microbienne des sujets sains au niveau taxonomique le plus élevé, c'est à dire le phylum, la répartition est équivalente d'un individu à l'autre. En revanche, lorsque l'analyse est réalisée au niveau des espèces, il existe une très grande variabilité inter-individuelle, rendant difficiles les analyses ayant pour but de faire émerger des espèces bactériennes associées à des pathologies.

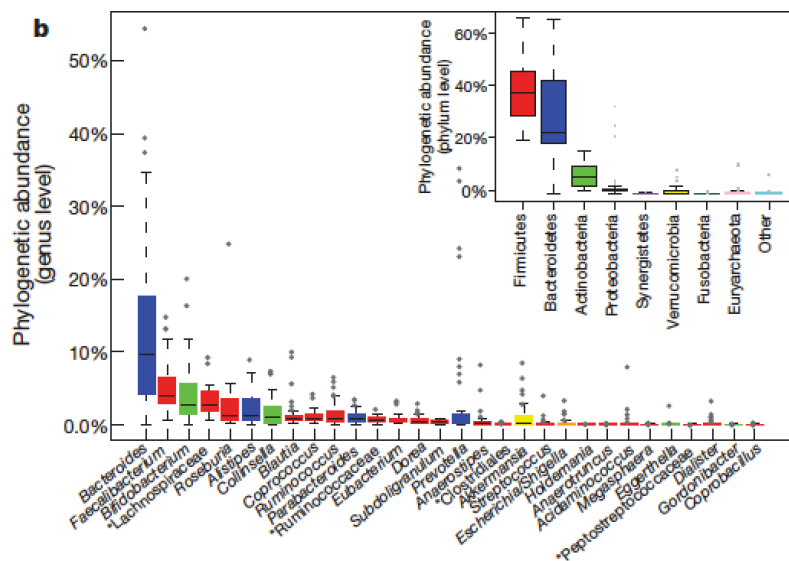


Figure 3: Représentation des phyla et des genres dominants identifiés par séquençage métagénomique dans la flore intestinale humaine Arumugam et al, Enterotypes of the human gut microbiome (42), Nature 2011.

Ces boîtes à moustache représentent en haut à droite les abondances des phyla dominants (n=8) chez l'homme (Firmicutes étant le plus abondant, pourcentage médian:38%) et des genres dominants (n=30) par ordre d'abondance décroissante.

Arumugam et al (42) ont publié en 2011 une approche analytique en "clusters" pour pouvoir décrire de manière simplifiée les variations normales d'un microbiote sain. Une analyse d'ordonnancement hiérarchique (« clustering ») non supervisée des abondances des genres identifiés dans une cohorte initiale de 33 donneurs américains identifie 3 grands clusters, appelés entérotypes. Cette analyse a été étendue dans le même article à 22 donneurs européens, 154 donneurs américains et 85 donneurs danois, et y retrouve les mêmes résultats. Elle révèle que la variation en abondance de 3 genres seulement (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus*, *Figure 4*) est caractéristique de chaque entérotype. Par conséquent, en se basant sur la répartition des abondances de ces trois genres, on peut définir un entérotype qui reflète la composition globale du microbiote. Cette répartition en entérotypes a par la suite été reproduite dans plusieurs études et est corrélée au type de régime alimentaire (32). Néanmoins, elle n'est pas valide chez les enfants en bas âge (40), ni dans les populations non occidentalisées (23).

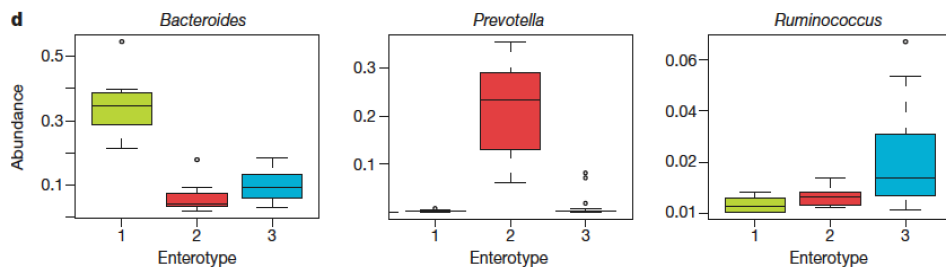


Figure 4: Définition des entérotypes chez l'homme par séquençage métagénomique, Arumugam et al, Enterotypes of the human gut microbiome (42), Nature 2011

L'analyse par classification hiérarchique des abondances des genres chez n=294 individus a permis d'identifier trois grands profils de composition microbienne déterminés par l'abondance de trois genres différents appelés entérotypes. (i) chef de file = *Bacteroides*, entérotype 1, (ii) chef de file = *Prevotella*, entérotype 2, (iii) chef de file = *Ruminococcus*, entérotype 3. Ces entérotypes ont par ailleurs été reliés au régime alimentaire (32) et à la fonction métabolique du microbiote.

Malgré la variabilité interindividuelle qualitative et quantitative, on retrouve néanmoins un "core microbiome", c'est à dire un consortium bactérien partagé par la majorité des individus sains. Falony et al. (30), ont montré dans une étude portant sur les données de plus de 4000 individus au mode de vie occidental, collectées au cours de plusieurs études

différentes, qu'il existe un groupe de 17 genres différents partagés par plus de 95% des donneurs. Le périmètre de ce microbiome nucléaire (ou essentiel) se réduit à 14 genres lorsque 308 individus originaires de Papouasie-Nouvelle Guinée, du Pérou et de Tanzanie sont inclus dans l'analyse. Le core microbiome représente chez un individu environ 72,2% du microbiome total, et l'abondance de 10 genres seulement explique la variabilité inter-individuelle (*Figure 5*).

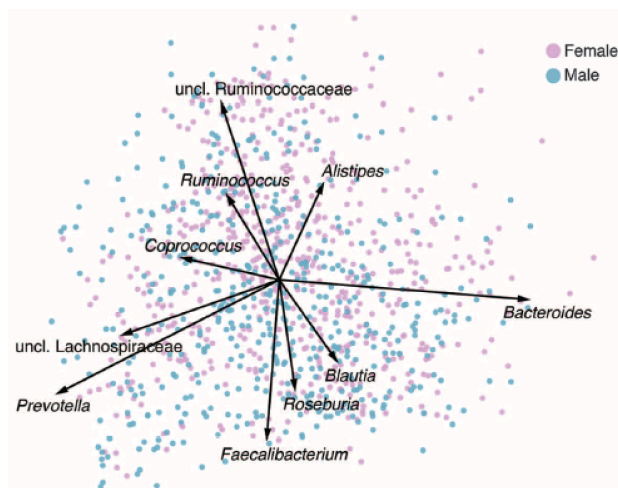


Figure 5 : Représentation des 10 genres déterminant la composition du microbiote intestinal d'individus sains, Falony et al, Population-level analysis of gut microbiome variation (30), Science 2016, Core microbiome at genus level

Représentation selon une analyse en composante principale des 10 genres dont la variance permet d'expliquer la composition de la flore intestinale chez n=4000 individus sains (points roses = individus de sexe féminin, points bleus=individus de sexe masculin, pas de différence). La longueur des flèches est proportionnelle à la contibution de chaque genre.

D'autres paramètres outre la répartition et l'abondance des espèces sont employés pour décrire la composition de la flore. On distingue (i) la diversité, c'est-à-dire le nombre d'espèces différentes en présence dans l'échantillon et (ii) la richesse génique, c'est-à-dire, le compte total de gènes bactériens (indépendamment des espèces, mesure accessible par analyse métagénomique uniquement) présents dans l'échantillon. La diversité bactérienne est en effet corrélée à la "santé" car (i) elle est souvent diminuée en cas de dysbiose, (ii) elle est corrélée à l'émergence d'infections invasives par des pathobiontes comme le montre l'exemple de la colite récidivante à *Clostridium difficile* (43) survenant chez des patients présentant une

faible diversité bactérienne (restaurée après transplantation fécale). Notons que les donneurs sains "non occidentalisés" (malawiens et amérindiens) présentent une diversité microbienne supérieure à celle des donneurs occidentaux (23). Par ailleurs, Le Chatelier (44) *et al.*, ont démontré en 2013 dans une cohorte de patients obèses, qu'on pouvait identifier deux sous-groupes de patients en fonction de leur nombre de gènes bactériens (faible compte de gènes versus compte de gènes élevé) et que les patients à faible richesse génique présentaient significativement plus de co-morbidités que l'autre sous-groupe (association au diabète de type 2, survenue d'événements cardio-vasculaires, inflammation). Il est intéressant de noter que l'intervention diététique peut moduler le nombre de gènes bactériens, mais est beaucoup moins efficace en terme de correction des co-morbidités associées dans le sous-groupe "faible compte de gènes" (45), qui semble de ce fait être un marqueur de mauvais pronostic.

Il existe plusieurs exemples de pathologies humaines associées à une dysbiose, c'est-à-dire une altération de la composition "normale" du microbiote. La dysbiose peut être plus ou moins marquée avec certains cas d'altération majeure et d'autres cas de modifications plus subtiles. La pathologie humaine la plus illustrative de dysbiose majeure est la maladie de Crohn, qui se caractérise par une inflammation diffuse et étagée du tube digestif associée à une diminution drastique en diversité et en abondance des espèces du phylum Firmicutes, et notamment à une diminution marquée en *Faecalibacterium prausnitzii*, une espèce aux effets anti-inflammatoires démontrés (46). D'autres pathologies ont été associées à une dysbiose intestinale plus modérée comme le diabète de type 2, l'obésité (44), la sclérose en plaques (47, 48) et la polyarthrite rhumatoïde (49). Ces études suggèrent donc qu'il existe une association statistique entre un microbiote intestinal dysbiotique et certaines pathologies, mais ne démontrent pas de lien de causalité. Les éléments qui permettent d'établir de manière plus formelle un lien de causalité sont les modèles murins de transfert de maladie par transplantation fécale (50, 51), de guérison de pathologie par déplétion de certaines espèces

ou d'absence de développement de pathologie chez des souris génétiquement prédisposées en l'absence de colonisation par la flore intestinale (52).

Au total, une définition universelle d'un microbiote sain est difficile à établir et relèverait plutôt d'une définition personnalisée même si des caractéristiques communes émergent, certains genres bactériens dominants semblent obligatoires (core-microbiome) et la répartition des phyla étant partagée. Par ailleurs, la diversité et la richesse génique élevées semblent être des marqueurs d'une meilleure "santé microbienne".

1.1.4.2 Fonctions

Le microbiote intestinal, organe à part entière, est une entité fonctionnelle indispensable à l'hôte. En effet, il est impliqué dans plusieurs fonctions vitales, et son altération peut, en corollaire, être à l'origine de pathologies. On en dénombre quatre majoritaires qui ne sont pas indépendantes les unes des autres:

- (i) le rôle métabolique (métabolisation des aliments et des xénobiotiques)
- (ii) le rôle "écologique" (protection contre les pathogènes par occupation de l'espace et compétition pour les nutriments = occupation des niches et aussi par induction de réponses immunitaires ayant une réactivité croisée pour les pathogènes) (53),
- (iii) le rôle trophique (renouvellement de l'épithélium intestinal)
- (iv) le rôle immunologique qui sera le seul développé dans ce paragraphe.

La flore intestinale est impliquée dans l'induction du système immunitaire muqueux ainsi que dans le maintien des réponses immunitaires tout au long de la vie (54). La meilleure illustration de la nécessité de la colonisation bactérienne pour l'induction du MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) est le modèle de souris "germ free" (souris stériles) qui présentent des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques hypotrophiques ainsi que l'absence de structures lymphoïdes tertiaires. De plus, il est intéressant de noter que le développement du système immunitaire muqueux se fait en parallèle des séquences de colonisation néonatale, et

que la stabilisation du microbiote intestinal vers l'âge de trois ans coïncide avec la fin de la maturation du MALT. Ainsi, la flore intestinale induit et "éduque" le système immunitaire, rendant cette période de la vie importante pour le développement des réponses immunitaires. Ainsi, le sous-développement du MALT chez la souris germ-free est donc réversible après recolonisation avec un microbiote complexe dans cette "fenêtre d'action".

De nombreuses études murines précisent les liens qui existent entre certaines espèces bactériennes et l'induction de sous-types cellulaires en particulier (*Figure 6*); Ivanov *et al.* (55) ont démontré en 2009 l'induction de lymphocytes T sécréteurs d'IL-17 et d'IL-22 (TH17) dans des souris "germ-free" monocolonisées par le *SFB* (*Segmented filamentous bacterium*). Atarashi *et al* ont montré en 2011 (56), l'augmentation de cellules T régulatrices après gavage des souris par un mélange d'espèces appartenant au genre *Clostridium* leur conférant une résistance à la colite chimique par DSS. De plus, Crabbé *et al.* (57) ont démontré dès 1968 la nécessité de la colonisation bactérienne pour induire la présence de plasmocytes IgA+ dans la muqueuse intestinale.

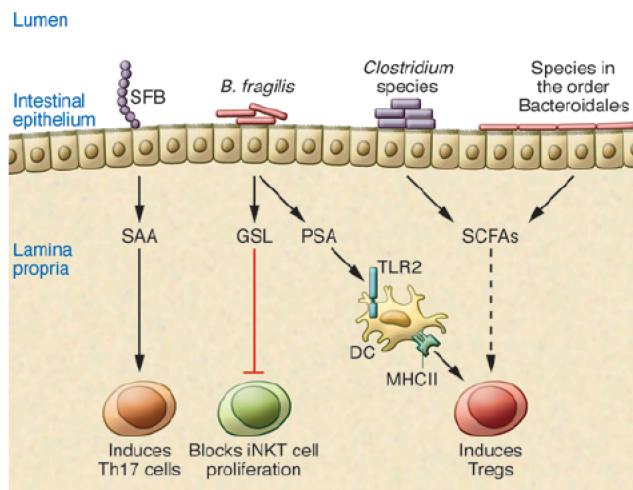


Figure 6 : Identification d'espèces bactériennes influençant la différenciation lymphocytaire T dans la muqueuse intestinale chez la souris, Neeraj K. Surana and Dennis L. Kasper, The Journal of Clinical Investigation (58), Vol 24, N 10, oct 2014

Le SFB (*Segmented filamentous bacteria*) induit indirectement la différenciation TH17 en stimulant la production de SAA (sérum amyloïde A) par l'hôte. *Bacteroides fragilis* produit à la fois des glycosphingolipides (GSL) qui inhibent les iNKT (invariant Natural Killer-T cells) et interagit avec le TLR-2 (Toll like receptor 2) des DC (cellules dendritiques) intestinales via le PSA (polysaccharide A) pour induire des T-regs. Induction de Treg par les SCFAs (short chain fatty acids) produits par des espèces de *Clostridium*.

La relation entre la flore commensale et le système immunitaire n'est pas à sens unique. Le système immunitaire muqueux induit par la flore va en retour interagir avec celle-ci pour permettre l'établissement d'un mutualisme harmonieux dans lequel les deux partenaires peuvent co-exister, bénéficier l'un de l'autre, sans agression. Les mécanismes exacts de ce mutualisme sont multiples, ne sont pas encore élucidés, et impliquent de nombreux acteurs cellulaires et solubles localisés dans différentes structures anatomiques (Figure 7).

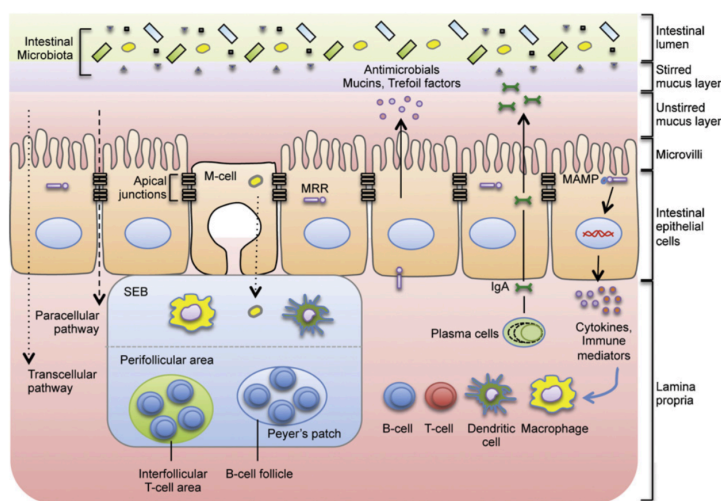


Figure 7: Médiateurs cellulaires et solubles de l'homéostasie intestinale (59)

L'homéostasie hôte-flore intestinale est médiée par plusieurs facteurs : (i) la barrière intestinale qui se compose d'un épithélium spécialisé très étanche car les entérocytes sont reliés par des jonctions serrées apicales, (ii) la double couche de mucus et (iii) les peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales, (iv) les cellules spécialisées dans l'échantillonnage bactérien : cellules M et cellules dendritiques, (v) les structures lymphoïdes secondaires, lieux privilégiés d'induction des réponses humorales de type IgA, favorisées par (vi) le micro-milieu cytokinique, et enfin (vii) les plasmocytes de la lamina propria sécrétant les IgA dans la lumière intestinale.

L'IgA a un rôle central dans ce mutualisme, et le chapitre suivant développe plus précisément l'état de nos connaissances actuelles sur ce sujet en particulier.

1.2 Physiologie de l'IgA

1.2.1 Introduction : structure de l'IgA

L'IgA est retrouvée dans deux compartiments: (i) les muqueuses, où elle est l'immunoglobuline la plus abondante et (ii) le sérum, où elle est la deuxième plus abondante après l'IgG. Chez l'homme, l'IgA présente deux isotypes, l'IgA1 et l'IgA2, contrairement à la souris qui n'en présente qu'un. Les deux isotypes diffèrent dans la structure de leur zone charnière, plus longue de 13 acides aminés pour l'IgA1, contenant de nombreux sites de glycosylations (en O-terminal contrairement à l'IgA2). Cette particularité de la zone charnière confère à l'IgA1, contrairement aux autres immunoglobulines, une forme en "T" et non en "Y" (Figure 8), mais l'expose à la protéolyse bactérienne (60, 61). A l'heure actuelle, aucune protéase pouvant cliver l'IgA2 n'a été décrite. L'IgA1 est l'isotype prédominant dans le sérum (plus de 90%) alors que le ratio est de 1:1 dans les muqueuses intestinales (62).

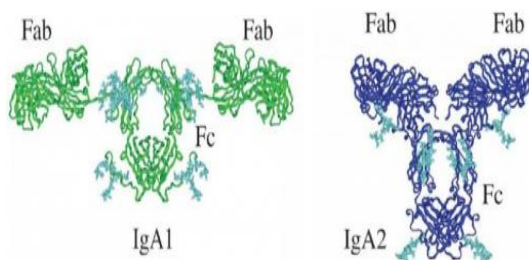


Figure 8: représentation des IgA1 et IgA2, Proteopedia

L'IgA1 possède 13 acides aminés supplémentaires dans la zone charnière qui déterminent sa forme et l'expose à la protéolyse bactérienne en raison des résidus glycosylés présents à ce niveau.

Par ailleurs, l'IgA peut se multimériser: la forme sérique est monomérique alors que la forme sécrétée dans les muqueuses est dimérique. La multimérisation est rendue possible grâce à un peptide sécrété par le plasmocyte, la chaîne J, qui relie les chaînes lourdes entre elles de manière covalente. Ce mécanisme est restreint aux IgA et aux IgM car les fragments constants des chaînes lourdes C α et C μ contiennent une région nucléotidique supplémentaire leur conférant un site de liaison à la chaîne J (2). La régulation de la sécrétion de la chaîne J n'est pas très bien connue mais il semblerait qu'elle soit exprimée par tous les plasmocytes (y

compris les plasmocytes IgG), mais préférentiellement par les plasmocytes IgA⁺ des muqueuses, expliquant le caractère multimérique des IgA sécrétoires (63).

Ainsi la majorité des IgA sériques sont des monomères d'IgA1 alors que les IgA sécrétoires sont des dimères d'IgA1 et d'IgA2 à quantité égale.

1.2.2 Propriétés biologiques de l'IgA sérique

1.2.2.1 Sites d'induction et spécificités des IgA sériques

Le rôle de l'IgA sérique dans les réponses immunitaires est peu connu et a toujours été considéré comme mineur. Les études menées sur cet isotype se sont principalement concentrées sur les réponses muqueuses. Les sites d'induction des réponses IgA sériques sont classiquement décrits comme étant la rate, la moelle osseuse, et les structures lymphoïdes secondaires non associées aux muqueuses. Il existe très peu d'études portant sur le répertoire ainsi que les spécificités des IgA sériques. Holtmeier *et al.* (64) ont comparé les répertoires des IgA coliques (sur biopsies coliques) à ceux des lymphocytes B mémoires circulants autologues chez 4 donneurs sains et retrouvent une absence de chevauchement entre les deux, concluant que le répertoire sérique est différent du répertoire colique. En revanche, Lemke *et al.* (65), ont comparé le répertoire des IgA de la moelle osseuse avec celui du colon dans un modèle murin d'immunisation par la toxine cholérique. On retrouve neuf mois après immunisation des plasmocytes médullaires IgA⁺ spécifiques de la toxine cholérique ce qui suggère que les sites d'induction sont initialement les muqueuses et que certains plasmocytes de longue durée de vie migrent secondairement dans la moelle et participent ainsi à la sécrétion du pool d'IgA circulantes.

1.2.2.2 Propriétés effectrices de l'IgA sérique

Malgré ces inconnues concernant les sites d'induction et les spécificités des IgA sériques, la propriété "anti-inflammatoire" de cette immunoglobuline est connue depuis 30

ans; en effet, son ajout (sous forme de monomère sans antigène) *in vitro* inhibe la phagocytose IgG-médiée, le burst oxydatif et l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles (66). D'autre part, elle active très peu le complément (66).

Il existe plusieurs protéines capables de se lier à l'IgA chez l'homme dont : (i) le récepteur Fc α -spécifique ou CD89, (ii) le récepteur à la transferrine (CD71) et (iii) le récepteur aux Ig polymériques sur les entérocytes (66). D'autres molécules ont été décrites chez la souris comme SIGNR-1 à la surface des cellules dendritiques (67) et la dectine à la surface des cellules intestinales de type M (microfold cells) (68). De plus, il existe des "protéines liant le Fc" (Ig-Fc binding proteins) à la surface de certaines bactéries (comme le peptide M de *Staphylococcus aureus*) qui lient la fraction constante de l'immunoglobuline et constituent un moyen d'évasion immunologique (69).

L'action effectrice de l'IgA sérique est principalement expliquée par son interaction avec le CD89. Celui-ci est un membre de la "super-famille" des gènes des immunoglobulines, il est exprimé par les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les macrophages tissulaires et certains sous-types de cellules dendritiques, et lie les deux isotypes. Il existe deux formes membranaires et une forme soluble. Les récepteurs membranaires présentent un domaine extracellulaire (deux domaines à angle droit), un domaine transmembranaire et un domaine intra-cytoplasmique (i) monomérique dans un cas et (ii) couplé à un dimère de FcR γ contenant un domaine activateur dépendant de la phosphorylation des résidus tyrosine (ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif) dans l'autre. De multiples travaux récents ont démontré que (i) le récepteur à domaine intra-cytoplasmique monomérique servait au recyclage de l'IgA sérique (demi-vie: 3 à 6 jours versus 21 jours pour l'IgG) et que (ii) le récepteur couplé au dimère FcR γ avait un rôle de transduction du signal double à la fois inhibiteur et activateur. En effet, lors de la liaison d'un monomère d'IgA non complexé à un antigène au CD89, la phosphorylation des résidus

tyrosine est partielle et induit le recrutement d'une phosphatase (SHP-1, Src homology protein 1 phosphatase) qui à son tour déphosphoryle d'autres récepteurs Fc-phosphorylés concomitamment inhibant ainsi la transduction de différents signaux activateurs. En revanche, les complexes immuns d'IgA pontent les Fc α récepteurs entre eux, induisant une phosphorylation complète des résidus tyrosine de l'ITAM, entraînant à son tour le recrutement de tyrosine-kinases et l'activation du signal intra-cellulaire par une cascade de phosphorylation tyrosine-kinase dépendante (70-72). Ainsi, l'IgA monomérique serait une alternative thérapeutique intéressante dans certaines maladies auto-immunes via ce rôle inhibiteur (73).

1.2.3 Physiologie de l'IgA sécrétoire

1.2.3.1 Induction des réponses IgA dans les muqueuses

Malgré le fait que les réponses IgA muqueuses soient beaucoup mieux étudiées que les réponses IgA sériques, la compréhension des mécanismes aboutissant à l'induction de la réponse IgA reste très parcellaire. Dans ce chapitre, nous ne décrivons que les données ayant été démontrées expérimentalement.

. Les muqueuses sont les sites inducteurs principaux de cette immunoglobuline, en particulier la muqueuse intestinale, étant en contact avec une très haute concentration en antigènes microbiens et alimentaires. Le MALT (mucosal associated lymphoid tissue) représente l'ensemble des structures lymphoïdes secondaires et tertiaires associées aux muqueuses et le GALT (gut associated lymphoid tissue) désigne le MALT spécifique du tractus digestif.

Les structures anatomiques du GALT sont disséminées le long du tube digestif, des amygdales au rectum, et sont majoritairement concentrées dans l'iléon (intestin grêle distal). On distingue trois types "d'unités fonctionnelles" concentriques permettant l'induction des

réponses humorales : les ganglions mésentériques localisés dans la couche la plus externe du tube digestif, les plaques de Peyer organisées comme des ganglions sans capsule présentes dans la sous muqueuse et bombant dans la lumière intestinale et les îlots lymphoïdes isolés plus diffus et non organisés, dans la lamina propria, contenant principalement des plasmocytes IgA⁺. Chez la souris, les plaques de Peyer se forment *in utero* et s'hypertrophient à la naissance après la colonisation bactérienne alors que les îlots lymphoïdes folliculaires isolés se forment uniquement en cas de colonisation (74).

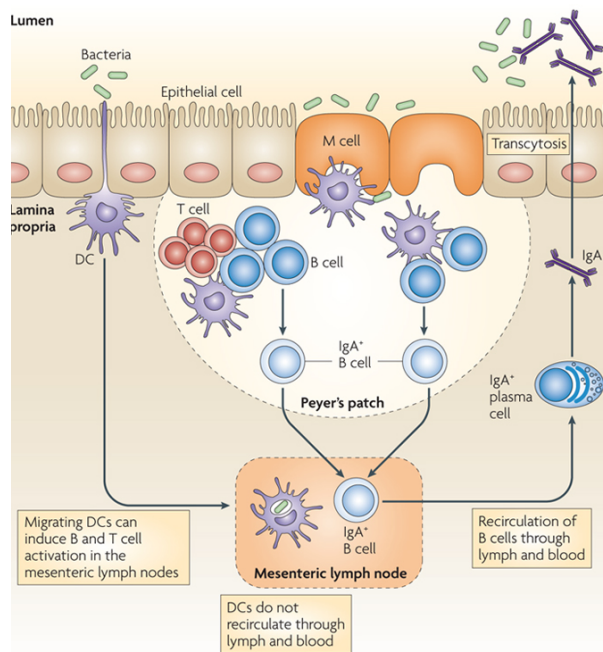


Figure 9: Représentation schématique de l'induction des réponses IgA intestinales chez la souris, Lora V. Hooper and Andrew J. Macpherson, Nature Reviews Immunology (3), March 2010

Les cellules dendritiques (DC) échantillonnent les bactéries commensales de la lumière intestinale, migrent vers les dômes des plaques de Peyer et les ganglions mésentériques de drainage pour induire des plasmablastes IgA⁺ spécifiques de bactéries commensales qui vont à leur tour quitter les centres germinatifs et migrer vers la lamina propria pour sécréter des IgA spécifiques dans la lumière intestinale. Les cellules M (M cell) participent aussi à l'échantillonnage des bactéries.

Plusieurs modalités d'induction des réponses IgA ont été décrites dans la littérature : l'échantillonnage par endocytose des antigènes bactériens (opsonisés ou non par l'IgA, notion rediscutée ultérieurement) par les cellules dendritiques de la *lamina propria* d'une part, et par les cellules M (microfold cells) qui sont des cellules de l'épithélium intestinal spécialisées dans l'échantillonnage des antigènes de la lumière d'autre part. Par ailleurs, les bactéries peuvent aussi être détectées par les "pattern recognition receptors" (PRR) présents à la surface des cellules épithéliales et des cellules dendritiques. En outre, certaines bactéries invasives peuvent traverser l'épithélium intestinal et pénétrer directement dans les ganglions mésentériques sans être "reconnues" au préalable par le système immunitaire muqueux,

induisant des réponses fortes locales et systémiques. Ce dernier mécanisme est propre aux bactéries virulentes qui échappent au contrôle du système immunitaire local alors que les deux premiers interviennent dans la régulation quotidienne de la flore commensale. La nature des bactéries commensales, de leurs épitopes, ainsi que les raisons pour lesquelles certaines bactéries interagissent avec le système immunitaire et d'autres non sont encore inconnues (*Figure 9*).

Chez la souris, on distingue les réponses IgA T-dépendantes, hautement affines, générées dans les centres germinatifs et secondaires à la rencontre antigénique, et les réponses IgA T-indépendantes, responsables pour ces dernières d'une sécrétion dite "naturelle" d'IgA, peu affines, indépendantes des centres germinatifs et de la rencontre antigénique, dérivées des cellules péritonéales murines du type B1b (qui n'ont pas été décrites chez l'homme) (15). Bunker *et al.* (15), dans un modèle murin de TCR (T-cell receptor)-knock out, montrent que les souris mutées ont des lymphocytes B IgA⁺ malgré l'absence de centre germinatif, ainsi que des réponses IgA opsonisant les mêmes espèces bactériennes (sauf le *SFB* et le *Mucispirillum*) que les souris sauvages, suggérant que les réponses T-indépendantes se superposent, au moins partiellement, aux réponses T-dépendantes. Chez l'homme, l'existence ainsi que la contribution éventuelle des réponses IgA T-indépendantes n'est pas connue. Cependant, les patients déficitaires en CD40-Ligand présentent des lymphocytes B CD27-IgA⁺ intestinaux, suggérant que ce type de réponse existe aussi (75).

Les facteurs solubles influençant la commutation isotypique vers l'IgA sont : (i) le TGF β (76), (ii) le TGF β récepteur (modèle murin TGF β récepteur knock-out, déficitaire en IgA) (77) (iii) l'IL-21 (restauration *in vitro* de lymphocytes B-IgA⁺ chez des patients déficitaires en IgA) (78), (iv) APRIL (souris APRIL knock-out présentant un déficit sélectif en IgA et une absence de réponse IgA après vaccination muqueuse) (79) et (v) l'IL-10 (restauration *in vitro* de la sécrétion d'IgA après ajout d'IL-21 en présence de CD40 dans des

cultures de lymphocytes B provenant de patients déficitaires en IgA) (80). Très récemment, l'IL-33 a été décrite comme étant un facteur inducteur de réponses IgA, les souris IL-33 KO, présentant une colite inflammatoire associée à une dysbiose intestinale et un défaut de réponses IgA spécifiques dirigées contre des espèces mucolytiques notamment, et restaurées par l'adjonction d'IL-33 (81). Les facteurs solubles mentionnés plus haut sont sécrétés principalement par les cellules dendritiques à l'état basal dans le GALT (82), créant ainsi un micro-milieu favorable à l'induction des réponses IgA.

De plus, Reboldi *et al.* (83) ont très récemment montré que la production d'IgA nécessitait une interaction entre les lymphocytes B activés (ayant rencontré l'antigène) exprimant CCR6 et les cellules dendritiques du dôme sous-épithélial des plaques de Peyer, sous la dépendance du TGF β . En revanche, les facteurs régulant la commutation isotypique vers l'IgA1 ou l'IgA2 restent inconnus à l'heure actuelle.

Outre les facteurs solubles, et l'architecture des plaques de Peyer, certains contingents cellulaires lymphocytaires T sont essentiels à la commutation vers l'IgA. Les lymphocytes T "follicular helpers" (T_{FH}) spécialisés dans l'aide à la commutation isotypique au sein des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires (84), sont particulièrement impliqués dans la commutation vers l'IgA. Ils se définissent chez l'homme par l'expression à la surface de CXCR5, (récepteur aux chimiokines impliqué dans la migration cellulaire vers les follicules lymphoïdes), d'ICOS (inducible co-stimulation factor) et de PD-1 (Programmed cell death protein-1) et sécrètent l'IL-21. Ainsi, dans le modèle murin de Kawamoto *et al* (85) de déficit homozygote en PD-1, (cf chapitre 1.3.1.2 sur les déficits murins en IgA), on observe une augmentation des T_{FH} qui ne sécrètent plus l'IL-21; de plus, dans un modèle de transfert adoptif de T_{FH} PD-1^{-/-} dans des souris dépourvues de cellules T, les réponses intestinales IgA sont abolies. Par ailleurs, un autre sous-type lymphocytaire T chez la souris semble important

à la commutation vers l'IgA, il s'agit des lymphocytes T régulateurs (CD4+ FoxP3+) dont l'absence semble induire l'altération des réponses IgA chez la souris (86).

1.2.3.2 Sécrétion de l'IgA dans la lumière intestinale

Les IgA sont donc sécrétées sous forme de dimères dans la *lamina propria* par les plasmocytes qui sont des cellules à longue durée de vie et résidentes du GALT (65). Les dimères d'IgA (dIgA) se lient par la chaîne J de manière non covalente au récepteur des Immunoglobulines polymériques (pIgR) présent à la surface basale des entérocytes. Le pIgR est une protéine hautement glycosylée transmembranaire, dont la partie extra-membranaire est composée de 5 domaines "Immunoglobulin like" (87) de 602 acides aminés, le domaine transmembranaire de 23 acides aminés, et le domaine intra-membranaire de 103 acides aminés. Son expression est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires, les Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), et les hormones stéroïdiennes (2). Le complexe pIgR-dIgA est ensuite endocyté, transite dans la cellule épithéliale (mécanisme de transcytose) et est excrété dans la lumière après clivage du domaine C-terminal du pIgR qui reste associé au dIgA et forme ainsi la pièce sécrétoire (=domaine extra-membranaire du pIgR), l'ensemble étant désigné par le terme d'IgA sécrétoire (*Figure 10, Annexe 1*). Ainsi, on ne peut retrouver dans la lumière intestinale que des immunoglobulines multimériques, excluant l'IgG de la sécrétion intestinale. A noter par ailleurs, que la transcytose du pIgR et sa sécrétion dans la lumière intestinale est un mécanisme stimulé par la liaison aux Ig polymériques mais qui survient en dehors de celle-ci, expliquant qu'on retrouve de la pièce sécrétoire libre dans les sécrétions (88).

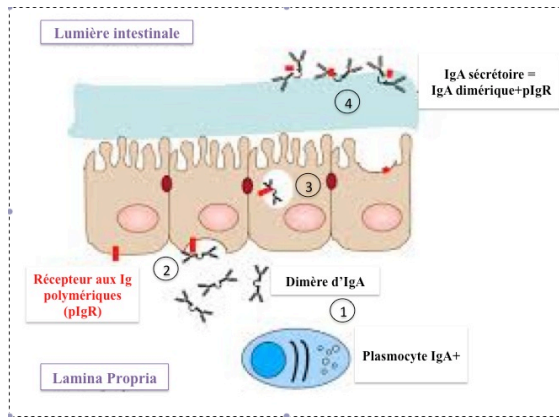


Figure 10 : Schéma de transcytose de l'IgA à travers les cellules épithéliales intestinales

- 1- Les plasmocytes de la lamina propria sécrètent l'IgA sous forme dimérique (reliées par la chaîne J)
- 2- Le dimère d'IgA se lie au pIgR situé au pôle basal de l'entérocyte par la chaîne J
- 3- Le complexe formé est endocyté et traverse le cytoplasme de l'entérocyte
- 4- Le complexe est sécrété au pôle apical de l'entérocyte dans la lumière intestinale et constitue ainsi l'IgA sécrétoire

La pièce sécrétoire forme un pont disulfure avec un des deux monomères (domaine $C\alpha 2$) pour les IgA sécrétoires alors que ces liaisons ne sont pas covalentes dans le cas des IgM pentamériques (2). C'est une structure hautement glycosylée qui protège les immunoglobulines de la protéolyse bactérienne et confère des sites d'interaction supplémentaires avec les bactéries (89) (cette notion sera rediscutée ultérieurement).

A l'inverse de la transcytose, plusieurs équipes ont décrit un mécanisme de rétro-transcytose, c'est-à-dire un transit de l'IgA sécrétoire de la lumière intestinale vers la lamina propria par les cellules M. En effet, Rey *et al.* ont montré chez la souris en 2004, après injection de SIgA fluorescente dans une anse intestinale ligaturée, le passage de celle-ci par les cellules M, son endocytose par les cellules dendritiques du dôme sous épithélial des plaques de Peyer et sa localisation à la surface des lymphocytes T CD4+ (90). De plus, Rochereau *et al.* (68), ont montré chez la souris, que la rétro-transcytose de l'IgA était dépendante de sa liaison avec la dectine 1, récepteur présent à la surface apicale des cellules M puis qu'elle était endocytée par les cellules dendritiques CX3CR1+. De plus, cette liaison n'a lieu chez l'homme qu'avec l'IgA2 car celle-ci présente des résidus sialylés dans le domaine $C\alpha 1$ qui s'associent à la dectine-1. De manière très intéressante, ce mécanisme peut être exploité pour améliorer la vaccination muqueuse (91). En effet, le couplage de l'antigène à l'IgA sécrétoire améliore significativement son adressage aux cellules dendritiques et induit

une immunité protectrice avec des IgA sécrétoires et sériques spécifiques ainsi que des réponses IgG sériques spécifiques associée à l'induction de lymphocytes T helpers antigène-spécifiques. Par ailleurs, une étude murine de 2015 (92) retrouve que l'administration muqueuse d'une souche de *Salmonella* non invasive couplée à l'IgA sécrétoire entraîne sa translocation et son adressage dans les plaques de Peyer (et non dans les ganglions mésentériques, ni dans la rate) induisant une réponse IgA anti-*Salmonella*, réalisant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif. Le mécanisme de rétro-transcytose est inexplicé mais serait dépendant de l'IL-1. En outre, Diana et al (67) montrent que les IgA sécrétoires (pas les dIgA ni la pièce sécrétoire seule) humaines sont internalisées par le récepteur murin SIGIRR des cellules dendritiques induisant un phénotype "tolérogène" : sécrétion d'IL-10 sans IL-12, diminution de l'expression des marqueurs de co-stimulation, induction de lymphocytes T-régulateurs in vitro.

Ainsi, les complexes immuns formés avec l'IgA sécrétoire permettraient un adressage ciblé des antigènes vers les plaques de Peyer et amplifieraient une réponse IgA pré-existante.

1.2.3.3 Cinétique et évolution spatio-temporelle des réponses IgA

Les réponses IgA autologues du nourrisson apparaissent à partir de trois mois de vie chez l'homme (24), versus 21 jours chez la souris (93), après induction et maturation du GALT par la colonisation microbienne.

Hapfelmeier et al (94) ont démontré chez la souris grâce à un système de colonisation transitoire (72h) de souris "germ free" par une souche d'*E. coli* mutante (ne pouvant pas se répliquer dans l'intestin murin) que des réponses IgA spécifiques durables dans le temps étaient induites contre cette souche comme lors d'une colonisation par un microbiote complexe ou par une souche persistante. De plus, on retrouvait cette réponse même après re-colonisation par un microbiote complexe. Cette étude montre qu'une colonisation transitoire

peut suffire à induire une réponse adaptative; néanmoins cette réponse nécessitait des doses élevées d'antigène (au moins 10^9 CFU). Les travaux de Lindner et al (95) ont confirmé que les réponses IgA induites par une mono-colonisation étaient retrouvées après re-colonisation complexe. De plus, cette étude démontre que le répertoire IgA est très stable au cours du temps, y compris après traitement antibiotique (étude murine et humaine sur biopsies intestinales longitudinales) mais qu'il subissait des adaptations discrètes par accumulation de mutations somatiques des clones pré-existants, suggérant que les lymphocytes B-mémoire recirculent dans les centres germinatifs toute la vie pour adapter l'affinité de leurs anticorps aux modifications antigéniques éventuelles. Lors d'un challenge par une infection aiguë à *Salmonella typhimurium*, de nouveaux clones sont recrutés, permettant de monter une réponse adaptative *de novo*. Les études du répertoire des IgA coliques murines (95, 96) et humaines (64, 95) retrouvent la présence de clones dominants oligoclonaux et très hypermutés (>70% des clonotypes) sur un fond très polyclonal, suggérant qu'il existe des interlocuteurs bactériens privilégiés et "réguliers".

Par ailleurs, dans ces études de répertoire muqueux digestif, on retrouve tout le long de l'intestin, du duodénum au colon, les mêmes séquences IgA montrant que les mêmes réponses IgA sont disséminées tout le long du tube digestif (64, 96). En plus de la dissémination des réponses IgA dans tout le tube digestif, plusieurs articles montrent qu'il existe une recirculation des lymphocytes B-mémoire IgA⁺ dans les autres muqueuses constituant un répertoire muqueux partagé. En effet, Lindner et al (95) ont montré que les lymphocytes B-IgA⁺ intestinaux de souris en cours de gestation re-circulent vers les glandes mammaires. Ruane et al (97) montrent que les IgA anti toxine cholérique induites dans le poumon par immunisation intra-trachéale des souris se retrouvent à distance dans l'intestin grêle. Enfin, dans l'étude de Rochereau et al (91), après immunisation nasale des souris par l'antigène p24

du VIH, les réponses IgA spécifiques sont retrouvées dans les muqueuses digestives, vaginales ainsi que dans la salive.

Ainsi, les réponses IgA sont des réponses du type mémoire, avec un répertoire très stable au cours du temps mais adaptable en continu aux modifications antigéniques discrètes comme aux challenges aigües, commun à toutes les muqueuses.

1.2.4 Interactions entre les IgA sécrétoires et le microbiote intestinal

Il faut distinguer deux situations "schématiques" extrêmes dans lesquelles l'IgA interagit avec les agents microbiens : l'agression par des agents pathogènes invasifs (situation aigüe, peu fréquente) et le commensalisme, c'est à dire les interactions quotidiennes avec la flore "normale", et ce, de son établissement à son entretien.

Dans le cadre de l'infection aigüe à germe pathogène, l'IgA se comporte comme une opsonine participant à neutraliser l'agent infectieux; ce sujet ne sera pas traité dans ce travail.

Le commensalisme est un processus dynamique qui résulte de l'adaptation réciproque continue entre l'hôte et son microbiote dont le but est le mutualisme c'est-à-dire l'entraide entre les deux partenaires pour que chacun puisse bénéficier de l'autre.

Le but de ce chapitre est de synthétiser les avancées actuelles sur notre compréhension du rôle joué par l'IgA dans ce mutualisme.

1.2.4.1 Impact des IgA sécrétoires sur l'établissement de la flore microbienne

Comme exposé précédemment, les réponses intestinales IgA autologues du nourrisson se mettent en place à partir du 3ème mois de vie et en parallèle le microbiote intestinal se multiplie et se diversifie jusqu'à la 3ème année. L'induction des réponses IgA, leurs cibles et leur impact sur l'établissement de la flore intestinale ont récemment été décrits dans trois articles.

Planer et al (24) ont mené une étude longitudinale sur 40 paires de jumeaux sains américains (dont 21 paires monozygotes) visant à décrire le développement concomitant des réponses humorales intestinales et de la flore (analyse d'1 selle/trimestre dans les 3 premières années de vie). L'analyse longitudinale par cytométrie et séquençage des fractions IgA+ et IgA- révèle que: (i) 30 taxons bactériens sont enrichis significativement dans l'une ou l'autre des fractions, (ii) l'opsonisation par l'IgA commence à 3 mois et cible toujours les mêmes taxons à 3 ans, (iii) *Escherichia coli* et *Bifidobacterium longum* sont les seuls taxons à évoluer dont l'opsonisation évolue avec le temps (début de l'opsonisation à l'âge de 1 an pour le *Bifidobacterium* et opsonisation fluctuante pour *E.coli*), (iv) les cibles opsonisées sont hautement corrélées chez les jumeaux dès le 3ème mois et le restent jusqu'à 3ans, (v) à 24 mois les réponses IgA intestinales des nourrissons sont corrélées à celles de leur mère et convergent entre elles, et enfin (vi) l'allaitement maternel a un effet d'augmentation sur l'opsonisation de 2/30 taxons (*Ruminococcus gnavus* et *Escherichia coli*). Mirpuri et al (98) montrent dans une étude murine que les protéobactéries sont dominantes dans le microbiote (en proportion et en valeur absolue) du nouveau né alors qu'elles sont minoritaires chez l'adulte. Ces protéobactéries induisent une réponse IgA spécifique qui permet de contrôler leur expansion car dans les souris déficitaires en IgA (Calpha-/-), il n'y a pas de contrôle de ce phylum qui reste donc majoritaire à l'âge adulte s'associant à une inflammation tissulaire non observée chez les adultes du même âge ayant des IgA spécifiques et/ou « germ-free ». Enfin, Rogier et al (93) ont réalisé une étude murine évaluant l'impact des IgA du lait maternel sur la composition du microbiote des nourrissons. Après des croisements successifs de souris pIgR-/- avec des souris pIgR+/+, ils parviennent à obtenir 4 combinaisons de mère/nourrisson: mère IgA+/enfant IgA+, mère IgA+/enfant IgA-, mère IgA-/enfant IgA+, mère IgA-/enfant IgA-. L'analyse du microbiote intestinal de la mère et du nourrisson dans ces quatre situations révèle que (i) en l'absence d'IgA maternelles, et avant la synthèse des réponses IgA autologues du

nourrisson (avant j21), on retrouve une translocation d'alpha-proteobacteries dans les ganglions mésentériques, (ii) le microbiote des nourrissons n'ayant pas reçu d'IgA maternelles est différent de ceux en ayant reçu, et la différence persiste à l'âge adulte même si le nourrisson est capable de monter des réponses IgA, (iii) on retrouve chez eux une expansion de gamma-proteobacteries (pasteurellaceae) à l'âge adulte et enfin (iv) on observe une surexpression de certains gènes épithéliaux impliqués dans les modèles de colites inflammatoires humaines chez les souris n'ayant pas reçu d'IgA maternelles. Enfin Dzidic *et al.* (99) ont suivi une cohorte d'enfants de la naissance à l'âge de 7 ans dont n=20 devenaient allergiques (asthme/dermatite atopique) et n=28 restaient sains. Les selles des patients ont été prélevées à 1 mois et 1 an et les niveaux d'opsonisation par l'IgA ainsi que l'identification des fractions IgA+ a été réalisée. Les niveaux de réponse IgA des enfants allergiques sont plus bas que les enfants sains et les cibles bactériennes sont différentes. Les auteurs concluent que les réponses IgA aberrantes dans l'enfance sont associées au risque allergique.

Au total, l'induction des réponses IgA autologues du nourrisson semblent déterminer la composition de la flore microbienne adulte notamment par le contrôle de l'expansion de certains phyla qui semblent pro-inflammatoires. Par ailleurs, les réponses IgA sont stables rapidement et semblent converger vers des cibles communes inter-individuelles. De plus, les IgA "passives" maternelles semblent impacter au long cours la composition de la flore des nourrissons. Enfin, le développement biaisé de réponses IgA dans l'enfance pourrait être associé aux manifestations allergiques.

1.2.4.2 Spécificités des IgA sécrétoires

Comme nous l'avons dit précédemment, la nature des bactéries commensales inductrices d'IgA ainsi que les raisons pour lesquelles elles le sont, restent inconnues à l'heure actuelle. Les études portant sur ce sujet sont rares, très récentes et font l'objet de ce paragraphe.

Les deux approches expérimentales employées dans la littérature pour aborder ce sujet sont (i) la génération d'anticorps in vitro à partir de plasmablastes intestinaux et l'étude de leur spécificité par criblage de bactéries et/ ou virus et (ii) le tri des fractions de microbiote opsonisées ou non par l'IgA et leur analyse par séquençage.

Notons au préalable que la spécificité de la liaison de l'anticorps à son antigène, c'est-à-dire une interaction médiée par le Fab, n'est pas certaine (mais est difficilement contrôlable expérimentalement). En effet, comme précisé précédemment, certaines bactéries peuvent exprimer des protéines liant le Fc (69), et la pièce sécrétoire peut se lier par ses résidus carbohydate à certaines bactéries Gram positif (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) (89) alors que la liaison est Fab-médiée pour les bactéries Gram négatif (microscopie confocale (89)).

Deux études publiées récemment décrivent les spécificités des IgA intestinales chez l'homme et la souris à partir d'anticorps monoclonaux dérivés de l'intestin. En effet, Benckert et al (100), ont isolé des plasmablastes IgA+ iléaux humains (n=3 donneurs), séquencé à l'échelon unicellulaire les chaînes lourdes et légères pour pouvoir construire des vecteurs contenant l'association chaîne lourde/chaîne légère et les ont transfecté dans une lignée cellulaire humaine. 137 clones sécrétant des IgA ont pu être obtenus et les spécificités ont été testées par ELISA; plus de la moitié des anticorps étaient capables de réactions croisées contre différents lysats bactériens ou viraux (*Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae*, rotavirus). Par ailleurs ces anticorps présentaient également une possible autoréactivité. . Okai et al (101) ont généré des anticorps monoclonaux IgA murins par la technique des hybridomes à partir de plasmocytes IgA+ de la *lamina propria* de souris non immunisées. Le criblage des anticorps retrouve des réactivités croisées contre des bactéries intestinales dont *Escherichia coli*.

Palm et al (51) et Kau et al (50) ont étudié les réponses intestinales IgA dans deux cas de dysbiose humaine : les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn

et rectocolite hémorragique) pour le premier, et la dénutrition sévère du type Kwarshiorkor (carence protéique majeure avec entéropathie exsudative) dans le deuxième. L'approche expérimentale est basée sur l'identification des espèces opsonisées par l'IgA par tri des fractions IgA+ et IgA- et séquençage bactérien dans la maladie en la comparant à des témoins sains appariés (n=35 patients présentant une MICI vs n=20 témoins sains appariés en âge pour la première étude et n=11 paires de jumeaux discordants pour la maladie de Kwarshiorkor pour la deuxième étude). Dans les deux articles, le pyroséquençage 16-S des selles totales retrouve une dysbiose intestinale. De plus, les réponses IgA sont dirigées contre des bactéries différentes chez les malades et leurs contrôles, et la transplantation de la fraction bactérienne IgA+ des patients à une souris « germ-free » induit la maladie dans le Kwarshiorkor et exacerbe la colite chimique par DSS (dextran-sulfate sodium). Ainsi dans ces deux cas de dysbiose, les IgA semblent cibler une population bactérienne susceptible de provoquer une inflammation colique. Les espèces opsonisées par l'IgA chez les témoins sains sont résumées dans le Tableau 1 (annexe 2).

1.2.4.3 Mécanismes de contrôle de la flore microbienne par les IgA sécrétoires

Les IgA peuvent intervenir à différents niveaux pour contrôler et ainsi façonner la flore microbienne:

- l'exclusion immunologique est un mécanisme décrit en 1975 (102) consistant à confiner les micro-organismes et leurs produits de sécrétion toxiques (toxines) à l'intérieur de la lumière intestinale par la liaison de l'anticorps à l'antigène. Ce rôle est rempli par plusieurs biais : (i) les IgA neutralisent les bactéries dans la lumière intestinale par opsonisation (ii) elles inhibent l'adhérence épithéliale et l'invasion par les pathogènes (iii) elles neutralisent les toxines sécrétées et les virus même lorsque ceux-ci ont pénétré dans les cellules épithéliales (iv) elles renforcent la couche de mucus épithélial et participent à la formation de biofilms

grâce à leur affinité pour la mucine, (v) elles ont une capacité d'agglutination forte grâce à leur forme en T, à leur caractère polymérique et à leur pièce sécrétoire.

- la modulation de certains épitopes à la surface bactérienne : Peterson et al (103), montrent dans un modèle murin RAG1^{-/-} (souris dépourvues de lymphocytes) « germ-free », transplantées avec un hybridome sécréteur d'IgA spécifiques d'un épitope de *Bacteroides thetaiotaomicron* et monocolonisées par cette espèce, que la présence d'IgA spécifiques inhibe l'expression de l'épitope à la surface bactérienne. De plus, en l'absence d'IgA, *Bacteroides thetaiotaomicron* surexprime des gènes impliqués dans le stress oxydatif chez l'hôte entraînant une inflammation colique réversible par la présence d'IgA. Cullender et al (104), ont étudié un modèle murin TLR5 knock-out, le TLR5 étant un détecteur de la flagelline (protéine constituant le flagelle, permettant la motilité bactérienne) point de départ des réponses spécifiques IgA anti flagelline. Les souris mutées TLR5 n'ont pas d'IgA spécifiques anti-flagelline et présentent une augmentation de la flagelline totale dans les selles. Elles ne présentent pas d'anomalie de la composition microbienne au niveau métagénomique mais au niveau méta-transcriptomique, on observe une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans le flagelle dans plusieurs espèces de phyla différents (Proteobacteria et Firmicutes). On observe par ailleurs une translocation bactérienne majeure dans les ganglions mésentériques. Les IgA spécifiques anti flagelline inhibent *in vitro* la motilité bactérienne et inhibent la transcription des gènes impliqués dans la synthèse du flagelle.

- l'inhibition de la croissance bactérienne : Okai et al (101) montrent que leurs anticorps monoclonaux sont capables d'inhiber la croissance d'*Escherichia coli* *in vitro*.

- la localisation spatiale des bactéries dans la lumière intestinale contribuant au phénomène de niches écologiques: Kubinak et al (16), dans un modèle murin d'altérations qualitatives du répertoire IgA, montrent que dans la souris sauvage, le microbiote associé aux

muqueuses est différent du microbiote de la lumière intestinale et que les réponses IgA normales ciblent les bactéries de la muqueuse.

1.2.4.4 Triple rôle de l'IgA sécrétoire: confinement de la flore, contrôle des pathogènes et optimisation du commensalisme

De plus en plus de preuves expérimentales suggèrent que le rôle des IgA sécrétoires pour l'hôte ne se cantonne ni au confinement de la flore intestinale dans la lumière par le biais de l'exclusion immunologique, ni au contrôle des pathogènes. Au-delà de ces fonctions de "défense immunitaire peu inflammatoire", les IgA sécrétoires sont essentielles pour façonner une flore intestinale la plus bénéfique possible pour l'hôte. Ce mécanisme de façonnement de la flore intestinale commensale par les anticorps a très récemment été intitulé "antibody mediated immunoselection" (AMIS) par Kubinak *et al.* (105).

En effet, comme nous l'avons vu, les IgA sont impliquées dans la colonisation initiale du nourrisson en contrôlant certaines espèces permettant non seulement l'atténuation de l'inflammation colique mais aussi la diversification du microbiote initial et participant ainsi au façonnement de la flore adulte, puisqu'à l'âge de trois ans environ, le microbiote est mature. De plus, le répertoire des IgA étant très stable au cours de la vie, il assure probablement ainsi la stabilité et la résilience de la flore, tout en ayant la capacité de s'adapter à des modifications discrètes (nouvelle maturation d'affinité en cas de modification d'un épitope bactérien) ou brutales (invasion par un pathogène ou un pathobionte). Le mécanisme de rétro-transcytose entraînant l'induction de réponses IgA dirigées contre l'antigène bactérien peut aussi permettre d'assurer la stabilité du microbiote en entretenant les mêmes spécificités antigéniques. Enfin, plusieurs articles montrent que la réduction de la diversité du répertoire des IgA et/ou l'absence d'IgA s'accompagne d'une réduction de la diversité de la flore intestinale, ce qui rend la flore intestinale moins bénéfique pour l'hôte.

1.3 Phénotypes des modèles murins de déficit en IgA

1.3.1 Description des modèles de déficit en IgA

.On distingue les modèles entraînant un déficit quantitatif et ceux entraînant un déficit qualitatif (anomalies du répertoire et de l'affinité des IgA) des IgA sécrétoires.

Les déficits quantitatifs en IgA sécrétoire peuvent être générés par abolition complète des réponses IgA :*(i)* spécifique, dans le cadre d'une inactivation de la région de régulation de la commutation isotypique du gène C α uniquement, sans trouble de la commutation vers les autres isotypes ni de l'hypermutation somatique (106), *(ii)* non spécifique par invalidation du gène AID (adenosine induced deaminase) induisant des anomalies de la commutation isotypique et de l'hypermutation somatique (107, 108). Ils peuvent être aussi obtenus par blocage de la sécrétion vers la lumière intestinale sans altération des réponses IgA par *(i)* délétion du récepteur aux Ig polymériques (pIgR) (109, 110) ou *(ii)* délétion du gène de la chaîne J (111). Les déficits qualitatifs résultent de constructions altérant le répertoire des IgA sans en abolir la sécrétion : *(i)* mutation ponctuelle d'AID entraînant un défaut spécifique d'hypermutation somatique (sans anomalie majeure de la commutation isotypique) (112) *(ii)* la délétion du gène Pcd1 codant pour le récepteur inhibiteur PD-1 (program death receptor 1) retrouvé à la surface des lymphocytes T, et notamment à celle des lymphocytes T folliculaires helpers, présents dans les centres germinatifs pour induire la maturation d'affinité des anticorps par AID (85) ainsi que la déplétion en lymphocytes T régulateurs qui semblent nécessaires à la diversité des répertoires d'IgA et bactérien à la fois (86).

1.3.1.1 Déficit quantitatif en IgA

Les modèles de déficit quantitatif en IgA nous apprennent que:

- en l'absence totale d'IgA dans les compartiments muqueux et sérique sans altération de la commutation vers les autres isotypes ni de l'hypermutation somatique, dans le modèle

construit par *Harriman et al (106)*, on observe (i) à l'état basal une augmentation significative de la quantité des IgM intestinales sans différence dans le compartiment sérique, et (ii) après immunisation muqueuse par le virus de la grippe couplé à la toxine cholérique, une augmentation des réponses spécifiques IgM intestinales *et* sériques (4 fois plus de réponses spécifiques IgM dans les souris mutées comparées aux souris sauvages).

- en l'absence totale d'IgA avec une altération de la commutation isotypique et de l'hypermutation somatique dans les modèles de souris AID *-/-* étudiés par S. Fagarasan *et al (107, 108)* on observe (i) une anomalie des îlots lymphoïdes folliculaires qui présentent une hypertrophie majeure, une réorganisation en pseudo plaques de Peyer, avec une intense prolifération des lymphocytes B du centre germinatif de phénotype IgM+ uniquement, secondaire à la stimulation antigénique répétée et non au défaut primaire d'AID (réversible chez les souris "germ-free" et après traitement par antibiotiques), (ii) une anomalie du microbiote avec expansion des germes anaérobie démontrée par culture conventionnelle dans l'article de 2002 (100 fois plus de germes anaérobie dans les souris mutées) puis confirmée en 2004, par une analyse des contenus iléaux ainsi que des biopsies intestinales étagées des souris mutées vs saines par pyroséquençage 16-S. Cette étude montre une expansion des germes anaérobies, même dans le tube digestif haut (duodenum et jejunum) du type *Segmented filamentous bacteria* (SFB, germe ne colonisant pas l'homme) et Clostridiales. De manière intéressante, cette dysbiose était réversible après parabiose entre souris mutées et sauvages.

- en l'absence d'IgA sécrétoire uniquement (blocage de la sécrétion dans la lumière intestinale sans altération des réponses IgA), dans les modèles de délétion du récepteur aux Ig polymériques (pIgR KO) proposés par *Reikvman et al (109)* et *Wijburg et al (110)*, on observe (i) une différence significative entre la composition des microbiotes des souris mutées et des souris sauvages (séquençage 16S et analyse différentielle en composante principale), (ii) une

susceptibilité accrue à la colite chimique induite par le dextran sulfate sodium (DSS) chez les souris mutées (susceptibilité dépendante du microbiote car non retrouvée chez les souris "germ-free" et réversible par traitement antibiotique) et (iii) une susceptibilité accrue aux infections par *Salmonella typhimurium* avec une translocation microbienne augmentée objectivée par le nombre de colonies de *Salmonella* dans les ganglions mésentériques de drainage. Il est à noter que dans ce modèle, les IgM induites dans le tissu digestif ne peuvent pas non plus être sécrétées dans la lumière. Dans les modèles de délétion de la chaîne J proposés par *Lycke et al (111)*, les souris présentent une nette réduction des taux d'IgA et d'IgM sécrétoires avec une augmentation significative des taux d'IgA sériques associée à une diminution des taux d'IgM sériques. De plus, après immunisation muqueuse par la toxine anti-cholérique, on observe une réponse IgA spécifique sérique chez les souris mutées supérieure à celle des souris sauvages mais non retrouvées dans les lavages intestinaux. Finalement, cette absence d'immunité sécrétoire entraîne une absence de protection après réinfection post immunisation.

1.3.1.2 Déficit qualitatif : anomalie du répertoire et de l'affinité des IgA

Les modèles de déficit qualitatif en IgA, nous montrent que:

- dans le modèle généré par *Wei et al (112)*, dans lequel une mutation ponctuelle d'AID (AID^{G23S}) entraîne l'abolition de l'hypermutation somatique sans altérer la commutation isotypique, les souris mutées présentent des taux normaux d'IgA sériques et sécrétoires ainsi qu'un nombre normal de plasmocytes IgA⁺ dans la muqueuse intestinale. Le répertoire est moins divers avec une diminution de la diversité combinatoire (biais de la représentation des V_H), ainsi qu'une diminution drastique des mutations introniques présentes en aval du segment J_H (reflétant le degré d'hypermutation somatique). Cette anomalie du répertoire s'associe à une hyperplasie des centres germinatifs des plaques de Peyer avec une augmentation des lymphocytes B activés du centre germinatif, néanmoins moins sévère à

celle observée dans les souris AID^{-/-}. Le microbiote intestinal de ces souris est altéré avec une augmentation de l'abondance bactérienne globale, et notamment des germes anaérobies, par culture bactérienne standard. L'analyse de la composition microbienne par pyroséquençage 16-S retrouve une grande variabilité inter-individuelle et ne permet pas de déterminer clairement les espèces en expansion. Après infection par *Yersinia enterocolitica*, on observe une translocation microbienne accrue vers les ganglions mésentériques drainants chez les souris mutées.

- dans le modèle de *Kawamoto et al* (85) de déficit homozygote en PD-1, induisant une altération de la sélection des plasmablastes IgA⁺ dans les centres germinatifs et un biais du répertoire IgA. Le dosage des IgA fécales libres ainsi que des IgA opsonisant le microbiote montre une diminution de la fraction opsonisée mais une augmentation des IgA libres chez les souris mutées. L'étude du microbiote par des techniques classiques de culture retrouve une diminution des bactéries du genre *Bifidobacterium* et une expansion des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, résultat confirmé par l'analyse par pyroséquençage 16S. La même équipe a montré (86), dans des expériences de transfert de différents sous-types cellulaires de CD4 dans des souris déplétées en lymphocytes T (CD3^{-/-}) que les CD4⁺FoxP3⁺ étaient à la fois requis pour la diversification du répertoire des IgA et la diversification du répertoire microbien intestinal, et plus particulièrement les bactéries appartenant au phylum Firmicutes.

Au total, les modèles de déficit en IgA sécrétoire murins quantitatifs et qualitatifs présentent un phénotype commun d'altération du microbiote intestinal associé à une anomalie des réponses anti-toxiques (toxines cholérique et du Clostridium) et une susceptibilité accrue aux infections par les entéro-pathogènes.

1.4 Phénotypes clinico-biologiques des déficits en anticorps chez l'homme

Les deux principales pathologies aboutissant à un défaut de production d'IgA sont le déficit sélectif en IgA (DIgA) et le déficit immunitaire commun variable (DICV). Le déficit sélectif en IgA (DIgA) est plus fréquent que le DICV mais moins symptomatique. Ces deux pathologies semblent s'inscrire dans un continuum clinique et biologique compte tenu du fait que les DIgA peuvent évoluer vers le DICV, et qu'on retrouve une surreprésentation de déficits sélectifs en IgA chez les apparentés de patients atteints de DICV (113, 114), mais la prévalence des cas d'évolution du DIgA vers le DICV est inconnue (cas cliniques isolés décrits dans la littérature).

1.4.1 Le déficit en IgA sélectif

Le DIgA se définit par (i) un taux sérique d'IgA indétectable ($<0,07\text{g/L}$), (ii) sans autre déficit associé et sans étiologie retrouvée, (iii) chez un patient âgé de plus de 4 ans (iv) pouvant s'associer à une altération des réponses vaccinales (115). Il existe des cas de déficit complet en IgA s'associant à des déficits en sous-classes d'IgG, le plus fréquent étant le déficit combiné IgA-IgG2 qui prédispose aux infections pulmonaires graves (116). Par ailleurs, les données de la littérature concernant le déficit partiel en IgA sont limitées et les séries pédiatriques suggèrent que le déficit partiel est transitoire et ne converge pas vers le déficit complet (117), rendant son interprétation clinique difficile.

Les bases moléculaires de ce déficit sélectif sont encore incomprises et sont probablement multiples, étant donné l'hétérogénéité des patients. Les données actuelles de la littérature montrent que certains patients présentent un déficit complet en plasmablastes IgA+ (CD19+CD38++IgA+) (78) et que la sécrétion d'IgA peut être restaurée chez ces patients par l'injection ex vivo de cytokines induisant la commutation isotypique vers l'IgA comme l'IL-10 (80) et l'IL-21 (78), sans déficit associé de ces cytokines. Il existe donc chez ce sous-

groupe de patients un défaut de sécrétion d'IgA et non de commutation spécifique vers l'IgA, de base génétique non encore élucidée. Par ailleurs, on ne retrouve pas de mutations et/ou délétion des régions constantes C α 1 et C α 2 (118).

On estime que le dIgA serait asymptomatique dans la majorité des cas (118), expliquant le fait que sa prévalence dans la population générale soit mal évaluée. Il semble cependant que cette pathologie soit plus fréquente chez les caucasiens (gradient Occident-Orient) avec une prévalence estimée à 1/219 donneurs de sang canadiens en 2010, 1/163 donneurs espagnols en 1997, 1/3230 donneurs chinois en 2010, 1/14840 donneurs japonais en 1986 (118, 119). Néanmoins, le caractère peu symptomatique de ce déficit immunitaire est actuellement débattu, la majorité des articles écrits sur le sujet étant des études rétrospectives ou des études de cas isolés. Récemment, des études cas-témoins et de cohorte montrent que plus de 80% des patients présentent une morbi-mortalité plus élevée que la population saine contrôle (y compris les individus diagnostiqués fortuitement) (120-122) et que 70% des patients sont symptomatiques après 20 ans d'évolution (123, 124). Par conséquent, la fréquence exacte des individus déficitaires en IgA symptomatiques ainsi que la fréquence de l'occurrence des symptômes associés sont impossibles à déterminer avec les données actuelles de la littérature.

Les manifestations observées dans le dIgA sélectif sont (i) les infections récurrentes à point de départ muqueux, (ii) les manifestations auto-immunes et (iii) une atteinte digestive inflammatoire non infectieuse.

Dans les séries récentes de patients, 30 à 40% ont un passé d'épisodes infectieux récurrents lors de l'inclusion, et plus de 70% ont des infections après 20 ans d'évolution, d'autant plus qu'il existe un déficit en sous classe d'IgG associé (124). Une étude cas-témoins suédoise de 2016 portant sur 2100 patients montre que 36% des patients vs 18% des témoins présentent au moins une infection sévère (nécessitant une hospitalisation) dans la durée du

suivi ($p < 0,05$) (122). Les sites infectieux les plus fréquemment impliqués sont le carrefour oro-pharyngé et le poumon, et les germes documentés sont bactériens (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) (120). Les infections digestives sont moins bien documentées et les articles sont contradictoires mais elles semblent néanmoins plus fréquentes chez les patients (Prevalence ratio=3.5 dans l'étude de Ludvingsson *et al* (122)) impliquant les genres bactériens Salmonella et Campylobacter, principalement. Les infections digestives parasitaires, notamment à *Giardia duodenalis*, sont aussi classiquement décrites (125).

Le déficit en IgA s'associe à une forte incidence de maladies auto-immunes (20 à 30% des cas selon les séries), principalement spécifiques d'organes. Il s'agit de la maladie coeliaque, des pathologies thyroïdiennes auto-immunes, du diabète de type 1, du lupus érythémateux systémique (LES) et de la polyarthrite rhumatoïde (Figure 11). On retrouve dans la littérature des cas isolés d'association à la maladie de Biermer, au vitiligo et aux cytopénies auto-immunes (126).

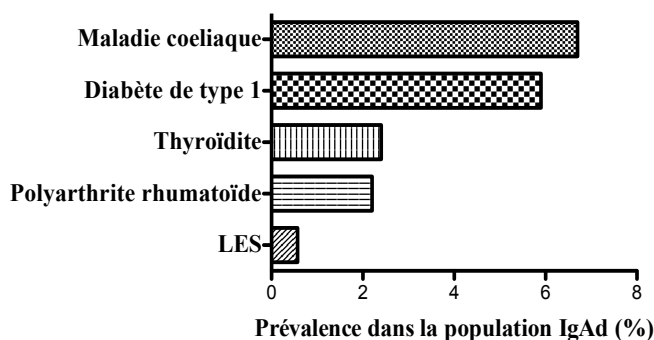


Figure 11: Spectre des maladies auto-immunes statistiquement associées au déficit sélectif en IgA, selon Ludvingsson *et al*, *Journal of Clinical Immunology*, 2014, étude épidémiologique cas-témoins portant sur 2100 patients appariés à 18653 témoins

Inversement, on retrouve un déficit en IgA chez 1 : 60 patient atteint de maladie de Basedow, 1 : 77 patient lupique, 1 : 115 patient diabétique de type I, 1 : 180 patient présentant une maladie coeliaque en moyenne (revue de la littérature reprenant les études majeures sur le

sujet (127)). L'association entre les manifestations auto-immunes et le déficit en IgA n'est pas expliquée à l'heure actuelle.

Les hypothèses émises sont :

- (i) une étiologie commune aux deux pathologies : en effet, on observe une agrégation familiale de maladies auto-immunes chez les patients et leurs apparentés au premier degré (128) (Figure 12) et une association forte à certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), en particulier à l'haplotype HLA-A1, B8, DR3, DQ2 (119) (45% chez les patients vs 16% dans la population générale), haplotype qui prédispose aussi au lupus érythémateux systémique (LES), à la maladie de Basedow, au diabète de type 1 et à la maladie coeliaque (129) ;
- (ii) l'auto-immunité comme conséquence de l'absence d'IgA par le biais de son interaction inhibitrice avec le CD89 comme évoqué précédemment (73) ;
- (iii) l'auto-immunité comme conséquence d'une rupture de l'homéostasie lymphocytaire B, et enfin
- (iv) l'hypothèse de réponses inappropriées dirigées contre le soi, induites par des agents microbiens, dont la translocation est facilitée par l'absence d'IgA.

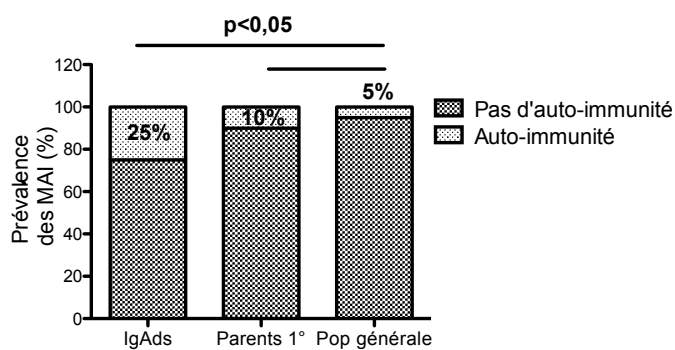


Figure 12 : Prévalence des maladies auto-immunes dans une cohorte de patients d'IgA et chez leurs apparentés au premier degré, selon Jorgensen et al, Journal of Clinical Immunology, 2009, étude comparative menée chez 43 patients et 269 parents au premier degré

Enfin, le déficit en IgA peut s'accompagner de manifestations digestives inflammatoires hors maladie coeliaque, et infections digestives bactériennes. Ainsi, Ludvingsson et al (130) ont retrouvé en 2014, dans une étude cas-témoins (2100 patients vs

18653 témoins) que 3,9% de patients D'IgA présentait une maladie inflammatoire chronique de l'intestin contre 0,5% des contrôles. De plus, certains patients présentent une hyperplasie nodulaire lymphoïde de la muqueuse digestive pouvant être retrouvée de l'estomac au rectum, prenant l'aspect macroscopique en endoscopie de multiples nodules muqueux disséminés. Elle peut être asymptomatique mais peut être à l'origine de douleurs abdominales, d'une diarrhée chronique ainsi que d'obstruction intestinale. Elle se caractérise au plan anatomopathologique par une hypertrophie majeure des ilots lymphoïdes folliculaires de la lamina propria qui s'organisent en centres germinatifs à très forte activité de prolifération (Ki67+) associée à la présence de plasmocytes IgM+ et à l'absence complète de plasmocytes IgA+ (131).

Sur le plan thérapeutique, il n'existe pas de traitement spécifique de cette pathologie. Les maladies auto-immunes sont traitées de manière identique qu'en l'absence de déficit en IgA. Les complications infectieuses ne sont pas accessibles à la substitution étant donné l'absence d'IgA dans les préparations d'Ig polyvalentes, et sont traitées par antibiothérapie visant les germes encapsulés.

1.4.2 Le déficit immunitaire commun variable

Le déficit immunitaire commun variable est une pathologie rare, dont la prévalence dans la population caucasienne est estimée à 1/25000 (132). Il constitue néanmoins le déficit immunitaire humoral *symptomatique* de l'adulte le plus fréquent (133). Ce diagnostic est habituellement porté entre l'âge de 20 et 40 ans mais peut se révéler avant 20 ans dans 20% des cas (134).

Il se caractérise par un défaut *primitif* de production en immunoglobulines (Ig) et une altération de l'immunité humorale protectrice. Les critères de définition du DICV sont (115, 135) (i) une diminution du taux sérique d'IgG (IgG < 6 g/L ou inférieur à 2 déviations standard de la moyenne pour l'âge), associée à un déficit en IgA dans plus de 50% des cas et à des taux variables d'IgM (136), (ii) à partir de l'âge de 4 ans, (iii), en l'absence de déficit

primitif connu de la différenciation et/ou de la fonction lymphocytaire B ou *secondaire* (thérapeutique / lymphoprolifération maligne dans les deux ans suivant le diagnostic) associé à (iv) une altération de la qualité (titre insuffisant) et/ou de la durée (<6mois) des réponses post vaccinales.

Ce défaut de production d'anticorps se traduit cliniquement par de nombreuses complications ainsi que par une morbi-mortalité élevée (137). On distingue ainsi 5 phénotypes cliniques (1, 133, 138) : (i) les infections bactériennes récurrentes (95 % des patients) qui s'associent chez la moitié d'entre eux à (ii) des manifestations auto-immunes (25% des patients, principalement des cytopénies), (iii) une lymphoprolifération polyclonale (incluant les granulomatoses sans agent infectieux identifié chez 9% des patients, les pneumopathies infiltratives diffuses, les adénomégalies chroniques, et l'hyperplasie nodulaire régénérative du foie), (iv) une entéropathie (lésions inflammatoires du tube digestif non infectieuses et non auto-immunes, identifiée chez 15% des patients), (v) une lymphoprolifération maligne (10% des patients) (Figure 13).

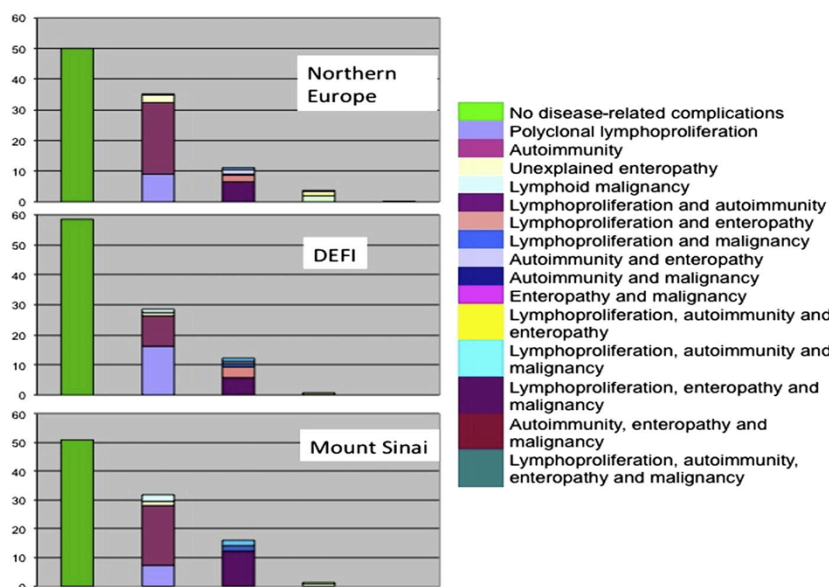


Figure 13 : Phénotypes cliniques présentés par les patients DICV

Chapel H et al, JACI, 2012 (1)

Les patients de 3 cohortes différentes sont regroupés selon leur phénotype et sont représentés en pourcentage du nombre total de patients : Infections isolées (1ère colonne), Lymphoprolifération polyclonale ou Entéropathie ou Auto-immunité (2^{ème} colonne), association de deux phénotypes (3^{ème} colonne) et association de trois phénotypes (4^{ème} colonne).

La physiopathologie du DICV est encore mal élucidée, en partie car cette affection est très hétérogène et regroupe probablement plusieurs pathologies différentes comme le montre la diversité des présentations cliniques ; par conséquent, le diagnostic de DICV est un diagnostic d'exclusion. Il existe des formes familiales de DICV (139), et on retrouve des anomalies de l'immunité humorale chez des parents au premier degré (140); de plus, la consanguinité dans cette pathologie aggrave le phénotype (141) : ces éléments suggèrent un caractère héréditaire. Dans 10% des cas, des anomalies génétiques sont mises en évidence et touchent principalement les gènes impliqués dans la maturation, la fonction et la survie lymphocytaire B : lorsqu'une mutation est retrouvée, le diagnostic de DICV est exclu. On distingue les mutations touchant les gènes codant pour des protéines de co-stimulation (déficits en CD19 (142), CD21 (143), CD81 (144) à la surface lymphocytaire B et en ICOS (145) à la surface lymphocytaire T), des récepteurs de facteurs de survie cellulaire (TACI (146), BAFF-récepteur (147)). Au plan phénotypique, les anomalies sont variables avec une lymphopénie B non systématique, et un déficit portant sur les lymphocytes B mémoires commutés (CD19+CD27+IgD-) (148).

L'instauration d'un traitement par substitution en immunoglobulines purifiées dépend de la fréquence et/ou de la gravité des infections présentées par le patient. La dose de substitution initiale de 0,4 à 0,6 g/kg/mois est à adapter au contrôle de la symptomatologie plus qu'à l'objectif de dosage résiduel (149). Cette thérapeutique a prouvé son efficacité dans le contrôle des infections respiratoires, dans l'amélioration de la qualité de vie, et dans l'allongement de l'espérance de vie (137, 138). En revanche, son efficacité n'a pas formellement été démontrée pour les autres infections (150), en particulier digestives. De plus, la substitution en Ig n'a pas montré de bénéfice dans les complications non infectieuses (hormis les cytopénies auto-immunes).

Il est très intéressant de noter que deux études comparant des sous-groupes de patients présentant un DICV avec persistance ou absence d'IgA, nous montrent que l'absence d'IgA dans le DICV biaise le phénotype vers deux éléments cliniques: les infections digestives (151), et l'entéropathie inflammatoire non infectieuse (1) (corrélation statistique sans lien de causalité démontré), éléments tous deux non accessibles au traitement substitutif par IgG polyvalentes.

2 Problématique et Objectifs

En résumé de la partie précédente, on peut retenir que les travaux récents suggèrent que les réponses IgA intestinales sont non seulement impliquées dans la "défense" immunologique contre les microorganismes invasifs mais qu'elles interviennent dans l'établissement et le remodelage perpétuel de la flore intestinale normale grâce à leurs interactions avec les bactéries commensales participant ainsi à la composition, la diversité et la stabilité du microbiote intestinal. De plus, la "santé" du microbiote intestinal semble nécessaire à l'hôte en contribuant à l'optimisation des ressources (métabolisation des aliments), la lutte contre les infections pathogènes ainsi que l'induction et l'entretien du système immunitaire local. Les modèles de déficit en IgA murins illustrent bien les conséquences attendues de l'absence de cette immunoglobuline : susceptibilité aux infections par les entéro-pathogènes, dysbiose intestinale avec expansion de pathobiontes et perte de la diversité bactérienne, inflammation colique et hypertrophie des organes lymphoïdes secondaires associée à la présence de lymphocytes B et T auto-réactifs.

L'impact de l'absence d'IgA sur le microbiote intestinal et ses conséquences n'ont jamais été explorés chez l'homme. Le but de ce travail est de répondre à cette problématique.

Nous avons constitué une cohorte de patients déficitaires en IgA (n=36, dont n=21 déficit en IgA sélectif et n=15 déficit en IgA s'intégrant dans un DICV) et une cohorte de témoins (n=34) appariés en âge et en sexe chez qui nous avons prélevé les selles et le sang de manière concomitante. Les objectifs de ce travail sont

-(1) de déterminer et de comparer la composition globale du microbiote dans les deux groupes pour mettre en évidence la dysbiose

-(2) d'identifier les cibles bactériennes de l'IgA dans notre cohorte de témoins, et d'étudier leur comportement dans un modèle dépourvu d'IgA

-(3) d'étudier l'impact local et systémique de l'absence d'IgA

3 Résultats

Premièrement, afin de pouvoir aborder la problématique de manière expérimentale (notamment les objectifs 2 et 3), nous avons élaboré une technique de détection des anticorps liés aux bactéries par cytométrie en flux. La technique consiste à incuber des bactéries fixées par le paraformaldéhyde (PFA) avec des anticorps primaires, purifiés ou non, contenus dans tout fluide biologique contenant des anticorps, et à les révéler par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome pour rendre la liaison détectable par cytométrie en flux. L'anticorps primaire peut être incubé à plusieurs concentrations croissantes pour pouvoir déduire un titre précis d'anticorps anti-bactériens ou il peut être incubé à doses fixes dans toutes les expériences (10µg/mL, concentration minimale) pour comparer les niveaux de réponses d'un individu et/ou d'un groupe contre une bactérie. Dans toutes ces expériences, la liaison Fc-médiée potentielle de l'anticorps avec la bactérie commensale a été contrôlée par un anticorps monoclonal humain thérapeutique chimérique (IgG1 Fc humain-Fab murin) et un anticorps du type IgA1 dimérique chimérique fabriqué *in vitro* de spécificité irrelevante (anti-protéine F du virus respiratoire syncytial humain). La preuve de concept a été apportée par (i) homogénéiser les italiques, ou pas l'étude de la cinétique des réponses sériques anti-*Klebsiella pneumoniae* de type IgA et IgG chez un patient traité pour une septicémie avérée à ce germe à point de départ pulmonaire, (ii) l'étude des spécificités des IgA purifiées à partir de lait maternel, de sérum et de contenus iléaux. Cette technique présente plusieurs avantages dont (i) la préservation des épitopes conformationnels car les bactéries sont fixées à l'état viable, (ii) la détection simultanée de plusieurs isotypes (IgA/IgG et IgM) et (iii) les quantités réduites nécessaires en anticorps et en bactéries. Cette méthode expérimentale a fait l'objet d'une publication dans le journal *Nature Protocols* en août 2016 (*Analysis of bacterial-surface-specific antibodies in body fluids using bacterial flow cytometry* (152), la partie humaine de l'étude a été produite par le laboratoire, la partie murine a été réalisée par nos collaborateurs

en Suisse). Cette technique a de nombreuses applications dans le domaine, notamment le criblage d'anticorps monoclonaux disponibles en faible quantité, et les contrôles post-vaccinaux (Annexe 3).

Par ailleurs, nous avons adapté cette technique à l'étude de *consortia* complexes de bactéries, et notamment à celle des microbiotes coliques purifiés de la cohorte pour pouvoir (i) détecter les anticorps à la surface du microbiote pour mesurer les niveaux d'opsonisation des selles par les anticorps intestinaux ex-vivo, (ii) trier les fractions ciblées par les anticorps par cytométrie en flux, (iii) détecter les spécificités des IgG sériques autologues contre le microbiote intestinal. Ces techniques ont été employées dans le deuxième article présenté dans ce travail.

Analysis of bacterial-surface-specific antibodies in body fluids using bacterial flow cytometry

Kathrin Moor^{1,6}, Jehane Fadlallah^{2,6}, Albulena Toska^{1,6}, Delphine Sterlin², Maria L Balmer^{3,4}, Andrew J Macpherson³, Guy Gorochov^{2,5}, Martin Larsen^{2,5,7} & Emma Slack^{1,7}

¹Institute for Microbiology, ETH Zurich, Zurich, Switzerland. ²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMIParis UMRS 1135), F75013, Paris, France. ³Maurice Müller Laboratories, Département Klinische Forschung, Universitätsklinik für Viszerale Chirurgie und Medizin Inselspital, University of Bern, Bern, Switzerland. ⁴Department of Biomedicine, University Hospital Basel, Basel, Switzerland. ⁵AP-HP, Groupement Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Département d'Immunologie, F75013, Paris, France. ⁶These authors contributed equally to this work. ⁷These authors jointly directed to this work. Correspondence should be addressed to M.L. (Martin.Larsen@upmc.fr) or E.S. (Emma.slack@micro.biol.ethz.ch).

Published online 28 July 2016; doi:10.1038/nprot.2016.091

Antibacterial antibody responses that target surfaces of live bacteria or secreted toxins are likely to be relevant in controlling bacterial pathogenesis. The ability to specifically quantify bacterial-surface-binding antibodies is therefore highly attractive as a quantitative correlate of immune protection. Here, binding of antibodies from various body fluids to pure-cultured live bacteria is made visible with fluorophore-conjugated secondary antibodies and measured by flow cytometry. We indicate the necessary controls for excluding nonspecific binding and also demonstrate a cross-adsorption technique for determining the extent of cross-reactivity. This technique has numerous advantages over standard ELISA and western blotting techniques because of its independence from scaffold binding, exclusion of cross-reactive elements from lysed bacteria and ability to visualize bacterial subpopulations. In addition, less than 10⁵ bacteria and less than 10 µg of antibody are required per sample. The technique requires 3–4 h of hands-on experimentation and analysis. Moreover, it can be combined with automation and multiplexing for high-throughput applications.

INTRODUCTION

This protocol describes a technique for quantifying bacterial-surface-binding antibody titers in a variety of body fluids, using cultivated bacteria as a binding 'matrix'. We have used this extensively to study host–microbiota and host–pathogen interactions in both murine models and clinical research^{1–6}. The technique builds on basic concepts developed for the analysis of pneumococcal vaccine responses^{7–9} and antibody responses to *Candida albicans*¹⁰. The role of antibodies in host–bacterial interactions is clearly critical both in protection from pathogenic infection¹¹ and in influencing mutualistic interactions with the microbiota¹². Quantification of functionally relevant bacterial-binding antibodies has mainly been carried out by ELISA/ELISPOT techniques against purified components or whole cells (e.g., refs. 13,14), or by semiquantitative techniques such as western blotting or dot blotting (e.g., refs. 2,15,16). Although all of these techniques can yield useful data, they are subject to a number of pitfalls, including high levels of cross-reactivity between highly conserved bacterial cytosolic proteins¹⁷, variable binding to plastic or membrane scaffolds and the need to purify components to homogeneity¹⁸. This flow-cytometry-based technique enables quantitative analysis of host immunity to any culturable bacterial species in any available body fluid.

Most laboratory animals are raised in highly controlled environments with zero known pathogen exposure¹⁹. Although conventional (i.e., not germ-free) animals are colonized by a dense bacterial microbiota on all body surfaces, strong compartmentalization of the blood and mucosal immune systems renders the blood of these animals effectively naive to any bacterial exposure²⁰. In these cases, parenteral vaccination or deliberate infection generates a specific immune response in the blood that can be evaluated against a near-zero background level of bacteria-specific immunity¹. By contrast, antibodies isolated from the mucosal surfaces of conventional animals will always contain immunoglobulins induced by the presence of the microbiota¹⁵,

via either T-dependent or T-independent B-cell responses²¹. Here, the issue of high-level cross-reactivity between bacterial cytosolic components can make it extremely challenging to quantify the immune response of interest using techniques based on bulk lysed bacteria.

This technique represents a simple way to quantify exclusively antibodies binding to bacterial-surface-exposed epitopes using flow cytometry. The ability to gate on whole bacteria automatically excludes lysed bacteria and fragments. Further, the system is extremely sensitive and has a broad dynamic range; it requires only minute quantities of immunoglobulins and only very low densities of bacterial targets, thus allowing analysis of responses against fastidious species.

Overview of the procedure

In its simplest form, this technique incubates 10⁵ bacterial cells from a pure culture with an antibody-containing bodily fluid (serum, plasma, intestinal/bronchial/vaginal lavage, purified antibodies from saliva, breast milk and so on). After washing, bound antibody is visualized with appropriate secondary reagents (Fig. 1a). The bacteria are then washed, recovered in an appropriate buffer and quantified on any standard flow cytometer with the settings adapted for bacterial cell recognition (Fig. 1b). Median fluorescence intensities, relative to the dilution factor or antibody concentrations, can then be analyzed to generate titers (Fig. 1c). As such, it is very similar to any other flow cytometry staining. However, the success of the technique depends critically on the ratio of bacterial cells to antibody, and on avoiding contaminations.

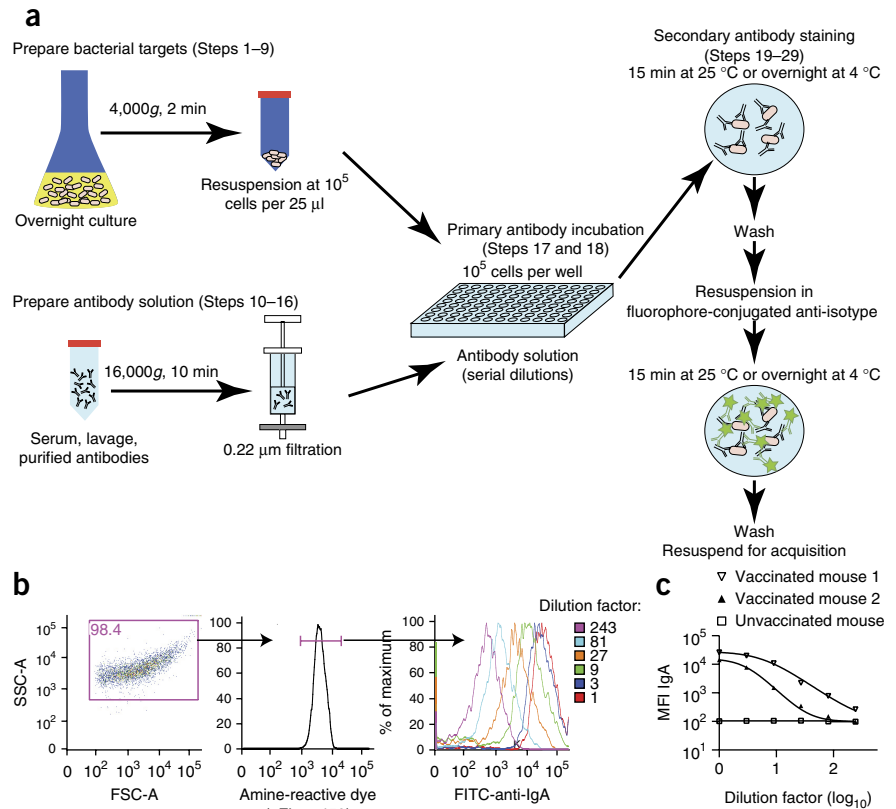
Applications of the protocol

This protocol quantifies bacterial-surface-binding antibodies. As such it is extremely useful to track the success of bacterial vaccination and to determine immunologically relevant exposure

PROTOCOL

Figure 1 | Overview of the protocol.

(a) Diagrammatic representation of how a basic bacterial flow cytometry experiment is carried out. (b) Intestinal lavage was collected from a mouse that had been orally vaccinated against *S. typhimurium*²². Typical dot plots and gating of whole *S. typhimurium* labeled with an amine-reactive dye, and overlaid histograms of the dilution series. (c) Typical titration curves obtained by plotting the median fluorescence intensity (MFI) of *Salmonella* staining against the sample dilution factor for intestinal lavages from two C57BL/6 mice vaccinated orally and one lavage from an unvaccinated mouse.



to defined bacterial species^{1–6}. The technique may also be used to quantitatively study changes in bacterial biochemistry that alter surface antibody binding^{8,22}. This protocol may also be used for a wider range of applications, such as screening of monoclonal antibodies and cell sorting^{21,23,24}. Potentially, the protocol may be expanded to other cultivable microorganisms, such as fungi (e.g., *C. albicans*¹⁰) or eukaryotic parasites, as well as to whole purified microbiota.

Quantification of bacterial-surface-binding antibodies, when combined with cross-adsorption (i.e., removal of specific antibodies by saturating out-titration with the same bacterial strain or related strains of interest; see **Box 1**), permits definition of the species specificity of a response with much greater certainty than other techniques. It is therefore also particularly useful in quantifying antibody titers in situations in which other techniques yield high background^{2,4,6}. In addition, this technique has many advantages over more traditional scaffold-based analyses, particularly for scientists working with fastidious bacterial strains or scarce antibody samples. The antigenic targets are required only at numbers such that bacteria can be reliably differentiated from electronic noise/contamination in the flow cytometer (10⁵ bacteria per sample). An average assay uses between 0.1 and 100 μg of total antibody (e.g., up to 10 μl of serum for IgG1), as opposed to much larger quantities needed for western blotting applications. The quantities of antibodies required are similar to those typically used for ELISA, but the possibility of multiplexing the flow-cytometry-based analysis for multiple bacterial species further increases the efficiency. The readout is immediately quantitative and numerical analysis can calculate standard antibody titers.

Limitations of the protocol

A major requirement of this technique is the need for access to a flow cytometer and the operational knowledge to run the cytometer for bacterial analysis. Further, it is also necessary to have fluorescently labeled monoclonal or polyclonal antibodies against the immunoglobulin of interest. In addition, the technique is unsuitable for bacteria expressing high-affinity antibody-binding proteins on their surfaces (e.g., staphylococcal protein A^{25,26}), as this yields nonspecific staining. We have not attempted to apply this technique to strains that produce very large amounts

of capsular polysaccharide(s). However, work from the pneumococcal vaccine field suggests that, with the appropriate controls, useful data may be obtained with such strains^{8,27}.

An additional limitation is that bacterial culture conditions may alter the surface phenotype of your bacterial strain of interest^{28–30}, or the strain may display other types of phenotypic diversity such as phase variation²⁹. Although it is possible to alter the culture conditions (e.g., temperature, media constituents and different growth phases) for some bacterial strains in order to influence this, it is close to impossible to accurately replicate the *in vivo* growth conditions *in vitro*. In some cases, this may lead to overestimation or underestimation of specific antibody responses. In addition, in its current form, this protocol is designed for use with culturable bacterial species. Although the fraction of microbiota species that can be successfully cultivated *in vitro* is continually expanding³¹, further development of the protocol will be required to work with mixed bacterial populations (e.g., those from feces).

We would like to point out that there is considerable variation in light-scattering characteristics between bacterial species and subspecies, as well as in sedimentation efficiencies and tendency to agglutinate. Therefore, even when bacterial cell number is extremely well controlled, it is not appropriate to compare absolute binding values from a single antibody sample against two or more different species (i.e., it would be inappropriate in isolation to deduce that antibodies from donor A bind with a higher titer to bacterial species X than to bacterial species Y). However, relative binding patterns for sets of antibody donors, a donor plus appropriate controls, or cross-adsorbed samples (**Box 1**) binding to different strains can be compared. For example, donor A has a higher titer against species X than against species Y, whereas

Box 1 | Cross-adsorption for specificity testing ● TIMING 1.5 h

These antibody preparation steps should be carried out when you wish to test the specificity of a response. By first incubating the antibody-containing solution with a high number of a known bacterial species and looking for loss of signal, it is possible to distinguish nonspecific binding (which will depend only on the total immunoglobulin concentration and will be unaffected by this treatment) from specific binding (which should be completely removed by this process).

1. Cross-adsorption needs to be carried out in reasonably large volumes to permit efficient clearance and re-filtration; therefore, we suggest diluting the samples with bacterial flow cytometry buffer to a concentration giving high, but nonsaturating, binding in the bacterial flow cytometry assays (determine this in a pilot experiment).
2. Prepare $(n+1) \times 500 \mu\text{l}$ of the diluted sample to be cross-adsorbed, as detailed in Steps 11–14 of the PROCEDURE, where 'n' is the number of bacterial species against which cross-adsorption is planned.
3. Divide 500 μl of this solution into aliquots in 1.5-ml snap-cap tubes.
4. From stationary-phase cultures of your species of interest, centrifuge sufficient volume at 4,000–8,000g for 5 min at 4 °C to pellet 10^9 bacteria. Resuspend at a density of 10^9 bacteria per ml in bacterial flow cytometry buffer.
5. Add 500 μl of bacterial flow cytometry buffer to the control aliquot of your antibody solution.
6. To all other aliquots, add 500 μl of the bacterial suspensions.
7. Incubate the mixtures at 4 °C for 1 h with gentle shaking.
8. Centrifuge all tubes at 16,000g for 15 min at 4 °C to sediment all bacteria.
9. Recover the supernatants and filter them through a 0.22- μm filter into fresh 1.5-ml tubes to remove any remaining bacteria.
10. Proceed with staining, from Step 17 of the PROCEDURE.

▲ **CRITICAL STEP** The 'bacterial flow cytometry buffer only' cross-adsorbed sample must be included as a dilution control.

donor B has a higher titer against species Y than against species X. This concept is particularly important when using this technique to probe bacterial biochemistry that affects the nature of surface epitopes.

Finally, it should be noted that this technique was conceived specifically for the analysis of exposed surface epitopes. This does not encompass all biologically relevant epitopes (e.g., most secreted toxins cannot be analyzed). Although antibodies binding to the live bacterial surface are likely to be relevant in *in vivo* protection, the assay does not provide any direct evidence of functional protection.

Comparison with other methods

Many different assays have been developed to measure bacterial-species-specific antibodies, including plate-based assays for binding to purified surface carbohydrates, toxins or whole

bacteria (e.g., refs. 13,32), or gel/membrane-based techniques such as dot-blotting and western blotting (e.g., refs. 2,15). Some of these technologies require higher amounts of antibody, which may be unobtainable from certain body fluids. In addition, even comparing between strains of the same species can yield complex results because of physical properties such as resistance to lysis and scaffold binding. Further, with other methods it can be difficult to exclude the detection of reactivity to bacterial cytosolic proteins. By specifically analyzing only intact bacteria, in the absence of any other scaffold, bacterial flow cytometry avoids many of these issues.

An additional benefit of this protocol is that by using live bacteria as the adsorptive matrix ('cross-adsorption') we can demonstrate the specificity of the responses measured, as well as the nature of the epitopes recognized. This is demonstrated in **Figure 2** (see ref. 22). Here we used bacterial flow cytometry and

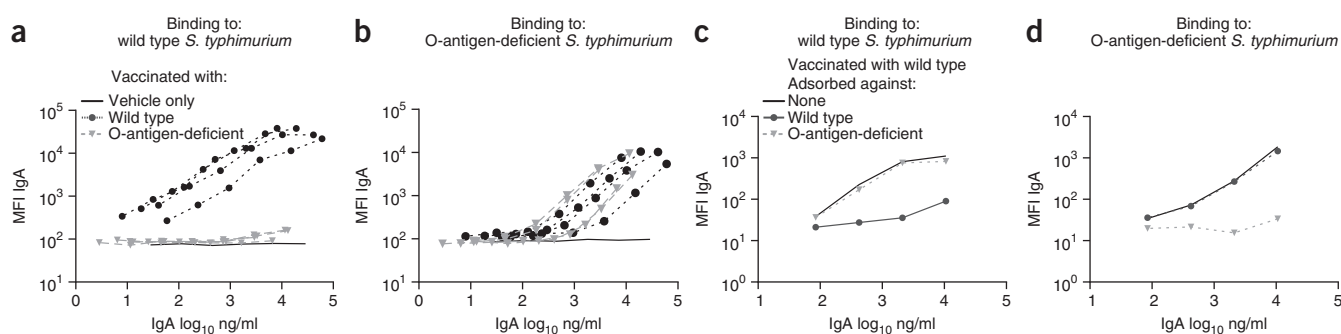
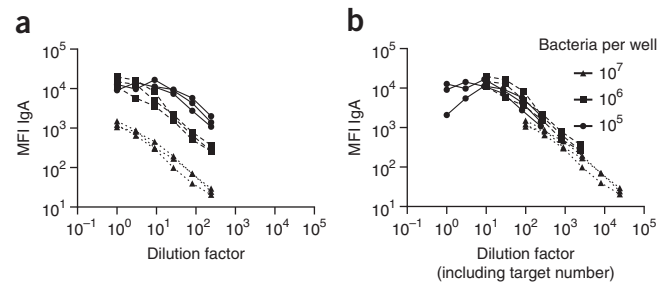


Figure 2 | Detailed analysis of surface epitopes. (a–d) C57BL/6 (wild type) mice were vaccinated once per week for 3 weeks with an oral inactivated *Salmonella* vaccine constructed from either wild type *S. typhimurium* (black circles) or an O-antigen-deficient strain ($\Delta wbaP$, gray triangles) lacking the major surface carbohydrates, or with vehicle alone (PBS, no symbols). On day 21 after the first vaccination, intestinal IgA was collected by lavage and used to stain either wild type (a) or O-antigen-deficient *Salmonella* (b). $n = 5$ per group. Figure shows one representative experiment out of three. (c,d) A single sample generated as in a and b was cross-adsorbed against buffer only (no symbols), live wild type *Salmonella* (black circles) or O-antigen-deficient *Salmonella* (gray triangles). The cross-adsorbed samples were then used for bacterial flow cytometry staining of wild type (c) and O-antigen-deficient (d) *Salmonella*. All animal experiments were approved by the legal authorities (licenses 223/2010 and 222/2013, Kantonales Veterinäramt Zürich, Switzerland) and performed according to the applicable legal and ethical requirements. a and b adapted with permission from Moor *et al.*²².

PROTOCOL

Figure 3 | Increasing the target cell number is equivalent to increasing the dilution factor. **(a,b)** Intestinal lavages from *S. typhimurium*-vaccinated mice (as in **Fig. 2**; see Moor *et al.*²²) were used to stain the surface of *S. typhimurium* at a density of either 10^5 , 10^6 or 10^7 cells per well, as indicated. Identical data are plotted in **a** and **b**. However, in **b**, the x axis dilution factor is corrected to include the increased number of bacteria per well. All animal experiments were approved by the legal authorities (licenses 223/2010 and 222/2013, Kantonales Veterinäramt Zürich) and performed according to the applicable legal and ethical requirements.



cross-adsorption to examine the intestinal IgA response induced by oral vaccination with inactivated wild type *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium SB300 (*S. typhimurium*) and O-antigen-deficient *S. typhimurium* SB300 $\Delta wbaP^{22}$, which lacks the major surface carbohydrate epitope. Although these strains are isogenic, apart from deletion of the galactosyltransferase *wbaP*, IgA induced by the O-antigen-deficient vaccination binds only to the surface of O-antigen-deficient bacteria (**Fig. 2a,b**)²². IgA raised by oral vaccination with the wild type vaccine binds to both strains (**Fig. 2a,b**). This suggested that O-antigen shields all other major epitopes on the surface of wild type *Salmonella* strains. As a confirmation, we demonstrated that cross-adsorption of the IgA induced by wild type *S. typhimurium* against wild type bacteria abrogates binding to the wild type strain, but not the O-antigen-deficient strain (**Fig. 2c,d**), indicating that the majority of surface-exposed non-O-antigen epitopes are indeed shielded. Vice versa, cross-adsorption of IgA induced by vaccination with wild type *S. typhimurium* against O-antigen-deficient *S. typhimurium*

abrogates binding to the O-antigen-deficient strain but not to the wild type strain. We can therefore conclude that oral vaccination with an inactivated *S. typhimurium* vaccine induces IgA with specificity for both O-antigen and other surface antigens. However, on live *S. typhimurium*, the major surface epitope exposed to IgA is the O-antigen. Thus, bacterial flow cytometry can be used to interrogate the antigenic specificity of antibody responses and the nature of surface-exposed antibody epitopes in intact bacteria.

Experimental design

Bacterial number. The most important consideration when setting up a bacterial flow cytometry experiment is that bound antibodies are measured per bacterium. Therefore, in contrast to bulk assays such as western blotting or ELISA, using high numbers of bacteria per well actually dilutes rather than maximizes the specific signal. In fact, increasing the number of bacteria per sample is exactly equivalent to diluting the antibody solution (**Fig. 3**). We have therefore developed this protocol to stain

only 10^5 bacteria per sample—at least 100-fold fewer than has previously been used in pneumococcal antibody assays⁹. This delivers high levels of sensitivity with very low volumes of antibody-containing body fluids.

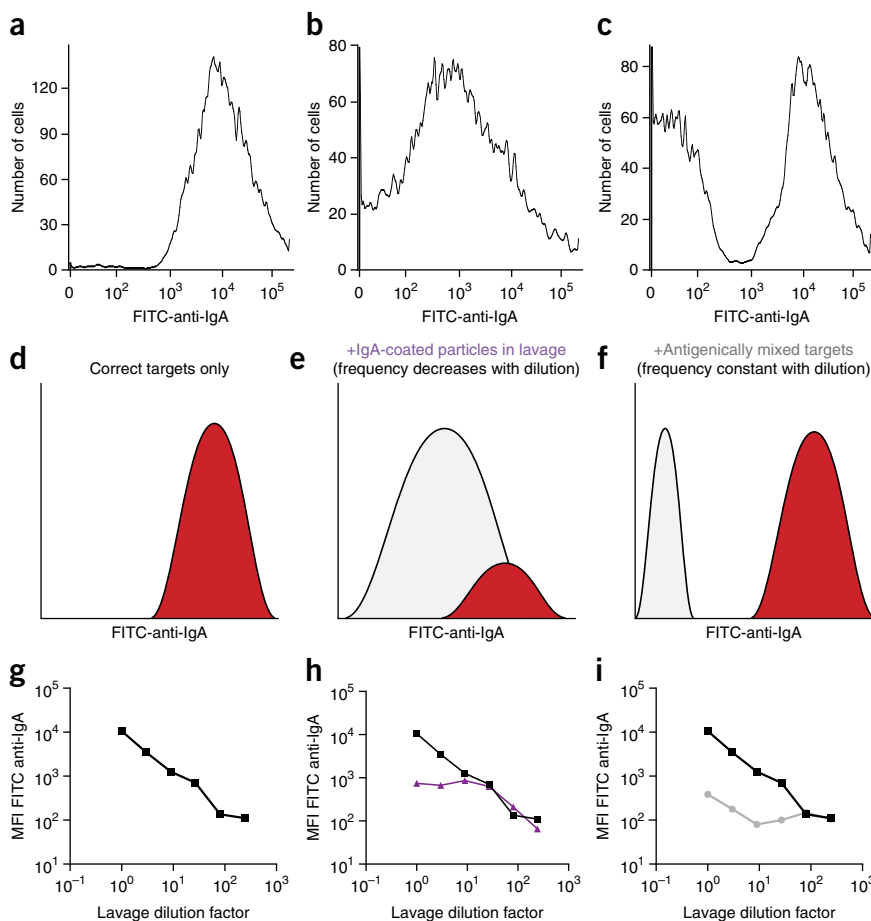


Figure 4 | The effects of different contamination sources on acquired data. **(a–c)** Histograms of IgA staining for a single intestinal lavage from an *S. typhimurium*-vaccinated mouse that was fully cleared by centrifugation and filtration **(a,c)**, or was left unclear **(b)**. These antibody preparations were then used to stain a pure preparation of *S. typhimurium* **(a,b)** or *S. typhimurium* mixed 1:1 with *E. coli* 8178 **(c)**. **(d–f)** Schematic representations of the effects of contaminations on the appearance of histograms at a high specific IgA concentration. Red—specific signal due to IgA bound to *S. typhimurium*, gray—nonspecific signal due to contamination. **(g–i)** Effect of different types of contamination on the titration curves generated by plotting median fluorescence intensity against dilution factor. Black squares—noncontaminated sample. Purple triangles—contamination with IgA-dim events present in the intestinal lavage (as in **b** and **e**). Gray circles—contamination with IgA-negative events present in the bacterial targets (as in **c** and **f**). All animal experiments were approved by the legal authorities (licenses 223/2010 and 222/2013, Kantonales Veterinäramt Zürich) and performed according to the applicable legal and ethical requirements.

Figure 5 | Timing of serum IgG and IgA induction after confirmed *K. pneumoniae* sepsis secondary to a lung infection. **(a,b)** Blood samples were collected from a patient admitted to the hospital with a systemic *K. pneumoniae* infection from day 0 until day 84. A second infection with the same strain occurred during follow-up at day 62. IgG **(a)** and IgA **(b)** responses against *K. pneumoniae* (blue line, circles) and *Enterococcus faecalis* (red line, squares) were determined at a single normalized Ig concentration (10 µg/ml). Negative-control MFI levels (no primary antibodies, isotype control), as well as a standard control of pooled hIgG from healthy donors, are represented as bars. IgG and IgA median fluorescence intensity (MFI) levels are plotted for each time point. Each point or bar represents the mean of two independent experiments. Error bars represent the standard error of the mean. All human samples were obtained following acquisition of the study participants' and/or their legal guardians' written informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the local ethics committees (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VI).

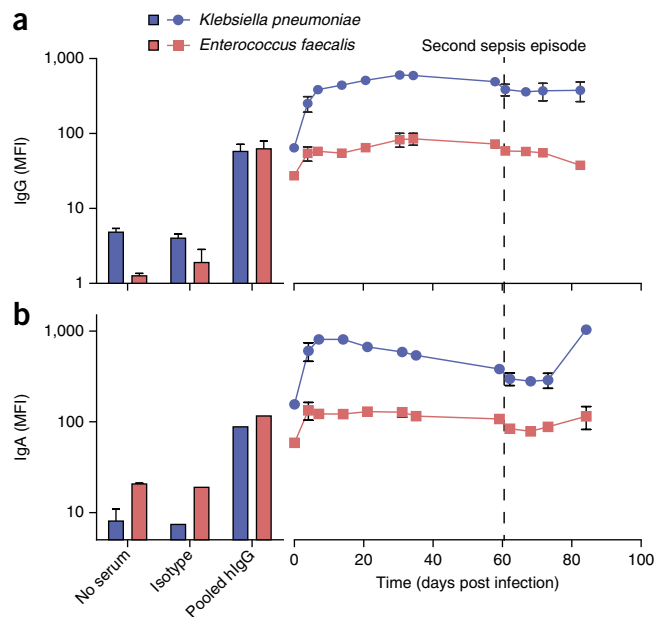
Minimizing contamination and noise. Another major consideration is that, in the basic version of this protocol, bacteria are identified entirely based on their flow-cytometry-determined light-scattering features. This means that any bacteria or bacterial-sized particles in solutions (including dead bacteria in autoclaved solutions) or in cytometer tubing, will contaminate the final data file. This problem can be minimized by thoroughly cleaning the flow cytometer before use and by passing all buffers and media through sterile 0.22-µm filters before use (note that optically clear solutions can contain 10⁶ bacteria per ml). **Figure 4** demonstrates the likely effects of such contaminations on the final conclusions drawn from the analysis. It should be noted that contaminants can be antibody positive (**Fig. 4b,e and h**) or negative (**Fig. 4c,f and i**), and can be mixed with the antibody solutions—in which case they dilute out with titrations (**Fig. 4h**)—or can be mixed with the bacterial targets or can be present in the flow cytometer (**Fig. 4i**), in which case they are present in all samples at equal concentrations. In the worst cases, excessive noise signal may render a positive signal undetectable without complex data analysis (**Fig. 4i**). In all cases, data displaying these staining patterns are unreliable (see the TROUBLESHOOTING section, Steps 31 and 32), and the experiment should be rerun with further purification steps.

An alternative solution to minimize noise is to use fluorescently labeled target bacteria, which allows specific gating. In the case of genetically tractable organisms, fluorescent protein expression is a simple and effective approach. It is highly recommended that those carrying out bacterial flow cytometry for the first time include a sample with *Escherichia coli* K-12 engineered to express an easily detectable fluorescent protein (e.g., GFP in cytometers with a 488-nm laser) in order to confidently set up the flow cytometer to detect bacteria.

For organisms that cannot easily be induced to take up plasmids and/or express fluorescent proteins, it is possible to use cell-permeable amine-binding dyes (**Fig. 1b**) or covalent surface labeling with *N*-hydroxy succinimide (NHS)-biotin compounds and fluorescent streptavidin conjugates. For multiplexing several bacterial strains, the very low off-rate of biotin–streptavidin interactions may be used with NHS-biotin labeling before mixing different target populations. A disadvantage of NHS-biotinylation of the target strain surface is that dense chemical modification of the bacterial surface may interfere with epitope recognition.

Choice of body fluid, purifications and time points for analysis.

The exact choice of body fluids and time points to analyze for



antibody responses depends strongly on the scientific objective. To illustrate best practices, we give four typical situations here.

Induction of serum antibodies: whole-bacterium i.v. vaccination in mice. This is an example of a robust serum antibody response induced by a very strong stimulus at a defined time point¹. In this case, it is well documented that a peak antibody response is observed roughly 3 weeks after initial exposure. The antibodies that have been induced are present at high concentrations in blood serum. As serum is easily accessible and blood can be repeatedly sampled, one would most logically sample before vaccination and then weekly for 3–5 weeks after vaccination¹. As only a few microliters of serum are required per assay, 50 µl of blood per time point is sufficient for a full analysis. Unless the serum samples have a very high fat content, it will be possible to use 0.22-µm-filtered serum directly for bacterial staining.

Induction of serum antibodies during documented *Klebsiella pneumoniae* septicemia. A patient presented with *K. pneumoniae* sepsis, secondary to a lung infection. We followed up the *K. pneumoniae*-specific serum IgG (**Fig. 5a**) and serum IgA (**Fig. 5b**) responses longitudinally. Serum dilutions were adjusted in order to work with single total IgG and IgA concentrations of 10 µg/ml. As a control, the IgG and IgA responses of the same individual were tested against an irrelevant strain (*Enterococcus faecalis*). These remain low and stable over the course of infection, suggesting that the *Klebsiella*-binding activity that we detected was indeed *Klebsiella* specific, or *Klebsiella* related. This longitudinal study highlights a typical 3-week kinetics in induction of specific IgG, but a much faster kinetics of IgA induction. As the IgA response is predominantly primed at mucosal surfaces, the observed response may actually have been initiated during the primary lung infection (**Fig. 5b**).

Analysis of bacterial-binding IgA in intestinal lavage of ex-germ-free mice after recolonization with a single apathogenic strain. This is an example of a relatively weak immune stimulus given at a defined time point¹. The bacteria are given into the intestine and stimulate the mucosal immune system predominantly to induce an IgA response. Although specific IgA will be measurable in serum, the majority of the IgA is secreted across the



Box 2 | Purification of IgA from viscous or fatty samples ● **TIMING 30 min–1 h**

Purification of antibodies using Fc-specific gel filtration is extremely helpful for fluids with a very high viscosity or fat content—for example, fecal water or breast milk. As these tend to be mucosal-associated fluids, IgA is normally the target isotype for purification, and it should be noted that this isotype does not bind to either protein A or protein G (standard immunoglobulin purification reagents). We therefore recommend the following procedure:

1. Predilute the samples in PBS to achieve a workable viscosity, a pH >7 and a volume of between 1 and 10 ml.
2. Clear the suspensions by centrifugation at 16,000g for 5 min at 4 °C.
3. Filter the samples through a 0.22-µm syringe filter.
- ▲ **CRITICAL STEP** This is essential to avoid purification column blockage and complete loss of the sample.
4. For each sample, prepare a gravity flow column containing either peptide M/agarose or immobilized Jacalin affinity gel according to the manufacturer's instructions: typically, degas both the agarose and washing buffer, and then carefully load the agarose on top of a membrane filter, avoiding air bubbles. Wash through with 10 column volumes of wash buffer. Column size and IgA-binding protein quantities should be adjusted to the expected IgA concentration in the sample of interest. Binding capacity of peptide M: 4–6 mg/ml; binding capacity of Jacalin: 1–3 mg/ml.
- ▲ **CRITICAL STEP** Peptide M binds IgA1 and IgA2, whereas Jacalin binds only IgA1 (and IgD).
5. Equilibrate the columns with 10 ml of PBS.
6. Add the sample and allow it to fully enter the matrix.
7. Wash the sample with 20 column volumes of PBS.
8. Elute in 10 ml of elution buffer (0.1 M glycine, pH 2–3, for peptide M; 0.1 M α-D-galactose for Jacalin).
9. After elution in 0.1 M glycine, pH 2–3, use 1 M Tris, pH 7.5, to neutralize the solution. As dimeric secretory IgA has a molecular mass of >300 kDa, buffer exchange can be easily performed by filtration through a 100-kDa ultrafiltration membrane (per the manufacturer's instructions) and resuspension in flow cytometry buffer.
10. These antibody solutions can be divided into aliquots and frozen at –20 °C for several months or at –80 °C for several years.
- ▲ **CRITICAL STEP** Re-filter the solution through a 0.22-µm syringe filter before use, in order to remove any precipitates that may have formed during the preparation process.

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.



host mucosal membranes, and the strongest signal will therefore be measurable in an intestinal lavage^{1,3}. On the basis of published literature^{3,15}, specific IgA is measurable from ~2 weeks post colonization, with a titer that increases over time.

Analysis of bacterial-binding IgA in human breast milk and fecal water. As these fluids are potentially viscous with a high fat content, we strongly recommend affinity-based purification of IgA before analysis to avoid high levels of nonspecific background (as detailed in **Box 2**). These purified IgA solutions can then be used to stain the bacterial species of choice using the standard protocol. In the given examples, IgA specific for a human *E. coli* isolate could be detected in fecal water. *Bifidobacterium adolescentis*-binding IgA was found in breast milk. By contrast, IgA specific for *Bacteroides dorei* was not detected in either of these donors/fluids. Nonspecific binding of the primary and secondary reagents to these bacterial strains was assessed in parallel (**Fig. 6a,b**).

Choice of bacterial targets and preparation methods. The species, subspecies and serovar of bacteria chosen for analysis,

as well as the growth conditions used, may markedly alter the pattern of bacterial antibody binding observed. Two bacteria of the same species (for example, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis) share almost no exposed surface epitopes³³. In addition, many bacterial species display considerable phenotypic variation due to growth phase, environmental influences and quorum sensing²⁹. We therefore advise choosing the bacterial strains for analysis very carefully, generating frozen stocks of these strains and regularly checking for contamination by standard microbiological techniques. In addition, it may be of interest to initially screen a range of culture media and growth conditions to optimize relevant antigen expression.

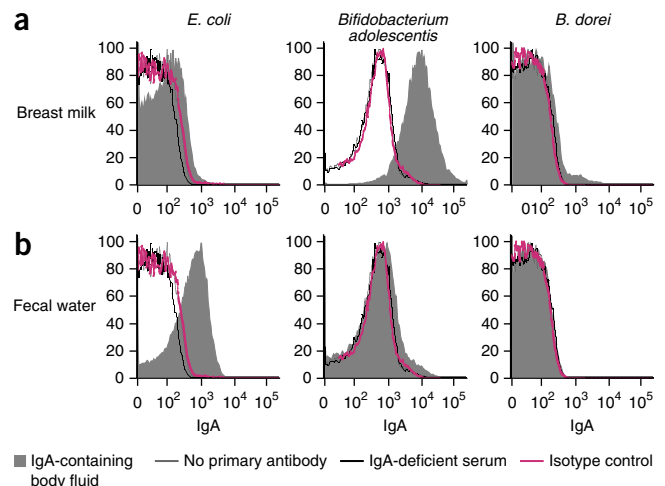


Figure 6 | Bacterial flow cytometry with purified IgA from human breast milk and fecal water. **(a)** Secretory IgA purified from breast milk (gray-filled histogram) and **(b)** secretory IgA purified from fecal water (gray-filled histogram) from two independent donors were tested for binding to *E. coli* (human isolate), *Bifidobacterium adolescentis* and *B. dorei* at a fixed, normalized, concentration (10 µg/ml). Monoclonal IgA isotype control (pink line), no primary antibody (gray line) and IgA-deficient serum (black line) are included as negative controls. Binding is revealed by anti-human IgA-FITC. All human samples were obtained following acquisition of the study participants' and/or their legal guardians' written informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the local ethics committees (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VI).

Box 3 | Cryo-preserving and thawing aliquots of bacterial targets culture time

● TIMING 1–3 d + 30 min

1. Cultivate bacteria and quantify density as described in Steps 1–7 of the PROCEDURE. Calculate the volume of medium that needs to be prepared and inoculated to permit production of sufficient aliquots of frozen cells for the entire experiment series (e.g., *E. coli* typically grows to a maximum density of 10^9 CFU/ml in aerobic culture in a rich medium. To generate 200 aliquots of 10^8 CFU, you will require 20 ml of overnight culture).
2. Centrifuge 10–50 ml of culture at 4 °C at 4,000–8,000g for 5 min. Resuspend in 10–50 ml of sterile PBS.
3. Centrifuge the culture again at 4 °C for 5 min at 4,000–8,000g.
4. Resuspend the pellet in cell-freezing medium to a final concentration of 5×10^8 – 10^9 CFU/ml. Make 100- μ l aliquots and freeze them immediately in liquid nitrogen.

■ **PAUSE POINT** Aliquots may be stored for up to 2 years at –80 °C.

5. To perform experiments, thaw sufficient bacterial aliquots at RT for 15 min.

6. Pool all aliquots and add 1 ml of 1 \times PBS.

▲ **CRITICAL STEP** PBS should be at 4 °C, and it should be passed through a 0.22- μ m filter before use.

7. Centrifuge the samples at 4,000–8,000g for 10 min at 4 °C.

8. Thaw an aliquot of 4% (wt/vol) PFA solution.

9. Resuspend the cell pellet from step 7 of this box in 4% (wt/vol) PFA ((optional) +amine-reactive dye—**Box 4**) at a density of 10^9 cells per ml. Incubate the mixture in the dark at 4 °C for 20 min.

10. Add 1 volume of 1 \times PBS and centrifuge (4,000g, 4 °C, 2 min) the mixture to gently pellet only whole bacteria.

11. Resuspend the bacteria at 5×10^6 cells per ml in bacterial flow cytometry buffer and use within 72 h, continuing with the Procedure from step 10.

■ **PAUSE POINT** The bacterial suspension can be stored at 4 °C for up to 72 h before flow cytometry.

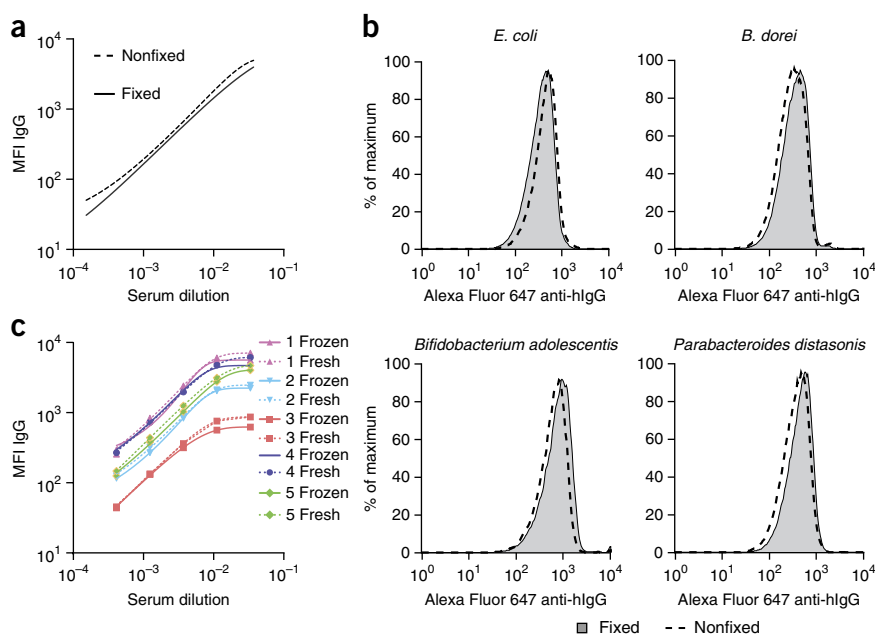
For organisms with higher biosafety containment requirements, it may be necessary to fix the bacteria before staining. Although paraformaldehyde (PFA) fixation before staining very slightly reduces the specific signal for the strains we have tested, it tends to do so equally for all antibody samples and therefore does not alter the final interpretation of relative titers (Fig. 7a,b). It is also possible to fix samples at the end of staining with no alteration in signal (data not shown).

Typically, the experiment size in basic research is small and samples can be measured in a single batch. For this, freshly cultured bacteria can easily be used as targets. However, there are several situations in which it is important to have a bulk stock of bacterial targets. Typically, longitudinal clinical studies may follow patient responses to a particular strain over several years. Ideally, effects of bacterial growth conditions and genetic drift in the bacterial stocks should be excluded. In addition, some fastidious strains may require growth conditions that are unavailable at the scientists' host institution, requiring culture off-site. We have

therefore established a protocol for the preparation of large batches of cryo-preserved bacterial targets (**Box 3**), and we have observed only minor uniform effects of freezing on antibody binding, which again were equal across all samples we have tested (Fig. 7c). This generates both a 'plug and play' system, in which bacteria are always available for experiments, and much better reproducibility of experiments over time.

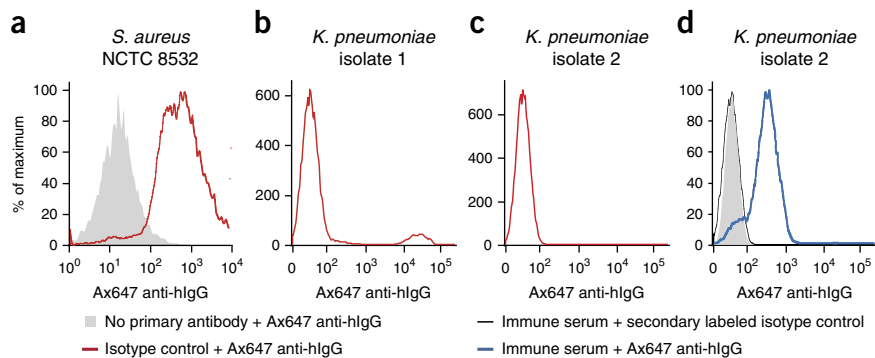
Controls. The value of this technique rests on the use of good controls for nonspecific binding and contamination. Bacterial species that interact with mammalian hosts have experienced selective pressure from adaptive immunity, and some have the ability to nonspecifically bind antibodies^{25,26,34}. In addition, it is important to include sufficient controls to distinguish

Figure 7 | Effects of bacterial cryo-preservation and fixation on IgG binding. (a) Analysis of healthy donor serum IgG responses against paraformaldehyde-fixed and live (nonfixed) freshly grown *K. pneumoniae*. (b) A similar analysis of *E. coli*, *B. dorei*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Parabacteroides distasonis* stained with 10 μ g/ml pooled healthy donor serum IgG. (c) Analysis of IgG responses from five healthy donors against either fresh (dotted lines) or frozen (solid lines) *K. pneumoniae*. All human samples were obtained following acquisition of the study participants' and/or their legal guardians' written informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the local ethics committees (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VI).



PROTOCOL

Figure 8 | Nonspecific antibody binding. (a–d) *S. aureus* strain NCTC 8532 (a) and two primary isolates of *K. pneumoniae* (b,c) were stained without primary anti-sera (‘no primary antibody’, gray shading) or were incubated with a humanized anti-TNF IgG monoclonal antibody (‘isotype control’, red). Binding was detected with Alexa Fluor 647-conjugated polyclonal goat-anti-human IgG (Ax647 anti-hIgG). (d) For *K. pneumoniae* isolate 2, an additional positive control (serum from a patient with documented *K. pneumoniae* sepsis (‘immune serum’, blue) and negative control (serum from an IgA-deficient patient, black line)



are shown. All human samples were obtained following acquisition of the study participants’ and/or their legal guardians’ written informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the local ethics committees (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VI).

‘natural antibody’ binding, background priming levels and antibody complexes from real signals.

Testing for antibody Fc binding to the bacterial strain of interest. Monoclonal antibodies with irrelevant specificities (isotype controls) are the ideal controls. These are widely available in the mouse, rat and rabbit systems. In the human setting, purified Fc fragments or clinical humanized antibodies specific for cytokines can be used. **Figure 8a,b** shows examples in which either the whole population (*Staphylococcus aureus*) or a small subpopulation (*K. pneumoniae* Isolate 1) displays strong binding to human IgG Fc. If this test is positive, it may be worth screening related isolates or genetic mutants to find one lacking Fc-binding activity (**Fig. 8c**). It is important to use secondary staining reagents that are identical to those planned for the main experiments when investigating nonspecific binding, in order to exclude nonspecific binding of the secondary antibody (**Fig. 8d**).

‘Natural’ broadly cross-reactive antibody responses and background priming can be identified using appropriate negative controls. In the murine system (and other experimental animal models), it is usually possible to obtain negative control samples from animals that have never been exposed to the bacterium of interest (**Fig. 9**; Slack *et al.*¹). If substantial antibody binding is observed here, even if it is lower than that in actively immunized animals, it may be worth obtaining appropriate antibody preparations from germ-free animals to exclude the role of microbiota-driven responses (**Fig. 9a,b**)²¹.

Technical controls for adequate clearance of antibody solutions and buffers, as well as biological controls for pre-existing specific antibodies, are essential to demonstrating the reliability of data generated using this technique. Large antibody complexes can sometimes form in antibody solutions, and, if the sample were insufficiently cleared before the bacterial staining, these may be hard to distinguish from bacteria (**Fig. 4b**). The best control for sufficient sample preparation is to examine the presence of a positive antibody-binding signal against a bacterial strain to which the host is highly unlikely to have a functional antibody response. In mice, this can be any strain excluded under the definition of hygienic housing in the local facility (e.g., *S. enterica* serovar Typhimurium; **Fig. 9a,b**)¹. In humans, we have previously used a plant symbiont, *Bradyrhizobium japonicum*, as a negative control⁴. Ideally, such bacteria should be stained in parallel with the test species so that exactly the same antibody preparation is used.

In clinical scenarios, appropriate controls are harder to obtain. Microbial exposure is universal and highly variable, making biological negative controls almost impossible for most experimental purposes. The best controls for Fc- or light-chain binding available are therefore isotype controls—typically monoclonal antibodies of known irrelevant specificity such as the humanized antibodies used clinically for cytokine blockade (**Figs. 8** and **10a,b**). Correspondingly, for most species, there are no active human immunizations to generate positive controls. However, positive controls can be obtained in cases of recent and documented infections with the bacterium of interest or a strain of identical

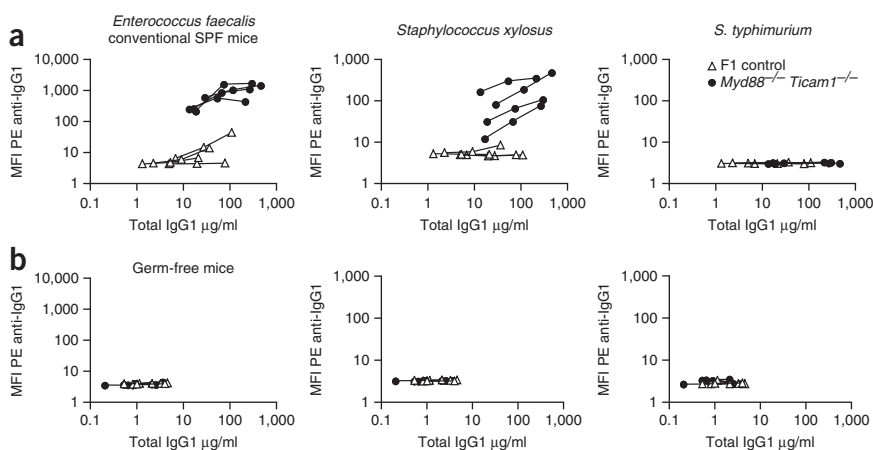
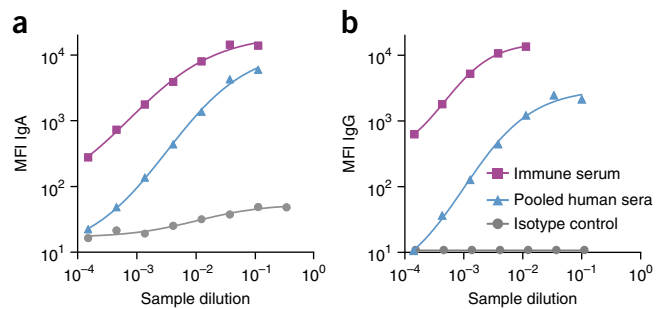


Figure 9 | Use of irrelevant bacterial species and germ-free mice as negative controls in the murine system. (a) Sera from conventionally housed *MyD88*^{-/-}/*Ticam1*^{-/-} mice (black circles) and F1 control mice (open triangles) were used to stain two autologous aerobically culturable microbiota species, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus xylosois*, as well as the irrelevant bacterial strain *S. typhimurium* (to which the mice had never been exposed). (b) Sera from germ-free *MyD88*^{-/-}/*Ticam1*^{-/-} mice and F1 control mice were used to stain the same bacterial strains. IgG1 staining was visualized using phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse IgG1 monoclonal, and the median fluorescence intensity (MFI) was calculated for each dilution. *n* = 4 per group. From Slack, E. *et al.*¹. Adapted with permission from the American Association for the Advancement of Science.

Figure 10 | Controls in the human system. (a,b) Serum from a patient with *K. pneumoniae* sepsis ‘immune serum’ (purple squares), ‘pooled human sera’ (blue triangles) and humanized monoclonal IgA or IgG Isotype controls (gray circles) were used to stain *K. pneumoniae* (isolate 2, non-Fc-binding) followed by detection with human (a) IgA- and (b) IgG-specific reagents. All human samples were obtained following acquisition of the study participants’ and/or their legal guardians’ written informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the local ethics committees (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VI).



serotype (Figs. 5 and 10a,b). Although for practical reasons this will not always be possible, introduction of such positive controls greatly improves data interpretation. A further advantage of such positive control samples is that they can be used as internal standards to facilitate data comparisons in longitudinal measurements.

Pooled polyclonal human IgG (either replacement therapy Ig (IVIg) or human reference serum for research purposes) and IgA (human reference serum) may also be used as standard controls. These are also useful tools that allow a global assessment of the average healthy population status (Fig. 10a,b). Cross-adsorption, as shown in Figure 2, may also be applied in the human system to generate appropriate negative controls.

A final essential set of controls is required to determine appropriate flow cytometer settings and compensation for fluorescence spillover. Ideally, these controls should be generated using the same bacterial species as the main analysis to account for background fluorescence. For each fluorophore, you should generate a pair of samples: one stained with positive control antibodies and one stained with negative control antibodies, as detailed in the PROCEDURE (Steps 1–28). These samples are then stained with a single fluorophore-conjugated secondary antibody to generate single-stained controls. For highly complex stainings, cocktails of secondary antibodies can be generated for ‘fluorescence-minus-one’ controls. In the case that no positive control is available, a last resort is to use cytometer setup beads to determine cytometer settings, but, given the very different size and scatter characteristics of beads and bacteria, this is only really suitable for fluorophores with little or no spectral overlap. A further control for longitudinal experiments in which data must be compared over several different days of analysis is the use of fixed gating templates and calibration beads. When the first samples are run, the calibration beads should be run on the fully set up cytometer and the file should be saved. A ‘gate’ can then be drawn on each bead population in the fluorescence channels of interest, and this gating template and statistics can be saved. As the bead fluorescences remain constant over time, exactly replicating the distribution of beads in the saved gates can generate fully comparable cytometer settings³⁵.

Choice of FACS machine. Samples can theoretically be acquired on any flow cytometer with a laser/filter compatible with the chosen fluorophores. The procedures suggested here have been used successfully to analyze samples on a FACSCalibur (Becton Dickinson, (BD)), a LSRII (BD), FACS CANTO II (BD) and a FACSArray (BD). It is beyond the scope of this protocol to provide instructions for all possible flow cytometers, and considerable differences exist between older and newer machines. Rather, we suggest contacting the manufacturer or local experts to determine

an appropriate setup protocol for bacterial detection on your specific flow cytometer, as well as for advice on how best to generate comparable data on different days.

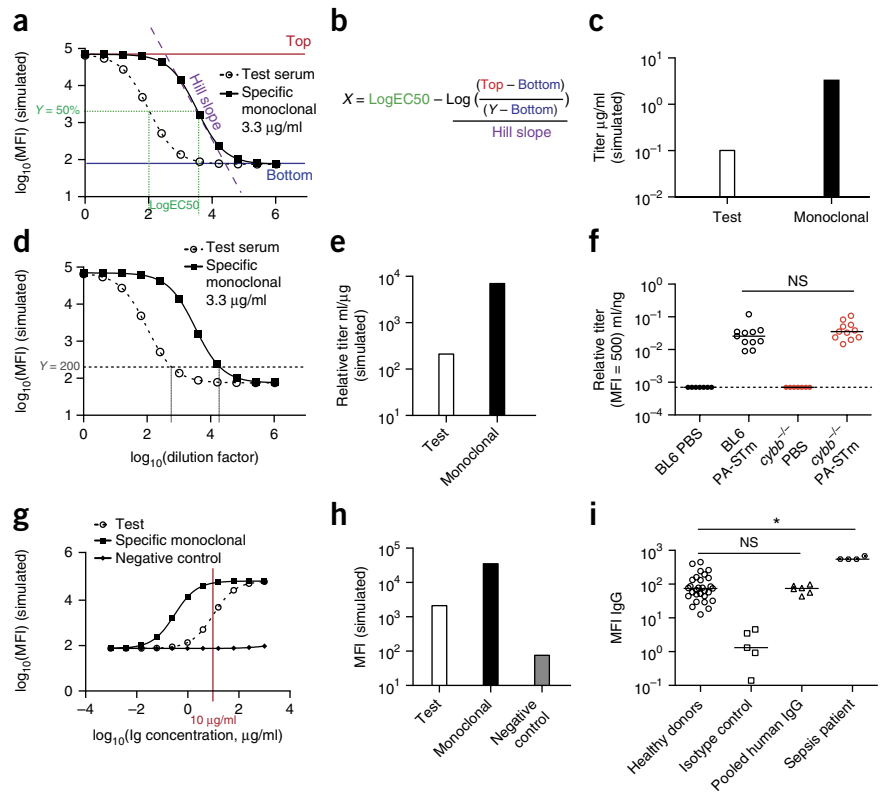
How detailed an analysis is planned? Full titration curves versus single antibody concentrations. ELISA-based techniques to measure antibody titers typically measure either the total signal for a given antibody concentration or generate a full titration curve by applying serially diluted sample to an antigen-coated plate. Exactly the same types of quantitative data can be generated by bacterial flow cytometry. The requirement for either type of analysis depends on the aim of the experiment.

When serially diluted antibody-containing solutions are used to stain the bacterial strain of interest, the resulting fluorescence intensities can be plotted against the dilution factor and will form a four-parameter logistic curve (Fig. 11a,b and Supplementary Data). This generates a very data-rich data set that can be further interpreted. Typically, the horizontal displacement of curves is used to determine the relative titer. In cases in which a monoclonal antibody of known specificity for the strain of interest is analyzed in parallel, this permits the calculation of a titer as the concentration of surface-binding antibodies present in the sample (Fig. 11c and Supplementary Data). It should be noted that avidity and epitope availability will also affect the shift when comparing a monoclonal with a polyclonal response, so this is not an entirely accurate description of the read-out. It is also possible to calculate relative titers in the absence of a monoclonal control (Fig. 11d–f and Supplementary Data). Note that although the units and values differ from the absolute values calculated in Figure 5c, the proportional difference between the ‘test’ and ‘control’ values is identical.

For very large sample sets, analysis of full titration curves increases the workload multiplicatively for each titration step and generates complex statistical issues relating to curve fitting and multiple testing. In these cases, it may be more reasonable to carry out pilot dilution-series stainings on positive control samples to determine a total antibody concentration giving binding levels around the inflection point of the logistic curve (pseudo-linear range; Fig. 11g). All samples can then be diluted to exactly this total antibody concentration and a single well can be analyzed for each donor (Fig. 11h,i). The disadvantages of this approach are that although it will consider a reasonably narrow window of high-titer responses, it may miss quantitative differences between samples showing saturating binding at these concentrations and it will score all low titers as ‘zero’. Nevertheless, this can generate data almost equivalent to those obtained by analysis of full titration curves, with considerably lower cost, fewer lab hours and fewer computer hours.

PROTOCOL

Figure 11 | Data analysis methods. **(a)** Two *in silico*-generated ‘perfect’ data sets for a monoclonal antibody of known specificity and a test sample fitted using the four-parameter logistic equation to demonstrate the meaning of all parameters generated by the nonlinear regression. **(b)** The four-parameter logistic equation rearranged to give X in Y . **(c)** Simulated absolute titers calculated from the curves in **a**. **(d)** *In silico*-generated curves, as in **a**, showing the setting of a y axis limit for the calculation of relative titers. **(e)** Relative titers calculated from the curve shown in **d**. **(f)** Relative titers calculated using the method shown in **d** and **e** for IgA in the intestinal lavages of orally vaccinated (PA-STm) or mock-vaccinated (PBS) wildtype (B6) and gp91Phox-deficient mice (*cybb*^{-/-}) against *S. typhimurium*. Statistics: two-way ANOVA. $n = 8$ or more per group. **(g)** Use of single immunoglobulin concentration measurements to simplify data acquisition and analysis. From full titration curves (simulated as in **a,d**), a value can be identified that gives a good window for detection of positive and negative signals (10 $\mu\text{g/ml}$ in this case). **(h)** Plot of the MFI values for the total concentration obtained in **g**. **(i)** Binding of 10 $\mu\text{g/ml}$ IgG of the indicated sources to *K. pneumoniae*. Lines indicate medians. Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-test. * P value < 0.05. All human samples were obtained following acquisition of the study participants’ and/or their legal guardians’ written informed consent. The study protocol was reviewed and approved by the local ethics committees (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VI). NS, not significant. **f** adapted with permission from Moor *et al.*²².



In conclusion, when designing a bacterial flow cytometry experiment, the following key steps should be taken: determine the optimal time points, body fluids to collect and whether antibody purification will be required; identify the bacterial species of interest and obtain pure frozen bacterial stocks; establish robust culture protocols for this species and whether fresh or frozen targets are most appropriate; establish whether fixation is necessary

for practical or biosafety reasons; before any experiment is started, be sure to exclude Fc binding by the bacterial strain of interest by the use of isotype controls; establish the relevant positive and negative control antibody solutions and bacterial strains; and decide whether full titrations or single concentrations will be analyzed. If single concentrations are to be used, establish the optimal concentration in pilot experiments.

MATERIALS

REAGENTS

- PBS, pH 7.4, no calcium or magnesium (standard lab reagent or 10× PBS, Eurobio, cat. no. CS3PBS01-01)
- BSA factor V (GE Healthcare, cat. no. K41-001)
- Sodium azide (Sigma-Aldrich, cat. no. 71289) **! CAUTION** This is a hazardous chemical. Avoid contact with skin, eyes and airways.
- Paraformaldehyde (PFA; Sigma-Aldrich, cat. no. 158127) **! CAUTION** PFA is toxic and flammable. When you are weighing the crystalline solid or preparing solutions, work should be performed in a fume hood.
- Human blood, breast milk, feces or other fluid of interest, collected in the context of an approved clinical trial or from an approved biobank. **! CAUTION** For human studies, informed consent must be obtained from all study subjects. **! CAUTION** For studies using human or animal samples, all experiments must be conducted according to the relevant guidelines and official permissions/ethical approval must be obtained **! CAUTION** Such samples are potential infection hazards. Handle them at an appropriate biosafety level.
- Murine blood, intestinal lavage, feces or other fluid of interest collected in the course of ethically approved animal experiments **! CAUTION** For studies using human or animal samples, all experiments must be conducted according to the relevant guidelines and official permissions/ethical

- approval must be obtained **! CAUTION** Such samples are potential infection hazards. Handle them at an appropriate biosafety level.
- Appropriate liquid bacterial culture medium: e.g., lysogeny broth medium (e.g., liquid medium, MP Biomedicals, cat. no. 3001-031), brain–heart infusion broth (Oxoid, cat. no. CM1135) **! CAUTION** Many liquid media contain components that are potentially harmful to human health. Follow the manufacturer’s instructions for safe handling.
- Appropriate solid bacterial culture media: e.g., Columbia agar + 5% sheep blood (Biomérieux, cat. no. 43049), LB agar (Thermo Fischer Scientific, Life Technologies, cat. no. 22700-025) **! CAUTION** Many solid media contain components that are potentially harmful to human health. Follow the manufacturer’s instructions for safe handling.
- Frozen stocks of the bacteria of interest (e.g., *Klebsiella pneumoniae* (American Type Culture Collection (ATCC), cat. no. BAA-1705)) **! CAUTION** Such stocks are potential infection hazards. Handle them according to the appropriate biosafety regulations for the species in question.
- Appropriate liquid disinfectant (e.g., Clidox, Pharmacal Research Labs, cat. nos. 95120F and 96120F)
- Taq PCR kit (e.g., Promega GoTaq Green, Promega, cat. no. M7122)
- Agarose LE (e.g., Promega, cat. no. V3125)
- 1× Tris–EDTA (TE) buffer (e.g., Promega, cat. no. V6232)

- Gel extraction kit (e.g., Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, cat. no. A9281)
- ACD tubes (BD Vacutainer, cat. no. 364606)
- Lymphocyte separation medium (Eurobio, cat. no. CMSMSL0101)
- 1.2-ml serum-activating gel tubes (Sarstedt, cat. no. 41.1395.005)
- 0.5 M EDTA (Applichem, cat. no. A1104) **! CAUTION** EDTA is an irritant. Wear suitable personal protective equipment while handling this compound.
- Soybean trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich, cat. no. T9128)
- EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo Fischer Scientific, Life Technologies, cat. no. 21330)
- Glycine (AppliChem, cat. no. A1067)
- Cell proliferation dye eFluor 450 (eBiosciences, cat. no. 65-0842-85)
- Fixable viability dye eFluor780 (eBiosciences, cat. no. 65-0863-14)
- LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain Kit (Life Technologies, cat. no. L-23101) **▲ CRITICAL** We have noticed that the Aqua version (LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit; Life Technologies, cat. no. L-34957) is inefficient for bacterial staining.
- CellTrace 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE; Life technologies, cat. no. C34554) **▲ CRITICAL** CFSE is efficient only for a subset of bacterial species. As dye loading is heavily dependent on bacterial biochemistry, optimal dye-type, concentration and loading conditions should be determined for each bacterial species tested.
- IgA-binding peptides: peptide M/agarose (Invivogen, cat. no. gel-pdm-2), immobilized Jacalin (Thermo Fischer Scientific, cat. no. 20395) **▲ CRITICAL** M-peptide binds IgA1 and IgA2, whereas Jacalin binds only IgA1 (and IgD).
- Human reference serum (Bethyl, cat. no. RS10-101)
- Pooled human IgG (Hizentra, CSL Behring Laboratories)
- Infliximab (monoclonal chimeric IgG1 anti-human TNF- α , Janssen Biotech)
- Chimeric IgA anti-hRSV protein F (B cell Design, cat. no. A1Trsv11)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, cat. no. G7757)
- Fluorescent calibration beads (e.g., Rainbow calibration particles eight peaks, 3.0–3.4 μ m, Becton Dickinson, cat. no. 559123)
- Flow-count fluorosphere beads (Beckman Coulter, cat. no. A91346)
- ELISA kits to determine total concentrations of your antibody isotypes of interest (e.g., Human IgG ELISA Quantitation Set, Bethyl, cat. no. E80-104)
- Standard Taq PCR mix
- Neutralization buffer: 1 M Tris HCl, pH 7.5 (e.g., Life Technologies, cat. no. 15567-027)

16S rDNA primers

- FD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Microsynth AG)
- FD2: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' (Microsynth AG)
- RC1: 5'-ACGGGCGGTGWTGTRCAA-3' (Microsynth AG)

Elution buffers

- Peptide M: 100 mM glycine, pH 2–3 (AppliChem, cat. no. A1067)
- Jacalin: 0.1 M α -D-galactose (Sigma-Aldrich, cat. no. G0625)

EQUIPMENT

- Polypropylene 96-well V-bottom plates (e.g., VWR, cat. no. 732-2620)
- Library tubes, 1.2 ml polypropylene, 5.8 \times 47.4 mm (Milian SA, cat. no. 077210)
- Sterile serological pipettes (e.g., Sarstedt, cat. no. 86.1254.001)
- Syringes
- 0.22- μ m Bottle-top filters (rapid Filtermax, 0.22- μ m PES, TPP, cat. no. 99505)
- 0.22- μ m Syringe filters (>1 ml, polyethersulfone 0.22 μ m, TPP, cat. no. 99722)
- 0.22- μ m Syringe filters (<1 ml, Millex-GV, 0.22- μ m polyvinylidene difluoride, 4 mm, Merck Millipore, cat. no. SLGVR04NL)
- 1.5-ml Snap-cap tubes, autoclaved at 121 $^{\circ}$ C for 12 min (e.g., Sarstedt, cat. no. 72.695.500)
- Sterile pipette tips
- Petri dishes (e.g., Sarstedt, cat. no. 82.1472)
- Sterile inoculation loops (e.g., Nunc, Sigma-Aldrich, cat. no. I7648-1PAK)
- Parafilm (Sigma-Aldrich, cat. no. P7793-1EA)
- 0.2- μ m Centrifugation columns (VWR, cat. no. 82031-356)
- Disposable gravity-flow columns (e.g., Pierce, Life Technologies, cat. no. 29925)
- Amicon ultracentrifugal filters, 100 kDa cutoff (Merck Millipore, cat. no. UCF910096)
- Glass bacterial culture flasks/tubes with rubber stoppers and aluminum seals (e.g., Chemglass Life Sciences, cat. no. CLS-4209-01)

- Any flow cytometer with appropriate laser/detector combinations for the fluorophores used. For example, LSRII (Becton Dickinson) 488-, 405- and 633-nm lasers and with nine detectors. Associated computer running acquisition software—for example, FACS Diva (BD) **! CAUTION** Class I laser product.
- Robotic sample loaders for the flow cytometer (not essential)
- Bench-top centrifuge capable of centrifuging 96-well plates (e.g., Eppendorf 5810 R, A-4-81 rotor)
- Refrigerated minifuge for 1.5- to 2-ml tubes (e.g., Eppendorf 5417 R with rotor FA-45-30-11)
- Multichannel pipettes (e.g., Gilson Pipetman L multichannel 12 \times 20–200 μ l, cat. no. FA10012)
- Laminar flow cabinet certified up to biosafety level II (e.g., Scanlaf Safe 1200, Vitaris, cat. no. 61200-LAB)
- Fume hood
- For anaerobic culture of targets: anaerobic tent (e.g., type B vinyl anaerobic chamber) supplied with gas mixture (e.g., 10% H₂, 5% CO₂ and 85% N₂) for anaerobic culture
- For anaerobic culture of targets only: anaerobic culture jar (e.g., Oxoid, cat. no. HP0011)
- Stationary incubator (e.g., Heraeus B12, Thermo Fischer Scientific)
- Shaking incubator (e.g., Kuhner shaker ISF-1-W, Adolf Kühner AG)
- Micropipettes
- Aspirator pump (e.g., Vacusafe, Vitaris)
- Waterbath or thermomixer programmable to 37–56 $^{\circ}$ C
- Orbital shaker
- Spectrophotometer capable of measuring OD_{600nm}. (e.g., Agilent Technologies, Agilent 8543)
- PCR machine (e.g., T100 thermal cycler, Bio-Rad)
- Agarose gel equipment and power pack (e.g., 1704467 and PowerPac Universal Power Supply, Bio-Rad)
- Analysis computers running FlowJo (Treestar), Excel (Microsoft) and Prism (GraphPad). It would be possible to run all analysis in the 'R' statistical programming language, and open-source flow cytometry analysis solutions (Flow (<https://galen.dulci.duhs.duke.edu/flow/>) or Bioconductor (<http://bioconductor.org/>) and thus to have an open-source software solution. However, we have not currently implemented this solution.

REAGENT SETUP

PBS Dilute 10 \times PBS to 1 \times with dH₂O.

Bacterial flow cytometry buffer The bacterial flow cytometry buffer is PBS with 2% (wt/vol) BSA and 0.02% (wt/vol) sodium azide. Filter-sterilize the buffer and store it at room temperature (RT, 20–25 $^{\circ}$ C) for up to 1 year.

! CAUTION Sodium azide is harmful. Avoid contact with skin, eyes or airways. Wear suitable personal protective equipment when you are handling the solid or solutions containing this chemical.

4% (wt/vol) PFA in PBS Dissolve PFA powder in PBS with heating at high pH. Adjust the pH to 7 using hydrochloric acid. Pass the solution through a sterile 0.22- μ m filter. Divide the solution into aliquots, and store them at –20 $^{\circ}$ C for up to 3 months. **! CAUTION** PFA is toxic and flammable. When you are weighing the crystalline solid or preparing solutions, work should be performed in a fume hood.

Collection of antibody-containing body fluids: serum/plasma Collect serum/plasma using any standard protocol. Serum and plasma should be separated away from blood cells rapidly after collection and stored at –80 $^{\circ}$ C until use (indefinite storage at –80 $^{\circ}$ C). **! CAUTION** For human studies, informed consent must be obtained from all study subjects.

! CAUTION For studies using human or animal samples, all experiments must be conducted according to the relevant guidelines, and official permissions/ethical approval must be obtained. **! CAUTION** Such samples are potential infection hazards. Handle them at an appropriate biosafety level.

Collection of antibody-containing body fluids: mouse intestinal lavages Collect the samples as described¹⁵. Make intestinal lavage buffer <1 h before use: it contains 1 \times PBS, 5 mM EDTA and 1 mg/ml soybean trypsin inhibitor. Dissect the entire intestine from the stomach to the sigmoid colon. Inject 5 ml of intestinal lavage buffer into the duodenal lumen over a Petri dish. Collect the fluid into a Petri dish by cutting open the cecum. Transfer the fluid to a 50-ml falcon tube and clear it by centrifugation at 16,000g at 4 $^{\circ}$ C for 30 min. The supernatant can be divided into aliquots and stored at –80 $^{\circ}$ C for several years. **! CAUTION** For human studies, informed consent must be



TABLE 1 | Suitable secondary reagents.

Target	Clone name/ polyclonal	Supplier	Catalog number	Conjugate	Tertiary	Working conc.
Mouse IgA	C10-3	BD	559354	FITC	NA	10 µg/ml
Mouse IgA	RMA-1	Biolegend	407004	Biotin	Pacific Blue– streptavidin Invitrogen, S-11222, 2 µg/ml	10 µg/ml
Mouse IgG2a/c	RMG2a-62	Biolegend	407106	FITC (others not tested)	NA	5 µg/ml
Mouse IgG2b	RMG2b-1	Biolegend	406706	FITC (others not tested)	NA	5 µg/ml
Mouse IgG3	RMG3-1	Biolegend	406803	Biotin	Pacific Blue– streptavidin Invitrogen, S-11222, 2 µg/ml	5 µg/ml
Mouse IgM	RMM-1	Biolegend	406509	Allophycocyanin (APC-Cy7 also tested)	NA	4 µg/ml
Human IgM (Fcµ)	Donkey polyclonal	Jackson Immuno-research	709-116-073	Phycoerythrin (PE)	NA	7 µg/ml
Human IgG (Fcγ)	Goat polyclonal	Jackson Immuno-research	109-605-098	Alexa Fluor 647	NA	7 µg/ml
Human IgA (Fcα)	Goat polyclonal	Jackson Immuno-research	109-095-011	FITC	NA	7.5 µg/ml

These reagents can be combined in cases in which fluorophores are compatible, permitting analysis of multiple antibody isotypes in parallel. There are many suppliers and many possible secondary reagents that could encompass almost any host species. The optimal concentration for reagents that are not listed here should be determined by testing a range of concentrations on a known positive control sample. NA, not applicable.

obtained from all study subjects. **! CAUTION** For studies using human or animal samples, all experiments must be conducted according to the relevant guidelines, and official permissions/ethical approval must be obtained.

! CAUTION Such samples are potential infection hazards. Handle them at an appropriate biosafety level.

Collection of antibody-containing body fluids: human fecal water

Homogenize 0.2 g of feces in 1 ml of PBS. Centrifuge the suspension at 21,000g for 15 min at 4 °C. Carefully collect the supernatant by micropipetting. Add a second 1 ml of PBS, homogenize the mixture and centrifuge it again. Pool this supernatant with that collected initially, and store it at –80 °C until required. **! CAUTION** For human studies, informed consent must be obtained from all study subjects. **! CAUTION** For studies using human or animal samples, all experiments must be conducted according to the relevant guidelines and official permissions/ethical approval must be obtained. **! CAUTION** Such samples are potential infection hazards. Handle them at an appropriate biosafety level.

Preparation of secondary staining reagents Make up all secondary staining solutions <1 h before use in bacterial flow cytometry buffer, as indicated in **Table 1**. **▲ CRITICAL** Filter all staining solutions through a 0.22-µm syringe filter immediately before use to remove antibody complexes.

Preparation of bacterial agar plates Make up and autoclave the solid bacterial medium according to the manufacturer’s instructions. In a clean environment, pour 25 ml of agar per Petri dish. Close the lids on the plates and allow them to set at RT. Follow the manufacturer’s guidelines on agar plate storage. For anaerobic bacterial culture, it is recommended to pre-reduce the plates by incubation in an anoxic environment for 3–7 d before inoculation.

Preparation of liquid bacterial culture media Make up, sterilize and store the liquid bacterial culture media according to the manufacturers’ instructions. Follow the manufacturer’s guidelines on media storage.

▲ CRITICAL Most of the rich liquid culture media contain poorly defined ingredients such as yeast extract and may contain dead bacterial particles.

To avoid these as a source of incorrect target material, all liquid media should be first autoclaved and then filtered with a sterile 0.22-µm filter to clear these particles. If correct aseptic technique is then used, all bacterial-sized particles present in the final culture will be your species of interest. For anaerobic bacterial culture, it is recommended that the medium be reduced before use by incubating it in an anoxic environment for at least 7 d before inoculation.

Cell-freezing buffer The cell-freezing buffer is 1× PBS with 20% (vol/vol) glycerol. Filter the buffer through a sterile 0.22-µm filter into a sterile sealable vessel. As long as good aseptic technique is followed, this solution may be stored at 4 °C for up to 6 months.

EQUIPMENT SETUP

For users of FACSCalibur (BD), LSRII (BD), FACS CANTO II (BD) and FACSArray (BD), bacteria are easily visualized by changing the standard cytometer settings. First, both forward-scatter and side-scatter parameters should be acquired on logarithmic scales. Second, standard flow cytometer settings ‘threshold’ the acquired events to only record data from particles of mammalian cell size or higher (typically electronically discarding all values with a low forward-scatter value). Bacterial cells have low values for both side scatter and forward scatter. We therefore recommend to threshold the acquisition on both forward-scatter and side-scatter at a very low, but nonzero, value (e.g., FSc = 200, SSc = 200 on LSRII and FACS CANTO II). The thresholds should be combined with an ‘AND’ logic gate. **▲ CRITICAL** Ensure that the flow cytometer is clean by acquiring a tube containing 0.22-µm-filtered 1× PBS or water before commencing acquisition. If >100 events are acquired in 1 min, reclean the machine and repeat.



PROCEDURE

Preparation of bacterial targets ● TIMING 2–7 d

1| Work in sterile conditions (e.g., laminar flow cabinet). Streak out the bacterial target strain from a frozen stock onto solid media using a sterile inoculation loop (media as suggested in **Table 2**, or appropriate to your strain of interest).

! CAUTION This is a potential biohazard. Wear personal protective equipment and follow local guidelines for biosafety level 1 or 2.

▲ CRITICAL STEP If the strain is an anaerobe, carry out this procedure in an anaerobic tent using pre-reduced agar plates and inoculation loops.

2| Incubate the inverted plates at an appropriate temperature and in an appropriate atmosphere (e.g., sealed in anaerobic culture jars for anaerobes or unsealed for aerobes in a 37 °C incubator) until single colonies are visible: typically 16–48 h for aerobes and 48 h or longer for anaerobic strains.

3| Prepare an appropriate sterilized bacterial culture vessel containing 5 ml of 0.22-µm-filtered bacterial culture medium (**Table 2**) using good aseptic technique.

▲ CRITICAL STEP For anaerobes, pre-reduce this medium for 1 week by incubating it unsealed at RT in an anaerobic tent.

4| Inoculate a single colony from Step 2 into the 5 ml of culture medium from Step 3 using good aseptic technique under an appropriate atmosphere.

5| Incubate the culture at 37 °C (or the appropriate temperature) under an appropriate atmosphere until stationary phase growth is reached.

! CAUTION These are potential infectious hazards. Always wear appropriate personal protective equipment. Handle bacterial strains according to their designated biocontainment risk level.

▲ CRITICAL STEP Growth phase, medium and oxygen availability may affect the expression of relevant surface antigens. Carry out pilot experiments to determine the optimal growth conditions for the detection of antibody binding.

▲ CRITICAL STEP For further details on anaerobic culture, see Speers *et al.*³⁶.

? TROUBLESHOOTING

TABLE 2 | Typical bacterial growth conditions of species that have been tested in bacterial flow cytometry.

Strain	Growth medium	Incubation
Facultative/obligate aerobes		
<i>E. coli</i> K-12, <i>E. coli</i> Nissle 1913, human and mouse primary <i>E. coli</i> isolates, <i>S. enterica</i> species, <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , altered schaedler flora, <i>Lactobacilli</i> strains	Liquid: lysogeny broth medium or brain–heart infusion medium	Tubes and flasks of liquid media should be incubated at 37 °C for 18 h in a standard shaking incubator. Plates should be incubated at 37 °C for 18 h in a standard incubator
<i>Citrobacter rodentium</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> complex	Solid: LB agar plates or Columbia agar + 5% sheep blood	
Strict anaerobes		
<i>Clostridium perfringens</i> , altered Schaedler flora <i>Clostridia</i> species, <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Mucispirillum schaedleri</i>	Liquid: brain–heart infusion medium Solid: Columbia agar + 5% sheep blood	Both plates and liquid cultures should be stationary while incubated at 37 °C for 18–48 h in an anaerobic atmosphere (85% N ₂ , 10% H ₂ , 5% CO ₂)
Anaerobic or microaerophilic		
<i>B. dorei</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>B. thetaiotamicron</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>Parabacteroides distasonis</i>	Liquid: brain–heart infusion medium Solid: Columbia agar + 5% sheep blood	Liquid media are incubated 37 °C with gentle shaking for 18–36 h in anaerobic atmosphere (85% N ₂ , 10% H ₂ , 5% CO ₂) Plates are incubated for 48 h at 37 °C in anaerobic atmosphere (85% N ₂ , 10% H ₂ , 5% CO ₂)

Box 4 | Use of an amine-reactive dye or NHS-biotin labeling for target identification and multiplexing ● **TIMING** amine-reactive dyes, 20 min; surface biotinylation, 2 h

These procedures can be used to chemico-fluorescently label bacterial targets, either to positively gate these away from debris in the flow cytometer or to be able to mix multiple bacterial species to multiplex the analysis.

Amine-reactive dyes

1. Either prepare fresh live bacterial targets as in Steps 1–6 of the PROCEDURE or thaw frozen bacterial targets as described in **Box 3**.
2. Centrifuge at 4,000–8,000g for 2 min at 4 °C.
3. Thaw a fresh aliquot of 4% (wt/vol) PFA (1 ml per 10⁹ CFU) and add an amine-binding dye to the recommended concentration (e.g., e-Fluor 450 cell proliferation dye, 20 μM), and pass the solution through a 0.22-μm filter.
4. Resuspend the bacterial pellet in the dye solution and incubate it for 20 min at RT in the dark with shaking to ensure even dye labeling.

? TROUBLESHOOTING

5. Centrifuge the mixture at 4,000–8,000g for 2 min at 4 °C. Resuspend the sample in 1 ml of bacterial flow cytometry buffer and proceed to assess and adjust the bacterial density to 5 × 10⁶ per ml, as described in Steps 7–9 of the PROCEDURE.

Surface NHS-biotin labeling

1. Prepare fresh, live bacterial targets as described in Steps 1–6 of the PROCEDURE. Measure the OD_{600nm} value and adjust the density to 5 × 10⁸ bacteria per milliliter with bacterial flow cytometry buffer. Determine the volume of this suspension required for the experiment (0.25 μl per well to be analyzed).
 2. Make up an equal volume of EZ-Link NHS-PEG4-Biotin per the manufacturer's instructions, to 2 mM in 1× PBS.
 3. Mix the NHS-biotin solution 1:1 with the bacterial suspension.
 4. Incubate the mixture at RT for 1 h, with shaking (500 r.p.m., orbital shaker).
 5. Centrifuge the mixture at 4,000–8,000g for 5 min at 4 °C, and discard the supernatant.
 6. Resuspend the pellet in 1 ml of 1× PBS 100 mM glycine to quench staining.
 7. Centrifuge the mixture at 4,000–8,000g for 5 min at 4 °C, and discard the supernatant.
 8. Resuspend the pellet in 1 ml of bacterial flow cytometry buffer. Repeat the washing steps of this box (Steps 7 and 8) with bacterial flow cytometry buffer twice.
 9. Resuspend in 1 ml of fluorophore–streptavidin conjugate solution in bacterial flow cytometry buffer (e.g., Pacific Blue–streptavidin, 2 μg/ml). Incubate the mixture for 30 min at RT in the dark.
 10. Wash three times by centrifugation at 4,000–8,000g for 5 min at 4 °C, and resuspend in 1 ml of bacterial flow cytometry buffer to remove all unbound streptavidin.
 11. Bacterial targets labeled with different colors of streptavidin conjugates may then be pooled and the final concentration adjusted to 5 × 10⁶ bacteria for each species per milliliter of bacterial flow cytometry buffer.
- ▲ **CRITICAL STEP** Check that surface labeling is homogeneous by running a small aliquot (25 μl of the 5 × 10⁶ CFU/ml final suspension, diluted to 300 μl with bacterial flow cytometry buffer) through the flow cytometer. A single fluorescent peak should be visible in the relevant fluorescence channel. If multiple peaks are observed, the targets should not be analyzed further.

? TROUBLESHOOTING

6| Centrifuge 1 ml of culture at 4,000g for 2 min at 4 °C to gently pellet only whole bacteria (bacterial fragments will bind antibodies but they will later be lost from the analysis, so they may reduce the specific signal). Optionally, it is possible to label the bacteria with an amine-reactive dye or NHS-biotin at this stage (**Box 4**).

It is advisable to freeze an aliquot of this culture in cell-freezing medium for later confirmation of culture purity (**Box 5**).

▲ **CRITICAL STEP** Anaerobic and aerobic strains may be handled identically from this step onward.

▲ **CRITICAL STEP** Bacterial species vary enormously in size, shape and resistance to physical force. Although centrifugation speeds given in this protocol have worked for all species listed in **Table 2**, you should experimentally determine optimal speeds to give full sedimentation without excessive toxicity for all other species.

? TROUBLESHOOTING

7| Resuspend the bacteria in 1 ml of bacterial flow cytometry buffer and determine the bacterial density. For *E. coli* and *Salmonella* cultures, a 1-ml pathlength OD_{600nm} measurement of 1.0 roughly corresponds to 5 × 10⁸ bacterial CFU/ml. For other species, it will be necessary to test the relationship between CFU and OD_{600nm} values by measurement and plating. Alternatively, bacteria may be quantified by flow cytometry counting—i.e., mixing a known density of counting beads with the bacterial sample and determining the ratio of beads to bacteria in the cytometer. Optionally, it is possible to prepare large batches of frozen bacteria in aliquots for longitudinal experiments at this stage (**Box 3**).

? TROUBLESHOOTING

Box 5 | Confirmation of bacterial sample identity and purity ● TIMING 2 h plus 1–3 d culture time

A bacterial sample frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in cell-freezing buffer may be stored for several months before analysis if necessary. We recommend that you carry out one or more of the following controls to confirm that the correct species was grown and purity was maintained:

1. Resuspend the pellet at a density of 10^8 bacteria per ml in $1\times$ PBS that has been freshly filtered through a sterile $0.22\text{-}\mu\text{m}$ filter. Place $20\text{ }\mu\text{l}$ of this suspension onto a glass slide and cover it with a coverslip. Image the bacteria using $100\times$ phase-contrast light microscopy. Confirm that a single bacterial morphology is present.
2. Dilute the bacteria to 5,000 bacteria per ml in bacterial flow cytometry buffer and plate $50\text{ }\mu\text{l}$ on rich agar (e.g., Columbia agar + 5% sheep blood). Confirm that the expected number of bacteria grow and that a single colony morphology is present.
- ▲ **CRITICAL STEP** This is recommended only for easily culturable aerobes because of oxygen exposure during the preparation steps.
3. Pellet 1 ml of overnight culture by centrifugation at $8,000g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min.
4. Resuspend the pellet in $200\text{ }\mu\text{l}$ of sterile water and heat it to $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min to release chromosomal DNA.
5. Vortex the suspension and then add $1\text{ }\mu\text{l}$ as a template to a 16S PCR (standard Taq PCR mix containing 10 nmols each of primers FD1, FD2 and RC1). Prepare a second reaction with no template added and, if possible, a third reaction, which you inoculate with a single colony from the plates generated in step 2 of this box.
6. Run PCR for 35 cycles of $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, plus a final 5-min elongation step.
7. Load the entire PCR product onto a 1% (wt/vol) agarose gel. Run it at 100 mV constant voltage for 45 min.
8. Cut out bands and send them for Sanger DNA sequencing with specific primer RC1.
9. Examine the sequencing results and align the 16S sequences using NCBI Blast. Mixed sequences are a strong indication of contamination.
10. If available, analyze the bacteria using a clinical mass spectrometer. For more details, see Schulthess *et al.*³⁷.

8| (Optional) To reduce operator risk, it is possible to PFA-fix bacteria at this stage, although it should be considered that chemical modification of surface epitopes by PFA may alter antibody binding. To do so, centrifuge the culture at $4,000g$ for 2 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and resuspend it in 1 ml of freshly thawed 4% (wt/vol) PFA. Incubate the culture for 20 min at RT. Centrifuge it at $4,000g$ for 2 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and resuspend it in 1 ml of bacterial flow cytometry buffer.

9| Adjust the bacterial concentration to 5×10^6 per ml with bacterial flow cytometry buffer.
 ■ **PAUSE POINT** The bacterial suspension can be stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for up to 72 h before flow cytometry³⁷.

Preparation of antibody-containing bodily fluids ● TIMING 1 h

10| Thaw antibody-containing fluids rapidly at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an incubator or a water bath.

11| Dilute the solution to twice the desired starting concentration in bacterial flow cytometry buffer (**Table 3**). The total volume required depends on the number of assays being performed. We recommend $50\text{ }\mu\text{l}$ multiplied by the number of bacterial strains to be analyzed. Be sure to include sufficient volume for positive and negative control samples that are required for the cytometer setup.

? TROUBLESHOOTING

12| Inactivate complement and other heat-labile antimicrobials by heating the antibody solution to $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min in a water bath or a heating block.

13| Centrifuge the solution at $16,000g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to pellet all bacterial-sized particles and antibody complexes.

14| Carefully remove the supernatant and pass it through a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ syringe filter (if $>500\text{ }\mu\text{l}$ total volume) or a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ spin filter column (if $<500\text{ }\mu\text{l}$ total volume).

▲ **CRITICAL STEP** Fluids containing a high fat concentration or with a high viscosity give high background in this assay even after $0.22\text{-}\mu\text{m}$ filtration. These fluids (e.g., breast milk and fecal water) must be purified (as described in **Box 2**) before continuing.

▲ **CRITICAL STEP** For specificity testing by cross-adsorption, see **Box 1**.

? TROUBLESHOOTING

15| Make serial dilutions in bacterial flow cytometry buffer, as suggested in **Table 3**.

▲ **CRITICAL STEP** The exact scale and number of titration steps ideal for your experiment will vary depending on the experiment type, and the values given in **Table 3** should be considered as suggestions only.

PROTOCOL

TABLE 3 | Recommended titration schemes.

Sample type	Expected response strength	Suggested starting concentration	Dilution step size	Number of steps
Mouse serum	Strong IgG response (e.g., after i.v. vaccination)	≤100 µg/ml IgG	Fourfold	6–8
Mouse intestinal lavage	Strong IgA response	≤5 µg/ml IgA	Threefold	6–8
Mouse serum	Weak/endogenous response	≤1 mg/ml IgG	Threefold	6–8
Human serum (sepsis)	Strong response	≤100 µg/ml IgG ≤100 µg/ml IgA	Threefold	6–8
Human serum (unknown)	Unknown	<200 µg/ml IgG <50 µg/ml IgA	Threefold	6–8
Human fecal water	Weak response	50 µg/ml IgA	Threefold	6–8
Human breast milk	Weak response	100 µg/ml IgA	Threefold	6–8
Human serum/purified antibodies	Strong response where a single concentration should be analyzed across multiple donors	10 µg/ml IgA or IgG	NA	NA

NA, not applicable.

16 | Transfer 25 µl of the titrated antibodies to V-bottom 96-well plates.

▲ CRITICAL STEP The exact volume of antibody solution will vary with the details of the experiment. 25 µl is our suggested minimum volume.

Primary antibody incubation ● TIMING 45 min to overnight

17 | The minimum number of bacteria that can be reasonably detected in a single sample is 10^5 . We therefore suggest as a minimum to mix 25 µl of bacterial suspension at a density of 5×10^6 bacteria per ml (from Step 9) with 25 µl of antibody-containing solution (from Step 16) prepared according to **Table 3** in a 96-well V-bottom plate.

▲ CRITICAL STEP If higher numbers of bacterial targets are used, the volume of antibody-containing solution must be correspondingly increased.

18 | Incubate the samples at RT for 15 min or at 4 °C for 1 h to overnight. (These incubation times give equivalent results and can be adapted for convenience.)

Primary antibody washing ● TIMING 30 min

19 | Add 200 µl of sterile bacterial flow cytometry buffer to each well and centrifuge the plates at 4,000g for 10 min at 4 °C in a bench-top centrifuge (e.g., Eppendorf centrifuge 5810 R, A-4-81 rotor).

! CAUTION If potentially infectious material is present, seal the plates with Parafilm before centrifugation to prevent aerosol formation.

▲ CRITICAL STEP You should not see any cell pellets with 10^5 bacteria per well.

20 | Remove the supernatant by decanting.

! CAUTION Decant potentially infectious samples in a biosafety flow cabinet into a large vessel of disinfectant, not directly into the sink.

21 | Repeat Steps 19 and 20 (without actively resuspending the pellets in the bacterial flow cytometry buffer) to remove all residual antibody solution.

Secondary incubation ● TIMING 30 min to overnight

22 | Add 50 µl of secondary staining reagent, which is made up as in **Table 1**, to each well.

23 | Actively resuspend the bacteria by pipetting.

▲ CRITICAL STEP Vortexing or shaking is not recommended for this, as resuspension is poor using these methods and there is a high risk of contamination between wells.

24 | Wrap the plates in Parafilm and incubate them in the dark at RT for 15 min or at 4 °C for 1 h to overnight (with equivalent results).

Secondary antibody washing ● TIMING 30 min

25| Repeat Steps 19–21.

Tertiary reagent staining (e.g., streptavidin–fluorophore conjugates) ● TIMING 30 min to overnight

▲ **CRITICAL** The steps in this section are optional; if you are not performing them, skip to Step 29.

26| Make up the tertiary reagent solution (typically 2 µg/ml fluorophore–streptavidin in bacterial flow cytometry buffer) and add 50 µl per well. Actively resuspend the bacteria by pipetting. Incubate the mixture at RT for 30 min or at 4 °C overnight (these incubations yield identical results and can be adapted to the available time schedule).

27| Repeat Steps 19–21.

28| (Optional) If the bacteria are not already fixed, and samples must conform to biosafety level 1 for cytometry analysis, resuspend the pellet in 200 µl of 2% (wt/vol) PFA in 1× PBS, and pass through a 0.22-µm filter. Incubate the samples for 20 min at RT in the dark, and then repeat Steps 19 and 20.

Resuspension for acquisition ● TIMING 10 min per plate

29| Resuspend the samples in a minimum of 300 µl of bacterial flow cytometry buffer or 2% (wt/vol) PFA (depending on local flow cytometry recommendations) for acquisition. For acquisition on a FACSArray or another cytometer with plate-loading capacity, the stained bacteria plus buffer can be left in the 96-well plates and directly loaded into the machine. For flow cytometers without plate-loading capabilities, we recommend transferring the samples to 1.2-ml library tubes, which can be arrayed with an arrangement identical to that of the 96-well plates, thus avoiding extensive tube labeling.

Cytometer setup and acquisition ● TIMING 20 s per sample

▲ **CRITICAL** The exact setup procedure will depend on the model of flow cytometer used. The steps below are suggested for LSRII (BD) and FACS CANTO II (BD) machines. For other cytometers, we recommend contacting the local support team to establish an optimal setup for bacteria detection.

30| Using the cytometer setup described in the ‘Equipment Setup’ section, first acquire positive control single-stained samples to set photomultiplier tube (PMT) voltages and compensation matrices. It is recommended that <2,000 events per second be acquired, even on cytometers that are capable of detecting mammalian cells at five times this rate. Optionally, for longitudinal analyses, it may be beneficial to work with a fixed gating template and calibration beads. In this case, acquire calibration beads and adjust the cytometer settings so that the beads fall into the predetermined gates³⁵.

? TROUBLESHOOTING

31| Acquire all samples. For robust statistics, it is recommended that a minimum of 10,000 positively identified target events be acquired per sample. Plate-loaders should be set up to acquire this sample size, according to the manufacturer’s instructions.

? TROUBLESHOOTING

Data analysis: example workflow using FlowJo, Excel and Graphpad Prism ● TIMING 30 min per plate

▲ **CRITICAL** This could be implemented entirely in open-source frameworks by anyone who is familiar with the following tools: Flow (<https://galen.dulci.duhs.duke.edu/flow/>) or Bioconductor (<http://bioconductor.org/>), and the R project (<https://www.r-project.org>).

32| Import raw data from the flow cytometer (ideally, .fcs3 files) into FlowJo (this analysis is functional in all FlowJo versions).

Draw a gate on the main bacterial population based on Fsc/Scs. Optionally, carry out software compensation based on single-stained positive control samples, if this was not performed during acquisition³⁸.

▲ **CRITICAL STEP** Generate a layout displaying all fluorescence parameters for each sample to screen for errors in data acquisition, multiple peaks and evidence of contamination. Omitting this step may lead to misinterpretation of the data.

? TROUBLESHOOTING

33| Calculate median fluorescence intensity (MFI) for each sample and each fluorophore/isotype combination present.

▲ **CRITICAL STEP** The arithmetic mean should not be used because of the log-normal distribution of fluorescence data, as well as the presence of potentially more complex distributions (multiple peaks and so on). For purely log-normal distributions (i.e., clean log-symmetrical single peak data), the geometric mean will be identical to the median. However, as all parametric statistics are more sensitive to low numbers of outliers with very high or even negative values, we recommend using the median as a robust single value readout of fluorescence intensity.



PROTOCOL

34| Export the MFI values to Excel. If a single antibody concentration was used, this is the end result and can be statistically evaluated between groups.

▲ **CRITICAL STEP** Where multiple isotypes are quantified in parallel, statistical significance levels must be corrected for multiple testing—for example, using Bonferroni corrections or one-way ANOVA of normalized values to analyze the data.

35| If titrations were generated, rearrange the data to generate a table in which the first column contains the dilution factor and each adjacent column contains the MFI titration values for a single sample. Generate the \log_{10} values of the entire table.

36| Import these data into Graphpad Prism as an *xy* dot-plot. Inspect this plot for smooth logistic dilution curves.

? TROUBLESHOOTING

37| Use the nonlinear regression function with the least-squares method to fit a four-parameter logistic equation.

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{top} - \text{bottom}}{1 + 10^{(\log \text{EC50} - X) \times \text{Hill slope}}}$$

▲ **CRITICAL STEP** At least five points, plus a baseline, need to be present to fit with reasonable accuracy. Constrain the bottom of the curve to a single value for all samples (typically the MFI of the negative control). It may be necessary to limit the top asymptote if titrations do not reach saturation to avoid nonsensical results. Optionally, the MFI values may also be plotted against the total antibody concentration for each sample dilution, rather than the dilution factor. This is particularly important when no further analysis is planned, as differences between curves, as revealed by dilution values, may be due simply to changes in total antibody concentrations.

? TROUBLESHOOTING

38| Export the results of the curve fitting back to Excel. For each curve, you should have values for 'top', 'bottom', 'logEC50' and 'Hill slope'. The 'logEC50' is the \log_{10} of the dilution factor at the curve inflexion point.

39| Rearrange the four-parameter logistic equation to give *X* in *Y*

$$X = \text{LogEC50} - \left(\frac{\text{Log} \left(\frac{\text{top} - Y}{Y - \text{bottom}} \right)}{\text{Hill slope}} \right)$$

and use this with your above-exported parameters ('top', 'bottom', 'logEC50' and 'Hill slope') to calculate the dilution factor (*X*) giving a defined 'above-background' MFI (*Y*) for all data sets (**Fig. 5** and **Supplementary Data**). This is your titer in terms of the dilution factor. As long as '*Y*' falls within the pseudolinear range of the fitted curves, the actual value you choose to set for *Y* should not markedly affect the relative data interpretation.

40| To generate relative titers, divide the total antibody concentration (as determined by commercial sandwich ELISA following the manufacturer's instructions) by the titer in terms of dilution factor. This reveals the total antibody concentration required to give the chosen level of bacterial coating for each sample/donor. As this value is necessarily low with a high titer response—and this is often confusing to readers—the inverse of this value is usually plotted—i.e., a value in nanograms per milliliter.

? TROUBLESHOOTING

41| As an alternative, titers giving an approximate idea of the concentration of specific antibodies per milliliter can be calculated by reference to binding of a defined monoclonal antibody (**Fig. 5** and **Supplementary Data**). It should be noted that this is not quite an accurate description, as the shift in binding curve depends not only on the number but also the affinity/avidity of antibodies; however, it can be a more intuitive readout where such standards are available. Here, the value in nanograms per milliliter is calculated as follows:

$$\text{Titer} = (\text{concentration of monoclonal}) \times \frac{\text{dilution factor for MFI} = \text{N:sample}}{\text{dilution factor for MFI} = \text{N:monoclonal}}$$

? TROUBLESHOOTING

Troubleshooting advice can be found in **Table 4**.

TABLE 4 | Troubleshooting table.

Step	Problem	Possible reason	Solution
5	No bacterial growth Unexpectedly rapid bacterial growth	Stock too old/dead Inappropriate growth conditions Stock or media contaminated	Obtain fresh bacterial frozen stock Check recommended growth conditions Check culture identity (Box 5) Re-sterilize glassware. Re-prepare and sterilize culture media Obtain fresh bacterial frozen stocks
6	Poor sedimentation after centrifugation at 4000g, 2 min Sticky pellet after centrifugation	Small/buoyant bacteria Fragile bacteria may lyse if pelleted with excessive force, releasing DNA	Increase centrifugation speed and time Decrease centrifugation speed
7	Highly variable OD ₆₀₀ readings after overnight culture	Culture conditions are not constant OD ₆₀₀ readings are affected by bacterial aggregation	Check media and gas compositions. Check that incubator temperatures are constant Decrease centrifugation speeds to avoid bacterial lysis. Try disrupting aggregates by physical force, or consider counting by flow cytometry
11	Extensive precipitates and very high viscosity in antibody-containing body fluids Insufficient antibody to follow recommended concentrations in Table 3	Cell debris or lipids are present in the fluid NA	If this is hard to clear by centrifugation and filtration, consider antibody purification before analysis (Box 2) Use undiluted samples with minimum numbers of bacterial targets to maximize the chance of observing a specific signal
14	Frequent blockage of 0.22-μm syringe filters during antibody-containing fluid preparation	Large quantities of cell debris or precipitated biomolecules in solutions	Increase the length of the 16,000g centrifugation step before filtration Use larger-volume 0.22-μm filters Consider antibody purification (Box 2)
30	High event numbers in the cytometer when running 0.22-μm-filtered water or PBS	Contamination in cytometer tubing or sheath fluid	Thoroughly clean the cytometer with bleach- and detergent-containing solutions. Pass the in-house-produced sheath fluid through a 0.22-μm filter If this does not solve the issue, the flow cell may be damaged. Ideally, this should be replaced. However, an alternative solution is to chemo-fluorescently label the bacterial targets (Box 4) to permit specific gating
30 and 31	Zero events in the flow cytometer	Incorrect cytometer settings Cytometer blocked or malfunctioning	Ensure that threshold values are not set too high, resulting in exclusion of all bacteria-sized events Check for normal detection of setup beads. Clean the machine to remove blockages. If this fails, contact the manufacturer's support engineers
30 and 31	No bacteria observable in the cytometer	Insufficient cells Centrifugation failure Incorrect cytometer settings	Check the relationship between the OD _{600nm} and CFU values Include one well with a high CFU number to check that centrifugation has pelleted cells Obtain a fluorescently labeled bacterial sample (e.g., brightly GFP-positive <i>E. coli</i> , or chemically stained cells) at reasonably high density (e.g., 5 × 10 ⁷ per ml). Alter the cytometer settings until the population is visible

(continued)

PROTOCOL

TABLE 4 | Troubleshooting table (continued).

Step	Problem	Possible reason	Solution
30 and 31	Very low fluorescence signal in positive control sample	Incorrect bacterial strain or growth conditions	Streak out the bacterial culture and pick a single colony. Confirm the species by biochemistry and genetics (Box 5)
		Too many CFUs per well	Recheck the relationship between the OD _{600nm} and CFU/ml values. Correct these such that only 10 ⁵ bacteria are loaded per well
30 and 31	High background in negative control	Fc- or nonspecific binding	Check the binding of isotype controls. Test closely related strains to identify one without Fc binding activity
		Antibody complex contamination	Ensure that all antibody solutions are filtered through 0.22- μ m filters before adding them to the bacterial targets
30–32	Multiple peaks	Phenotypic variation or stochastic gene expression in targets Inefficient detection by cytometer (typically second peaks appear on the axes) Contamination	Alter the culture conditions or try to work with phase-locked variants, if genetically accessible Decrease the acquisition rate See Box 5 . Obtain fresh bacterial stocks, culture media and sterile culture vessels
36	'Bell-shaped' dilution curves when MFI is plotted against dilution factor	Toxicity and/or massive agglutination at very high antibody concentrations	Exclude all values with high total antibody concentrations to permit a curve fit. As efficient agglutination is what antibodies 'do' at high concentrations, this is unavoidable. Consider repeating the measurements with lower starting antibody concentrations
37	Poor r^2 value for curve fitting, or unable to fit four-parameter logistic equation	No antibody binding detected Sample contamination Bell-shaped curve	As you cannot fit a four-parameter logistic curve to a flat horizontal line, the titer for samples displaying no binding must be set to the detection limit (typically, the inverse undiluted antibody concentration). For samples showing some positive binding, this may be indicative of some kind of interference in the samples. Examine scatter plots in FlowJo for evidence of multiple peaks. See TROUBLESHOOTING for multiple peaks (Steps 30–31) or see TROUBLESHOOTING for bell-shaped dilution curves (Step 37)
40	No mathematical solution for relative titer calculations	Top of the curve does not reach the chosen y-axis value	Check that your chosen y-axis value is reasonable (i.e., falls in the pseudolinear part of the curve for the positive control samples). If this is OK, then samples that do not reach this value have a titer at the detection limit
Box 4	Multiple peaks after chemical labeling	Insufficient mixing after dye addition	Repeat chemical labeling with gentle vortexing

NA, not applicable.

● TIMING

Steps 1–9, preparation of bacterial targets: 2–7 d, depending on bacterial growth characteristics

Steps 10–16, preparation of antibody-containing bodily fluids: 1 h

Steps 17 and 18, primary antibody incubation: 45 min to overnight

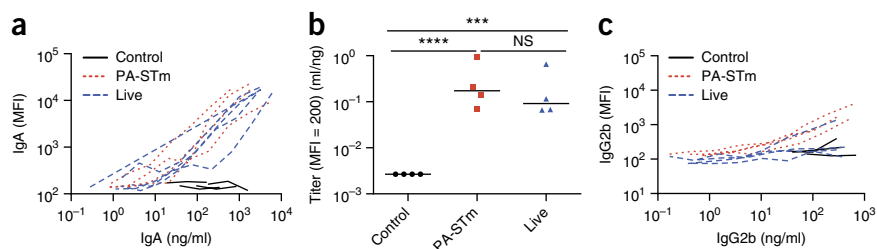
Steps 19–21, primary antibody washing: 30 min

Steps 22–24, secondary incubation: 30 min to overnight

Step 25, secondary antibody washing: 30 min

Steps 26–28, (optional) tertiary reagent staining: 30 min to overnight

Figure 12 | Vaccination with oral peracetic-acid-inactivated *S. typhimurium* and infection with live-attenuated *S. typhimurium* induce a similar magnitude of intestinal IgA response. (a–c) C57BL/6 specific opportunistic pathogen-free (SOPF) mice were either pretreated with 1.0 g/kg streptomycin and 1 d later infected orally with 5×10^7 CFU of the oral vaccination *S. typhimurium* strain M556 (SB300 Δ seD; ‘live’) or were gavaged once a week with 10^{10} particles of peracetic-acid-killed *S. typhimurium* (‘PA-STm’) over 3 weeks. (a) Intestinal lavage IgA titer curves and (b) intestinal lavage IgA titers, as calculated in Figure 11d,e (Kruskal–Wallis test on log-normalized values, P value < 0.0001. Pairwise comparisons calculated by Dunn’s post-tests). Lines indicate medians. (c) Serum IgG2b titer curves at day 21 after the first vaccination/infection, as determined by bacterial flow cytometry. $n = 4$ per group. All animal experiments were approved by the legal authorities (licenses 223/2010 and 222/2013, Kantonales Veterinäramt Zürich, Switzerland) and performed according to the applicable legal and ethical requirements. Image adapted with permission from Moor *et al.*²².



Step 29, resuspension for acquisition: 10 min per plate
Steps 30 and 31, Cytometer setup and acquisition:
20 s per sample

Steps 32–41, data analysis: 30 min per plate

Box 1, cross-adsorption for specificity testing: 1.5 h

Box 2, purification of IgA from viscous or fatty samples:
30 min–1 h

Box 3, cryo-preserving and thawing aliquots of bacterial targets: culture time (1–3 d) + 30 min

Box 4, use of an amine-reactive dye or NHS-biotin labeling for target identification and multiplexing: 20 min (amine-reactive dyes), 2 h (surface biotinylation)

Box 5, confirmation of bacterial sample identity and purity:
2 h plus culture time (1–3 d)

ANTICIPATED RESULTS

If this protocol is carefully followed, clean data on species-specific antibodies can be generated in

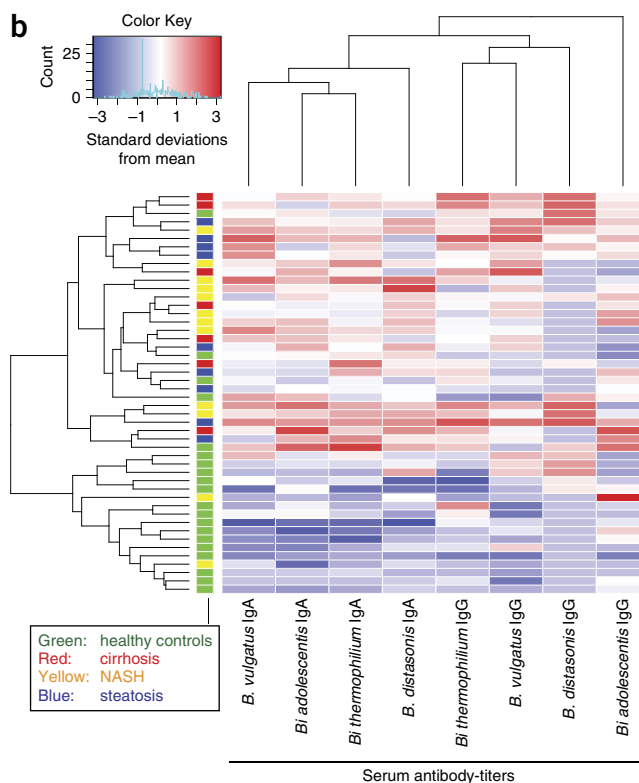
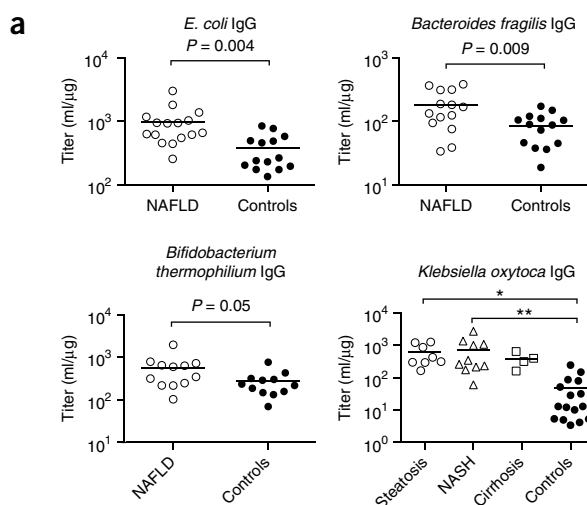


Figure 13 | Bacterial flow cytometry reveals increased microbiota-specific serum antibodies in metabolic liver disease. (a) Serum IgG titers against the indicated bacteria in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients (open symbols) compared with age- and sex-matched healthy controls (filled dots). Pure cultures of the indicated bacteria were stained with dose titrations of serum from patients or controls. Serum antibody coating of bacteria was visualized using monoclonal DyLight 647-conjugated anti-human IgG and quantified per bacterium by flow cytometry. Resulting MFI was plotted against total IgG added to the assay, as determined by ELISA and IgG titers calculated by fitting four-parameter logistic curves to each donor and determining the concentration of IgG required to obtain a median fluorescence intensity binding of 80. The inverse of this IgG concentration is shown, for ease of interpretation. Each point represents an individual subject and lines show means. Unpaired t -test or one-way ANOVA and Tukey’s post-test were used to compare the groups; $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$. (b) Cluster-analysis from Basel NAFLD patients with different stages of liver disease (steatosis = blue, nonalcoholic steatohepatitis (NASH) = yellow and cirrhosis = red) and age- and sex-matched healthy controls (green). Heatmaps were generated using a euclidean distance function with complete linkage clustering in the statistical package R using the package ‘gplots version 2.8.0’, function ‘heatmap.2’. Red indicates increased and blue indicates decreased titers as compared with the mean of the entire population. From Balmer, M.L. *et al.* The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci. Transl. Med.* **6**, 237–266 (2014). Adapted with permission from the American Association for the Advancement of Science.



a wide range of situations. The technique has been successfully used in a range of publications both in murine model systems and in the human system^{1–6}.

In the first published example, taken from Moor *et al.*²², C57BL/6 specific pathogen-free (SPF) mice either received three oral doses of 10¹⁰ peracetic-acid-inactivated *S. typhimurium* over 3 weeks or were orally infected with a live-attenuated *S. typhimurium* vaccination strain. 3 weeks after the initiation of vaccination, the intestinal IgA response was quantified from intestinal lavages (Fig. 12a,b), and serum IgG2b (Fig. 12c); IgG1 and IgM were quantified from serum (data not shown). This demonstrates the effective induction of a mucosal IgA response by the inactivated and live oral vaccines, with minimal induction of serum IgG at these time points. The data analysis leading from the raw data in Figure 12a to the analyzed data in Figure 12b is described in detail in the Supplementary Data.

In the second published example, taken from Balmer *et al.*⁶, bacterial flow cytometry was used to quantify serum antibody responses against a panel of anaerobic intestinal microbiota species in patients with varying stages of metabolic liver disease and healthy donors. Relative titers were calculated for each sample/species combination (Fig. 13a), and the final large data set was analyzed by hierarchical clustering (Fig. 13b). In this example, we demonstrated elevated microbiota-directed serum IgG responses in patients with metabolic liver diseases, independent of disease stage. This suggested that increased immune exposure to the intestinal microbiota is an early event in the progression of metabolic diseases.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS We acknowledge J. Doré and C. Juste (Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR1319 Micalis, Jouy en Josas, France) for access to well-characterized bacterial strains, and C. Parizot and D. Gouas for technical help during initial experimental setup. The authors also acknowledge the following funders: M.L. was supported by the Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Agence Nationale de la Recherche (MetAntibody, ANR-14-CE14-0013) and Fondation pour l'Aide à la Recherche sur la Sclérose En Plaques (ARSEP). E.S. was supported by an SNF Ambizione fellowship (PZ00P3_136742) and an ETH research grant (ETH-33 12-2).

AUTHOR CONTRIBUTIONS K.M., J.F., A.T. and D.S. generated the data shown in Figures 1–11. M.L.B. generated the data shown in Figure 13. A.J.M. provided support during the development of the method and reviewed the manuscript. G.G. provided support for adaptation of the method to clinical scenarios and reviewed the manuscript. M.L. further developed the method for application to human research, generated data shown in Figures 1–11 and wrote the manuscript. E.S. established the methodology and analysis protocols, generated data shown in Figures 1–12 and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Slack, E. *et al.* Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* **325**, 617–620 (2009).
- Endt, K. *et al.* The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal *Salmonella* diarrhea. *PLoS Pathog.* **6**, e1001097 (2010).
- Hapfelmeier, S. *et al.* Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* **328**, 1705–1709 (2010).
- Haas, A. *et al.* Systemic antibody responses to gut commensal bacteria during chronic HIV-1 infection. *Gut* **60**, 1506–1519 (2011).
- Seleznik, G.M. *et al.* Lymphotoxin β receptor signaling promotes development of autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology* **143**, 1361–1374 (2012).
- Balmer, M.L. *et al.* The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci. Transl. Med.* **6**, 237–266 (2014).
- Brown, J.S. *et al.* The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16969–16974 (2002).
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K. & Brown, J.S. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect. Immun.* **78**, 704–715 (2010).
- Cohen, J.M., Wilson, R., Shah, P., Baxendale, H.E. & Brown, J.S. Lack of cross-protection against invasive pneumonia caused by heterologous strains following murine *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonisation despite whole cell ELISAs showing significant cross-reactive IgG. *Vaccine* **31**, 2328–2332 (2013).
- LeibundGut-Landmann, S. *et al.* Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* **8**, 630–638 (2007).
- MacLennan, C.A. Antibodies and protection against invasive *Salmonella* disease. *Front. Immunol.* **5**, 635 (2014).
- Slack, E., Balmer, M.L. & Macpherson, A.J.B. Cells as a critical node in the microbiota-host immune system network. *Immunol. Rev.* **260**, 50–66 (2014).
- Lécuyer, E. *et al.* Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity* **40**, 608–620 (2014).
- Porsch-Özcürümez, M. *et al.* Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 1008–1015 (2004).
- Macpherson, A.J. & Uhr, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* **303**, 1662–1665 (2004).
- Karlsson, M., Mollegard, I., Stiernstedt, G. & Wretling, B. Comparison of western blot and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Lyme borreliosis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**, 871–877 (1989).
- Yutin, N., Puigbo, P., Koonin, E.V. & Wolf, Y.I. Phylogenomics of prokaryotic ribosomal proteins. *PLoS One* **7**, e36972 (2012).
- Cooper, M.D., Wannemuehler, M.J., Miller, R.D. & Fedyk, M.F. Role of outer envelope contamination in protection elicited by ribosomal preparations against *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Infect. Immun.* **32**, 173–179 (1981).
- Smith, K., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* **19**, 59–69 (2007).
- Macpherson, A.J. & McCoy, K.D. Stratification and compartmentalisation of immunoglobulin responses to commensal intestinal microbes. *Semin. Immunol.* **25**, 358–363 (2013).
- Bunker, J.J. *et al.* Innate and adaptive humoral responses coat distinct commensal bacteria with immunoglobulin A. *Immunity* **43**, 541–553 (2015).
- Moor, K. *et al.* Peracetic acid treatment generates potent inactivated oral vaccines from a broad range of culturable bacterial species. *Front. Immunol.* **7**, 34 (2016).



23. Palm, N.W. *et al.* Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* **158**, 1000–1010 (2014).
24. Cullender, T.C. *et al.* Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut. *Cell Host Microbe* **14**, 571–581 (2013).
25. Bouvet, J.P. Immunoglobulin Fab fragment-binding proteins. *Int. J. Immunopharmacol.* **16**, 419–424 (1994).
26. Tashiro, M. & Montelione, G.T. Structures of bacterial immunoglobulin-binding domains and their complexes with immunoglobulins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 471–481 (1995).
27. Chimalapati, S. *et al.* Infection with conditionally virulent *Streptococcus pneumoniae* Δ pab strains induces antibody to conserved protein antigens but does not protect against systemic infection with heterologous strains. *Infect. Immun.* **79**, 4965–4976 (2011).
28. Avraham, R. *et al.* Pathogen cell-to-cell variability drives heterogeneity in host immune responses. *Cell* **162**, 1309–1321 (2015).
29. van der Woude, M.W. Phase variation: how to create and coordinate population diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 205–211 (2011).
30. Mouslim, C. & Hughes, K.T. The effect of cell growth phase on the regulatory cross-talk between flagellar and Spi1 virulence gene expression. *PLoS Pathog.* **10**, e1003987 (2014).
31. Goodman, A.L. *et al.* Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 6252–6257 (2011).
32. Saletti, G., Çuburu, N., Yang, J.S., Dey, A. & Czerkinsky, C. Enzyme-linked immunospot assays for direct *ex vivo* measurement of vaccine-induced human humoral immune responses in blood. *Nat. Protoc.* **8**, 1073–1087 (2013).
33. Liu, B. *et al.* Structural diversity in Salmonella O antigens and its genetic basis. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 56–89 (2014).
34. Pack, T.D. Purification of human IgA. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 2 Unit 2.10B (doi: 10.1002/0471142735) (2001).
35. Koch, C., Günther, S., Desta, A.F., Hübschmann, T. & Müller, S. Cytometric fingerprinting for analyzing microbial intracommunity structure variation and identifying subcommunity function. *Nat. Protoc.* **8**, 190–202 (2013).
36. Speers, A.M., Cologgi, D.L. & Reguera, G. (*Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, 2005).
37. Schulthess, B., Bloemberg, G.V., Zbinden, R., Böttger, E.C. & Hombach, M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1089–1097 (2014).
38. Szaloki, G. & Goda, K. Compensation in multicolor flow cytometry. *Cytom. A* **87**, 982–985 (2015).

Le deuxième article traite de la problématique principale de ce travail. Pour comprendre l'impact de l'IgA sur la symbiose hôte/microbiote chez l'homme, nous avons réalisé une étude cas-témoins, en comparant 34 témoins sains à 36 patients (n=21 déficit en IgA sélectif, n=15 DICV avec déficit complet en IgA). Les critères d'exclusion pour le séquençage étaient la prise d'antibiothérapie et/ou de laxatifs dans les trois mois précédant les prélèvements (ainsi 4 patients DIgA et 8 patients DICV ont été exclus de cette analyse). Par conséquent, le métagénome bactérien de n=34 donneurs sains, n=17 patients DIgA, et n=7 patients DICV a été analysé par séquençage haut débit (SOLiD).

L'analyse et la comparaison du microbiote intestinal des deux groupes retrouve une composition globale similaire en termes de répartition des phyla dominants, de diversité bactérienne, de richesse bactérienne et de richesse génique bactérienne. De plus, la majorité des espèces (n=1772) sont partagées par les deux groupes, seules n=24 espèces sont exclusives des patients, et n=79 sont exclusives des témoins.

Nous avons ensuite identifié une fraction restreinte du microbiote ciblée par les IgA chez les donneurs sains. Les fractions IgA+ et IgA- de n=30 donneurs sains ont été triées (tri magnétique), séquencées par SOLiD, et analysées comparativement, permettant de mettre en évidence n=30 espèces métagénomiques préférentiellement ciblées par les IgA (espèces IgA+). D'autre part, le même type d'analyse a permis d'identifier 34 espèces différentielles entre les patients et les témoins, n=20 sont sur-représentées chez les patients alors que n=14 sont sous-représentées. Parmi les espèces IgA+, deux sont retrouvées différentiellement représentées chez les patients : *Escherichia coli* qui est sur-représentée et *Coprococcus comes* qui est sous-représentée chez les patients. Ainsi, l'absence d'IgA s'associe à la fois à l'augmentation et à la diminution de certaines espèces habituellement ciblées par l'IgA, suggérant que les IgA contrôlent et protègent à la fois. Par ailleurs, les espèces déplétées dans

le dIgA appartiennent à des familles restreintes et présentent des propriétés anti-inflammatoires alors que les bactéries en expansion sont de familles diverses dont certaines sont des pathobiontes (Gamma-protéobactéries, Prevotella).

En l'absence d'IgA sécrétoire, nous observons la présence d'IgM sécrétoire qui opsonise elle aussi une fraction restreinte du microbiote. Les fractions IgM+ et IgM- de n=10 patients DIgA ont été triées par cytométrie en flux et identifiées par pyroséquençage des gènes codant pour l'ARNr 16s (nombre de bactéries dans la fraction IgM+ insuffisant pour réaliser une analyse métagénomique). L'analyse est moins résolutive que le séquençage métagénomique mais révèle que (i) les genres opsonisés par l'IgM sont très variables d'un individu à l'autre, (ii) qu'il existe néanmoins une tendance inter-individuelle à l'opsonisation des genres *Pseudomonas* et *Clostridium* et (iii) qu'en conséquence, les réponses IgM ne sont pas parfaitement semblables aux réponses IgA chez les donneurs sains et ne semblent notamment pas opsoniser les *Enterobacteriaceae*. En revanche, le taux d'opsonisation par l'IgM est statistiquement corrélé à l'index de diversité bactérienne au sein du phylum *Actinobacteries*, suggérant que la présence d'IgM maintient la diversité au sein de ce phylum. Cette observation est renforcée par le fait qu'*in vitro*, l'IgM opsonise mieux les bifidobactéries que l'IgA (les bifidobactéries sont des représentantes du phylum *Actinobacteries*) et qu'en l'absence d'IgM sécrétoire, comme c'est le cas des patients DICV, on observe une diminution drastique de la diversité au sein de ce phylum.

L'analyse phénotypique lymphocytaire circulante retrouve un biais du contingent lymphocytaire T circulant vers le phénotype TH17 (CD4+ sécréteurs d'IL-17 et d'IL-22, associée à une élévation de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL17 circulantes) associée à une augmentation des lymphocytes T-PD-1+ circulants sans anomalie du compartiment T-

régulateur. De plus, on observe une augmentation du CD14 soluble circulant chez les patients, reflet d'une translocation bactérienne (Bactéries Gram négatif).

Enfin, grâce à l'analyse de 45 liens d'inter-dépendance entre espèces bactériennes retrouvés systématiquement chez les témoins, on met en évidence une perte de quelques liens dans le déficit en IgA, pouvant refléter l'altération de l'architecture "fondamentale" obligatoire présente dans le microbiote normal, comme l'ont décrit *Nielsen et al.* (9)

Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency

Authors: J. Fadlallah^{1,2+}, H. El-Kafsi^{1,2+}, D. Sterlin^{1,2}, C. Juste³, C. Parizot², K. Dorgham¹, G. Autaa¹, D. Gouas^{1,2}, M. Almeida⁴, P. Lepage³, N. Pons⁵, E. Lechatellier^{3,5}, F. Levenez⁵, L. Galicier⁶, D. Boutboul⁶, A. Mathian², M. Miyara², E. Oksenhendler⁶, Z. Amoura^{1,2}, J. Doré³, C. Fieschi⁶, S. D. Ehrlich^{3,5}, M. Larsen^{1,2,+}, G. Gorochov^{1,2,+}

Affiliations:

1 Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 6, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI Paris UMRS 1135), 75013, Paris, France.

2 AP-HP, Groupement Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Département d'Immunologie, 75013, Paris, France.

3 UMR1319 Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France.

4 Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland, Paint Branch Road, College Park, MD 20742, USA.

5 INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, US1367 MetaGenoPolis, 78350 Jouy en Josas, France.

6 Université Paris Diderot Paris 7, Department of Clinical Immunology, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), EA3518, 75010, Paris, France

+ These authors contributed equally to this work

Abstract

IgA, one of the most common antibodies, is still chiefly viewed as a neutralising factor, excluding potentially harmful microbes and toxins, preventing them to cross mucosal barriers. Paradoxically, loss of such an expected crucial immune check-point is not irrevocably leading to lethal infections in humans, but is rather associated with relatively mild respiratory infections, atopy and autoimmunity. We therefore postulated that IgA might play covert roles, not primarily associated with pest control. In order to get insights into the specific contributions of IgA to host/microbial symbiosis, we explored patients that lack IgA, but not any other antibody isotype. Contrary to what was observed in murine models of IgA deficiency, we show that human IgA deficiency is not associated with massive quantitative perturbations of gut microbial ecology. Metagenomic analysis rather highlights an expected pathobiont expansion, and a less expected depletion in some typically beneficial symbionts. Gut colonisation by species usually present in the oropharynx is also reminiscent of an unexpected spatial microbiota disorganisation. We show that IgM only partially supply IgA deficiency, as not all typical IgA targets can also be opsonized by IgM. Altogether our results highlight almost antinomic roles for IgA, ranging from pathobiont control and regulated systemic inflammation, to preservation of commensal diversity and community networks.

1-Introduction

Eukaryotes have developed spectacular ways not only to protect themselves from pathogens, but also to benefit from unique and essential features of surrounding organisms (symbionts). Mammals are indeed highly dependent on their consortia of symbionts (microbiota) that serve both to optimize processing of nutrients and to protect from opportunistic agents by competition. Innate immune mechanisms controlling host-microbiota mutualism are physically localized, activated by bacterial contact culminating into breach of the gut mucosal firewall. Immediate non-specific host responses involve the secretion of defensins and the intra-luminal recruitment of innate immune cells such as neutrophils that encapsulate commensals and limit their contact with surrounding gut epithelium (153). Such a potent response comes with a fitness cost to the commensal community and the benefits this brings to the host. It is therefore postulated that an evolutionary pressure took place to acquire mechanisms acting in the lumen, which would regulate microbial communities, thereby reducing the frequency of breaching the gut barrier and activation of innate immunity. This role could be played by antibodies, and most likely by secretory IgA (3, 94). However, whereas antibody responses to pathogens have been intensively studied, much less interest has been devoted to the study of antibody relations with symbionts. Murine models of IgA deficiency have been studied and display striking modifications of the microbiome-immune interface. In such models, IgA deficiency was obtained by inducing either: (i) defects in IgA class switch recombination (CSR) (AID^{-/-} mice (107, 108) and Ca switch regulation region knock out (106)), or (ii) defects in IgA transport into the gut lumen (pIgR^{-/-} mice (109, 110), and J-chain^{-/-} mice (111)), or (iii) reduction of IgA repertoire diversity without altering IgA levels. (AID knock in mutation (112), PD1^{-/-} mice (85), FoxP3⁺CD4⁺ depleted mice (86)). Models impairing CSR mechanisms (i) are associated with a gut dysbiosis defined by an expansion of anaerobes, predominantly SFB and Clostridiales, even in the upper part of the

small intestine, as well as nodular hyperplasia secondary to hyper-activation of germinal center B cells induced by microbial antigens (107, 108). Models impairing IgA secretion (ii) into the gut lumen were associated with altered microbiota composition, increased susceptibility to induced colitis, higher bacterial translocation to mesenteric lymph nodes after *Salmonella typhimurium* challenge, and lack of protective immunity against cholera toxin (109, 110). The phenotypes associated with reduced IgA repertoire diversity (iii) are more heterogeneous, depending on the model used (85, 86, 112). Altogether, altered microbiome composition, increased susceptibility to microbial translocation, reduced microbial diversity and reduced microbial fitness are shared features of IgA deficiency models.

These results are in line with an early conception of IgA function, mainly presented as a neutralising antibody, whose role would mainly be to exclude potentially harmful microbes and toxins, preventing them to cross mucosal barriers (102). IgA should therefore represent a key component of the immune system whose presence would be required in sepsis. We know, however, that IgA deficiency is relatively common in human adults, occurring in about 1 in 500 caucasian individuals (118, 119), and that this condition is described as asymptomatic unless associated with defects in other antibody isotypes, particularly IgG2 (116). To explain the mild phenotype observed in patients with so called selective IgA deficiency (SIgAd, i.e.: patients lacking IgA, but not any other antibody isotype), it is proposed that IgM can effectively replace IgA as the predominant antibody in secretions (154, 155). But if IgA indeed represents a merely redundant component of the immune system, it appears paradoxical that it was so well conserved in evolution, and that it is massively produced at the individual level (about 66mg/kg/day of IgA are secreted everyday (156)). In fact, a more careful study of SIgAd patients reveal that they suffer a higher incidence of respiratory infections, atopy and autoimmunity (124, 130), and when taking all complications into account, in case-controls studies, more than 80% of the patients are symptomatic (120).

Indeed, IgA also appear to orchestrate the beneficial tolerance established between the host and its gut commensal microbiome. These mutualistic host-microbial relationships were emphasized in animal models with an immune system reduced to a single monoclonal antibody of known bacterial specificity challenged by a limited microbial diversity. It was thus shown that while antibody binding was reducing bacterial fitness, it also resulted in reduced bacterial production of proinflammatory signals, hence allowing bacterial tolerance by the host (103). Bacteria were also shown to adapt to flagellin-specific antibodies by down-modulation of flagellin transcription (104). While these models have provided important examples and possible mechanisms through which antibodies can imprint specific microbes, the targets of polyclonal IgA and their global impact on the microbiome remain poorly defined. Although it was recently shown in an animal model that IgA-coated bacteria include pro-inflammatory elements (51), it is not known whether IgA preferentially bind potentially harmful bacteria, and/or commensals (157). It is not known either whether IgM can indeed replace IgA at no expense to host/bacterial homeostasis. Finally, the relations between SIgAd and systemic autoimmunity are not well understood.

Here we studied the composition of SIgA-bound gut microbiota in healthy individuals and evaluate alterations of this bacterial consortium in IgA deficient patients. In order to get insights on the specific contributions of IgA on host/microbial symbiosis we also explored systemic immune responses in these patients.

2- Results

1/ Patients lacking circulating IgA-producing B cells and seric IgA also lack digestive IgA

Selective IgA deficiency (SIgAd) represents a bio-clinical entity that is defined by serologic means, namely undetectable seric IgA titles ($<0.07\text{mg/mL}$) with normal IgG levels (115). The clinical spectrum of digestive SIgAd-associated symptoms varies from very mild to severe and it remains unknown whether residual digestive IgA would account for pauci-symptomatic presentations. We serologically confirmed a status of IgA deficiency in 21 patients that could be included in this study because, among other exclusion criteria, they did not receive antibiotic treatment 3 months prior to inclusion. Compared to age- and sex-matched healthy donors (HD, $n=34$), these patients with selective IgA deficiency (SIgAd) had undetectable seric and scarce digestive IgA levels (Supplementary Fig S1, $43[0-206]$ in HD vs $0[0-21]$ μg of free IgA/g of stool in SIgAd, $p<0.0001$, Figure 1A respectively), while their seric IgG levels were preserved (Supplementary Fig S1). Circulating IgA⁺ B cells were undetectable in all patients except one ($0.1[0-1.3]\%$ in SIgAd vs $7.1[2.4-14.4]\%$ in HD $p<0.0001$), whereas proportion of CD19⁺IgG⁺ cells among B cells were similar in both groups ($12.55[5.32-29.6]\%$ vs $13.1[0.793-37.6]\%$, $p=0.8004$, Figure 1B). Compared to controls, SIgAd patients are also characterized by a depletion of CD19⁺CD27⁺IgD⁻ switched memory B cells among total CD19⁺ B cells ($20[5.17-34.1]\%$ vs $14.9[3.3-38.1]\%$, $p=0.0328$, Figure 1C). These data show that secretory IgA deficiency is a consistent feature of SIgAd.

2/ Gut microbiome repertoire shift in IgA deficient patients

In order to study the global impact of digestive IgA deficiency on the gut microbiome we performed shotgun sequencing (13, 42) of fecal samples in 34 HD and 17 SIgAd patients. High quality reads from each sample were mapped to a reference catalogue of 3.9 million genes (9). Taxonomic abundances were computed at the level of co-abundance gene groups

(CAGs), and subsequently binned at broader taxonomic levels (genus, family, order, class and phylum). CAGs contain at least 50 different genes. Metagenomic species (MGS) are defined as larger CAGs with very high connectivity and a defined minimal size of at least 700 genes. This approach to study microbiome composition presents the advantage to overcome the limited resolution of previous methods used for metagenomic or 16s amplicon data analysis that rely on comparisons to reference genomes, offering the possibility to comprehensively profile the diversity of a clinical sample, and to potentially identify previously uncharacterized microbes (9).

Metagenomic analysis revealed a similar representation of the dominant phyla in the two groups (HD vs SIgAd, Bacteroidetes: 44.19% vs 50.92%, $p=0.47$, Firmicutes: 33.39% vs 31.15%, $p=0.88$, Proteobacteria: 1.21% vs 1.36%, $p=0.99$, Actinobacteria: 0.32% vs 0.35%, $p=0.99$ and unknown phyla: 20.35% vs 15.56%, $p=0.45$, Figure 1D). Microbiota diversity was not different between the two groups, either when including all the CAGs regardless of their phylum (median Shannon index, HD vs SIgAd: 0.59[0.39-0.71] vs 0.59[0.43-0.67], $p=0.6562$), or when comparing CAG diversity within each phylum (HD vs SIgAd, 0.55[0.4-0.68] vs 0.57[0.31-0.72], $p=0.1324$ for Bacteroidetes, 0.68[0.54-0.76] vs 0.66[0.51-0.72], $p=0.5556$ for Firmicutes, 0.55[0.38-0.66] vs 0.53[0.17-0.68], $p=0.7416$ for Actinobacteria, 0.48[0.05-0.62] vs 0.48[0.28-0.54], $p=0.8183$ for Proteobacteria, 0.44[0.08-0.62] vs 0.44[0.21-0.58], $p=0.8651$ for unknown phyla, Figure 1E). Furthermore, no significant difference was observed in terms of CAG richness between the two groups (400 [215-694] different CAG detected in healthy donors, vs 393 [160-641] in patients, $p=0.4251$, Figure 1F), nor in gene count (395841 [236166-636394] genes in healthy donors vs 379482[248232-514298], $p=0.4167$, Figure 1G). More precisely, we found that 1772 CAGs were shared by both groups, whereas 24 CAGs were found in IgA deficiency group only (in at least one

patient) and 79 CAGs were found in healthy donors groups only (in at least one healthy donor).

Contrary to what was observed in murine models of IgA deficiency (*107, 108*), these data reveal that human IgA deficiency is not associated with massive perturbations of gut microbial ecology. However, we observed that not all CAGs detected in controls are also found in patients and conversely. Altogether, SIgAd and control bacterial repertoires are similarly diverse, but not entirely overlapping.

3/ IgA targets a restricted fraction of the healthy fecal microbiota

We reasoned that IgA deficiency might affect relatively discrete bacterial populations, without impacting global microbiome structure at the analysis level applied above. In order to increase the resolution of our analysis, we therefore decided to focus on bacteria preferentially targeted by IgA in controls, as potential perturbed candidates in patients. A flow-cytometry assay was elaborated, derived from a previously published technology (*152*). The protocol was modified to assess the type and levels of mucosal antibodies targeting colonic microbiota in vivo (Figure 2A). IgA, as the main mucosal antibody in healthy donors opsonizes a median percentage of 7.6 [0.8-17.6]% of the whole fecal microbiota (Figure 2A). In preliminary experiments we verified that metagenomic analysis could reliably be performed on sorted bacterial subsets with a determined lowest analyzable sample size of 10^8 bacteria (*158*). This lower limit fitted with most available human samples included in our study. IgA⁺ fractions were enriched by magnetic sorting in 30 healthy controls, allowing IgA⁺ and IgA⁻ fractions sequencing and differential metagenomic analysis (Figure 2B). Gene biomarker identification approach (*159*) allowed the identification of 30 different CAGs overrepresented in the IgA⁺ fraction of healthy controls ranked by increasing statistical significance at the lowest taxonomic level available (Figure 2C, Supplementary figure S2a). Most differential CAGs (25 out of 30), represented collections of at least 700 genes, and thus correspond to metagenomic

species (MGS), as previously described by Nielsen *et al* (9). So-called “small CAGs”, corresponding to entities possessing less than 700 genes, were also considered in this analysis for two reasons. First of all, most differential “small CAGs” could be taxonomically annotated (Supplementary Table 1). Second, even if most complete bacterial genomes contain > 700 genes (9), gene loss phenomenon is well described (160). The presence of “small CAGs” taxonomically annotated as bacteria could thus be explained by bacterial adaptation to the rich environment of the gut.

Among these 30 CAGs, 23 belong to the Firmicutes phylum (among which 14 belong to the Clostridia class, one of these 14 belonging to the *Faecalibacterium* genus), 3 are bacteria from unclassified phylum, 2 are Proteobacteria (two distinct species of *Escherichia coli*), 1 belong to the Actinobacteria phylum (*Bifidobacterium bifidum*) and the remaining identified CAGs belong to the Bacteroidetes phylum (Supplementary Figure S2c+ Supplementary Table 1).

These IgA+ CAGs varied greatly in terms of abundance and representation across the 30 individuals tested, some being relatively abundant and detected in all individuals, such as *Dorea longicatena*, *Anaerostipes hadrus*, *Ruminococcus torques*, *Intestinibacter bartletti* (CAG 1329), as well as two unknown CAG, one belonging to the Firmicutes phylum (CAG 103) and the other one to the *Dorea* genus (CAG 73). *Coprococcus comes* was also relatively abundant as well as preferentially detected in the IgA+ fraction of 33 individuals out of 34 (Figure 2D). Other CAGs, typically over-represented among IgA+ bacteria, were neither abundant, nor present in all subjects studied. An example of the latter is unclassified CAG 1128. CAG 1128 is the most preferentially IgA-targeted (Figure 2C) while it is present at a median frequency of 0[0-1.10⁻³] (Figure 2D). Conversely, various taxa (Fig. S2a, top of the list) are very poorly opsonized, and there are examples of abundant bacteria, such as *E.*

Rectale (CAG 36), very predominantly found in the IgA- fraction. Thus, CAG representation among the IgA+ fraction is not linked to overall CAG abundance.

4/ Gut microbiota signatures of IgA deficiency

We then wanted to determine which bacteria were statistically expanded or depleted in IgA deficiency, and to link these results to the IgA+ CAGs found above. The same gene biomarker approach (159) was used for this analysis, comparing the whole unsorted microbiota of 34 healthy donors with 17 SIgAd patients. We found 33 differential CAGs between the two groups, 19 being over-represented, whereas 14 were under-represented in IgA deficient patients (Figure 2E). CAGs were ranked by increasing statistical significance. 28 of the 33 differential CAGs corresponded to MGS. Most CAGs found depleted in IgA deficiency (13/14) belong to the Firmicutes phylum, whereas only one belongs to the Bacteroidetes phylum. More precisely, among the Firmicutes, more than half of them (7/13) belong to the Lachnospiraceae family and 2 are Ruminococcaceae (*Faecalibacterium* genus, n=2/2) (Supplementary Figure S2c + Supplementary Table 2).

Conversely, among the 20 expanded CAGs in IgA deficiency, 10/20 are Firmicutes, 6/20 are Bacteroidetes, 3 are Proteobacteria (Gamma-proteobacteria exclusively, including *Escherichia coli*) and 1 is unknown. These 20 CAGs belong to 11 different families and thus are more diverse than depleted species. Interestingly, 3/20 expanded CAGs are usually present in the oropharynx flora (*Streptococcus sanguinis*, *Veilonella parvula* and *Haemophilus parainfluenzae*). In addition, we found 2 different species of *Prevotella* over-represented in IgAd.

5/ IgA targets in controls more likely decline than expand in the absence of IgA

It could have been expected that commensals opsonized by SIgA in healthy subjects would all tend to expand in IgAd patients. Indeed, in murine models of immune deficiency,

IgA targets such as *SFB* (51) expand in the absence of an effective IgA response (86, 108). We rather observed that MGS defined in Fig 2C as main IgA targets in controls do not systematically bloom in IgAd patients. Most notably, *Coprococcus comes*, defined at MGS level as the second preferred IgA target, is rather under-represented in IgAd compared to controls (Figure 2G). In contrast, another typical IgA target such as *Escherichia coli* (CAG 4) is over-represented in IgAd patients by an order of magnitude, compared to controls (Figure 2G). These data suggest that *E. coli* (CAG 4) expansion in the microbiota could indeed be negatively influenced by SIgA, while *Coprococcus comes* thrives in the presence of SIgA. More generally, at family level, we observe that IgA+ bacteria are more likely found under-represented than over-represented in IgAd patients (Supplementary Figure S2C). These data emphasize the protective role that IgA directly (or indirectly) play on commensal diversity.

6/ IgM memory B cell expansion and IgM digestive secretion in IgAd patients

We postulated that compensatory mechanisms might take place and explain why IgA deficiency is not associated with massive perturbations of gut microbial ecology, as previously suggested (154, 161, 162). Flow cytometry analysis was therefore performed on purified fecal microbiota in order to test whether other antibody isotypes could be detected at the surface of IgAd microbiomes. IgM was indeed detected at the surface of IgAd microbiota in all IgAd patients analysed (Figure 3A). IgM opsonized 6.26[0.625-45]%, (n=21) of the whole microbiome in patients, whereas IgM opsonization was observed in minimal amounts on only two healthy controls out of 34 (0.05[0-2.4]%, $p < 0.0001$). Measured free fecal IgM levels were consistent with opsonization levels (0.83 [0-28.1] and 39.9 [0-436.1] $\mu\text{g/g}$ of feces in HD and IgAd patients, respectively, $p = 0.0004$, Figure 3B). In blood, so called “IgM only” B cells (163) (CD19+CD27+IgM+IgD-) were increased in patients (5.67[2.88-12.73]% in HD vs 9.14[3.83-43.75]% in patients, $p = 0.0048$), whereas marginal zone cells (CD19+CD27+IgM+IgD+) are similar in both groups (40.2[17.8-66.3]% and 38.85[9.29-

76.8]% in HD and SIgAd patients, respectively, $p=0.7588$, Figure 3C). Therefore, in the absence of IgA, IgM are secreted to the digestive tract, where it opsonizes gut commensals. Our data also suggest that CD19+CD27+IgM+IgD- B cell expansion could account for this compensatory measure.

7/ IgM only partially supply IgA deficiency

We then asked whether IgM could be looked on as a surrogate for IgA at the immune/bacterial interface. In order to test whether IgM and IgA opsonize overlapping repertoires of bacteria we separated IgM+ and IgM- bacteria from patient's microbiomes (n=10) using flow cytometry. Metagenomic analysis could not be performed on sorted samples as the lowest analyzable sample size of 10^8 bacteria was not reached for all IgM+ fractions. Bacterial fractions were then identified by 16S rRNA sequencing (Figure 3D). Hierarchical clustering of n=33 dominant taxa abundances ratios [\log_2 (IgM+/IgM-)] displays no evidence of a common pattern of IgM recognition (Figure 3D). Thus, IgM responses seem to be highly variable inter-individually.

We then focused our analysis on the 19 taxa linked to secretory IgA (taxa opsonized by SIgA and differential MGS, cf Figures 2C and 2E), using the median \log_2 (IgM+/IgM-) ratios of all the donors, we found that: (i) Veillonellaceae family, Prevotella genus, Porphyromonadaceae family, Pseudomonas genus, Lachnospira genus, Faecalibacterium genus, *Clostridium* genus, Bifidobacterium genus and Bacteroides genus are overrepresented in IgM+ fraction, (ii) Enterobacteriaceae family, Streptococcus genus, Ruminococcus genus, Dorea genus, *Coprococcus* genus, *Blautia* genus are overrepresented in IgM- fraction and, (iii), *Acinetobacter* genus, Erysipelotrichaceae family, Anaerostipes genus, Eubacterium genus are equally present in both fractions (Figure 3E). However, paired analysis performed on these 19 taxa revealed that *Clostridium* and *Pseudomonas* genera are significantly enriched in the IgM+ fraction ($p=0.013$), while Veillonellaceae family and Bifidobacterium genus tend

to be overrepresented in this fraction ($p=0.0625$ and $p=0.0938$), whereas statistical significance was not reached for the 15 remaining taxa (Figure 3F). Importantly, bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family are poorly opsonized by IgM. Altogether, not all typical IgA targets are opsonized by digestive IgMs in IgAd patients.

8/ IgM responses allow the maintenance of Actinobacteria diversity in IgA deficiency

Given that the recent literature substantiates that IgA shapes microbiota composition and diversity in mice (86), we wanted to know whether IgM could also play this role in IgA deficiency. Gut IgM⁺ enrichment ratios based on OTU abundances calculated at phylum level in IgM⁺ and IgM⁻ sorted fractions were correlated with the Shannon diversity index (cf Figure 1) within each dominant phylum in 9 SIgAd patients (Figure 4A). As shown, IgM⁺ enrichment ratio is positively correlated with Actinobacteria phylum diversity (Spearman coefficient, $r=0.7167$, $p=0.0369$), whereas no statistical correlation is found with the three other phyla. Positive seric IgM responses against two strains belonging to the Actinobacteria phylum (*Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium longum*) were confirmed in 16 healthy donors by a flow cytometry based assay (Supplementary Figure S4). In order to compare Actinobacteria diversity under high and low IgM gut levels, we explored common variable immunodeficiency (CVID) patients with total IgA deficiency, and low IgM digestive levels (0[0-115] μg of free IgM/g of stool, Supplementary Figure S4). In fact, in CVID, IgM gut microbiota opsonization is minimal (0.297 [0.08-3.84]%, $n=15$). Shotgun sequencing of the whole CVID gut microbiota and metagenomic analysis suggested a significant global loss of MGS richness in this condition (400 [215-694] in HD, vs 266[134-517] in CVID, $p=0.0251$, $n=7$, Figure 4B). Interestingly, a significant loss in Actinobacteria phylum diversity was observed in these patients (Shannon diversity index, 0.55[0.38-0.66] in HD vs 0.415[0.18-0.55] in CVID, $p=0.0017$). A loss, yet more moderate, of the Firmicutes phylum diversity was equally observed ($p=0.0446$), whereas other phyla were spared (Figure 4B).

Taken together, the data suggest that digestive Actinobacteria-specific IgM responses are correlated with diversity.

9/ IgA deficiency is associated with systemic inflammation and bacterial translocation markers

We then asked whether the lack of secretory IgA could induce perturbations in host systemic inflammatory vs regulatory responses in spite of the presence of mucosal IgM responses. Cytokine-secreting circulating CD4⁺ T cells were measured in both groups (Figure 5A). Proportions of IFN γ +CD4⁺ cells were not different (14.6[3.3-25.7]% in HD vs 16.75[2.28-47.8]% in SIgAd, p=0.3932), whereas IL-17+CD4⁺ and IL-22+CD4⁺ cells were increased in IgA deficiency (0.422[0.04-1.96]% vs 1.49[0.06-3.65]%, p=0.0137 and 0.136[0.06-0.769]% vs 0.866[0.02-4]%, p=0.0104, respectively). Moreover, CD4+IL-17+IL-22+ cells were also increased in IgA deficiency (0.05[0.02-0.44]% vs 0.2[0-0.75]%, p=0.0058). Serum IL-6, IL-10 and IL-17 levels were all elevated in patients (0,6 [0.33-2.4] vs 1 [0.25-34.37] pg/mL, p=0.0315, 0.47[0-1.41] vs 0.87[0.37-5.2] pg/mL, p=0.0001, and 0.06[0-1.47] vs 0.21[0.007-0.92] pg/mL, p = 0.0215, respectively) (Figure 5B). Soluble CD14 level in serum was also found increased in patients (2063[1147-4283] vs 2841[1399-5187] pg/mL, p=0.0023) as well as the CD4+PD-1+ cells (7.11[1.86-16.9]% vs 14[3.13-31.6]%, p=0.0093, Figure 5C). Finally, the circulating T regulatory cell compartment was not altered by IgA deficiency, since levels of naïve Tregs (CD4+CD45RA+FoxP3⁺), effector Tregs (CD4+CD45RA-FoxP3^{bright}), and activated conventional T cells (CD4+CD45RA-FoxP3^{low}) were identical in both groups (Figure 5D). Thus, IgA deficient patients display a circulating skewed CD4⁺ T cell phenotype towards Th17 differentiation associated to elevated soluble CD14 seric levels, which is a feature of bacterial translocation.

10/ IgA deficiency is associated with a disturbed bacterial dependency associations network

Bacterial symbiosis in the human gut notably implies that some bacteria depend on other bacteria for their persistence. Within such networks, and by definition, a dependent bacteria, called “satellite”, never occurs independently of another, coined “host”, in a given sample. Conversely, the same host may occur in a given sample independently of its satellites (Figure 6A). This concept was initially promoted by Nielsen *et al* (9), identifying a minimal obligatory network defined by 45 MGS-MGS dependency-associations involving 60 MGS (the same MGS can make several associations). To investigate the potential evolution of bacterial dependency associations in IgAd patients, we tested whether this minimal obligatory network was disturbed in IgA deficiency.

Main links defined by Nielsen *et al.* are confirmed at 90-100% in healthy donors, while the confirmed link percentage dispersion is wider in IgAd patients ranging from 75% to 100% (Figure 6B). Based on our healthy donors MGS-MGS co-presence distribution, the 99% confidence interval was calculated according to a gamma distribution defining a lower-threshold of 84% of MGS-MGS co-presence below which the population-level link was considered absent. In our healthy donor cohort, 41 links out of 45 were maintained at population level, while only 30 links were confirmed in IgAd patients. The 11 links lost in IgAd patients involve 21 MGS: 7 *Faecalibacterium sp.*, 4 Firmicutes, 2 Clostridiales, 2 *Ruminococcus sp.*, 2 *Prevotella*, 2 *Butyricimonas virosa* and 2 unknown MGS (Supplementary Table 3).

The resulting network of remaining bacterial dependencies for healthy donors and IgAd patients is shown in Figure 6C. In summary, IgA deficiency is associated to a disturbed bacterial dependency association network.

3-Discussion

Mucosal IgA responses are involved in pathogens and toxins neutralisation (102) preventing host invasion, but also in coordinating establishment, diversification and stability of the intestinal flora, leading to symbiotic increase of fitness for both host and microbiota (24, 86, 93, 95). Murine IgA deficiency models contribute to underscore the importance of IgA in gut homeostasis since mutant mice display intestinal dysbiosis, colitis, increased bacterial translocation, hyperplasia of the lymphoid structures and peripheral auto-immunity (85, 107, 112). This phenotype could be reversed by IgA restoration using parabiosis (108). Although human IgA deficiency was for a long time considered asymptomatic, recent longitudinal studies have revealed that most patients are symptomatic when assessing complications more broadly (120), or when follow-up is extended (123). Indeed, human IgA deficiency is associated with recurrent mucosal infections, auto-immunity and intestinal disorders such as inflammatory bowel disease and lymphoid hyperplasia. Common variable immune deficiency (CVID) patients with decreased serum levels of multiple immunoglobulins display dysbiotic gut microbiota (164), but it remains unknown whether dysbiosis is uniquely associated with IgA deficiency in humans. To address this issue, we studied gut microbial and immunological compartments in 21 selective IgA deficient patients and compared them to 34 healthy donors. We postulated that IgA deficiency would be associated with intestinal dysbiosis, but also with local and systemic immune perturbations.

Patients with seric IgA deficiency are known to present low or undetectable salivary IgA levels (154, 155), but their gut IgA status remained untested. We therefore confirmed that, both free and microbiota-bound IgA levels were indeed residual or undetectable in IgAd patients, except one. Flow cytometry was first used by Van der Waaij *et al* (165), and then by others (15, 51) to detect bacterial opsonization, but was never performed on gradient purified microbiota (166), allowing us to increase signal specificity.

A major limitation in the quest for the most relevant bacterial species in host-microbiota immunity is related to the fact that a large proportion of bacterial species are either highly fastidious or cannot be cultured *in vitro*. We therefore employed shotgun sequencing and metagenomic analysis (13, 42) to compare gut microbiota composition in patients and healthy controls. In contrast to what was observed in murine models of IgAd, we observed that IgA deficiency does not strikingly alter global gut microbiota composition in affected patients. This difference could be explained by the presence of redundant immune mechanisms in humans, the delayed onset of the antibody defect, or another level of alteration that was not apprehended by this first level of analysis. We therefore used the gene biomarker approach described in Qin *et al* (159) to underscore differences between both groups. Using this approach we identify commensal targets of secretory IgA in healthy donors by metagenomic analysis of SIgA-opsonized commensals. We show that IgA target preferentially Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacteria (in that order). Only 1 out of the 30 CAG identified as preferred IgA targets belong to the Bacteroides phylum, despite its dominance in the human colon. Our results are consistent with previous studies (24, 50, 51, 99, 167), and further underline the Intestinibacter genus, potentially involved in mucin degradation and depleted in metformin treated type 2 diabetes patients (37), as one of the main IgA targets. Under-represented bacteria in IgA deficient patients also mainly belong to the Firmicutes phylum, such as Faecalibacterium, a genus well known to exert anti-inflammatory effects on the gut mucosa (46) and that is notably depleted in inflammatory bowel diseases (168, 169).

Potentially pro-inflammatory Gammaproteobacteria, but also Prevotella, a genus identified by Elinav *et al* (170) as colitogenic in a murine model are over-represented in IgAd patients. Over-represented bacteria are more diverse than under-represented bacteria. Three CAGs usually belonging to the oral flora, *Veilonella parvula*, *Streptococcus sanguinis* and

Haemophilus parainfluenzae are over-represented in gut microbiomes of IgAd patients. These bacteria are involved in biofilm formation and could exert inflammatory effects (171, 172). *Veilonella parvula* has also been described as responsible of sepsis in an X-linked agammaglobulinemia patient (173). Finally, the genera usually described as pathogenic in patients (*Salmonella* and *Campylobacter*) were not found over-represented. Overall, these data suggest that, at steady state, patients present a depletion of anti-inflammatory species along with an expansion of pro-inflammatory species.

After integration of both sets of control and patient data, we observed that all depleted families except one (*Bacteroidaceae*) overlap with SIgA-opsonization, whereas the majority of expanded families do not (Figure S2a). At CAG level, *Escherichia coli* (CAG 4) and *Coprococcus comes* (CAG 19) are both opsonized by SIgA in controls (Figure 2C). However, the former is over-represented, while the latter is under-represented in IgA deficiency (Figure 2E). These results suggest that secretory IgA plays a dual role in protecting some bacteria and neutralizing others simultaneously, underscoring the relevance of IgA in gut homeostasis. Mechanisms underlying these findings are unknown but one could speculate that IgA, on the one hand, excludes (102) and/or inhibits bacterial growth (101) of pathobionts by exclusion from optimal oxygen-rich habitats in intimate proximity of the epithelial barrier, which may simultaneously prevent host inflammation and associated negative effects on commensals. On the other hand, SIgA could protect commensals by agglutination (89) and localizing these bacteria in a favorable habitat (like the mucus).

In patients with IgA deficiency, as expected, but never observed until now, we show that IgM opsonize a restricted fraction of the patient's microbiota. This observation might suggest that IgM could compensate IgA deficiency. In order to verify whether patient's IgM are indeed able to bind bacteria usually opsonized by IgA in controls, we characterized microbes opsonized by secreted IgM in IgAd. We show that IgM responses are highly

variable between individuals. Taxonomic identification could not be obtained beyond the genus level, precluding deep analysis at the species level. However, when focusing the analysis on commensals opsonized by IgA in healthy subjects or differential genera between healthy controls and IgAd patients, we noticed that IgM, like IgA, tend to preferentially bind *Clostridium*, *Bifidobacterium* and *Faecalibacterium* (all Gram positive bacteria). On the other hand, IgM do not bind *Enterobacteriaceae*, nor *Prevotellaceae* families, over-represented in IgA deficient patients and involved in pro-inflammatory events. These data suggest that IgM are only partially efficient at controlling pathobionts, accounting for the susceptibility to enteropathogens in IgA deficient patients. Whether IgM is stable and plays an efficient role in the intestinal lumen remain unknown. Mathias *et al* (89) have shown that secretory component alone binds Gram-positive bacteria through carbohydrates motifs, potentially explaining IgM binding to Gram positive bacteria. Kawamoto *et al* (86) have demonstrated that IgA responses maintained microbiota diversity, in the Firmicutes phylum notably. Our data suggest that IgA and IgM has the same impact on Actinobacteria diversity. The analysis of CVID patients is hampered by several confounding bias such as previous antibiotic courses and small cohort size (although we took care to include CVID that did not receive antibiotics within 3 months prior from sampling), it is however interesting to note that Actinobacteria diversity is drastically decreased in CVID, an “IgM-less” model.

The impact of IgA deficiency on bacterial symbiosis is further evidenced by the perturbation of bacterial networks (Figure 6C). The presence in IgAd patients of satellite bacteria (such as *CAG 97*, *CAG 133*, *CAG 488*, *CAG 206* and *CAG 328*), in the absence of their previously described host (9), most probably reflect the establishment of novel dependency links, involving for instance the emergence of novel taxa. Such modifications underscore the role played by IgA well beyond its recognized neutralising activity.

IgAd has also profound systemic immune repercussions. In an attempt to explain the Th17 bias observed in the patients we compared aryl hydrocarbon receptor (AHR) agonists (174) in fecal water and sera from IgAd patients and controls, but observed no differences (data not shown). The Th17 bias we observed is nevertheless potentially connected to intestinal dysbiosis since Klemola *et al* (175) have already shown the presence of activated T-cells in gut mucosa of IgA deficient patients. As described by Perreau *et al* (176), in CVID, CD4+PD1+ cells are increased in selective IgA deficient patients. Since we show that soluble CD14, an indirect feature of Gram-negative bacteria translocation (177), is increased in patient's sera, PD1 expression could reflect T-cell exhaustion induced by repeated bacterial translocation. Finally, and from a therapeutic perspective, a much larger cohort of patients would be needed in order to extract a potentially beneficial microbial signature associated with elevated IL-10 levels observed in some patients.

Altogether, we show for the first time that selective IgA deficiency in humans is associated with a mild intestinal dysbiosis, characterized by the expansion of pro-inflammatory commensals, the depletion of anti-inflammatory commensals, and a perturbation in the “obligatory” bacterial network. Dysbiosis could be partly explained by the fact that IgA deficiency is not totally compensated by IgM secretion, and by the loss of a non-redundant chaperon-like effect of IgA on microbial diversity.

4-Materials and Methods

Study design

Patients and controls

We conducted a cross-sectional study of patients with IgA deficiency compared to healthy controls. Fresh stool and blood samples were collected simultaneously at a single time point in 36 patients with IgA deficiency and compared with 34 healthy donors.

Patients were recruited from two French referral centers of clinical immunology (Department of Clinical Immunology in Saint Louis hospital and Department of Internal Medicine in La Pitié Salpêtrière hospital, Paris), where they are followed for clinical manifestations associated with antibody deficiencies. Healthy donors were recruited among the laboratory staff and relatives.

Patient's inclusion criteria were (i) undetectable seric IgA levels ($<0,07$ mg/mL) in at least three previous samples in the past year (ii) either selective IgA deficiency (n=21/36) or associated with IgG and/or IgM deficiency integrating a global antibody production defect (n=15/36). Exclusion criteria were antibiotics therapy and laxative drugs use in the last three months for stool metagenomic sequencing (n=17 SIgAd patients, n=7 CVID, n=34 healthy donors). Clinical and biological data were collected at inclusion time. Oral and written consent were obtained from patients before inclusion in the study.

PBMC and plasma

30 mL of blood were collected in ACD tubes (BD Vacutainer®) and PBMC were isolated by density gradient procedure (Ficoll 400, Eurobio) and then stored in liquid nitrogen after a soft freezing in isopropanol. Supernatants were collected as plasma and immediately stored at -80°C .

Bacterial Flow Cytometry

Specific seric antibodies levels against culturable strains were assessed by a flow cytometry assay described in Moor *et al* (152). Briefly, 10^5 alive and PFA (paraformaldehyde) fixed bacteria were incubated with an antibody solution (serum) containing a fixed and normalized concentration of IgG (10 μ g/mL, v/v) per condition. Immune complex were washed twice with a 1x-PBS, 2% w/v BSA, 0.02% w/v Sodium azide (200 μ L/well, 4000g, 10 minutes, +4°C) and then incubated with the secondary antibodies, goat anti-human IgA-FITC, donkey anti-human IgM-PE and goat anti-human IgG-A647 (Jackson Immunoresearch Laboratories).

Quantification of *in vivo* opsonization levels

Purified microbiota (10^7 bacteria/condition) was thawed, fixed in 400 μ L of a solution of 4%-Paraformaldehyde at +4°C and stained with a Cell proliferation dye (eFluor 450, eBiosciences, CA, USA). After washing with 1mL of a 1x-PBS solution, microbiota was resuspended in a 1x-PBS, 2% w/v BSA, 0.02% w/v Sodium azide solution in order to obtain a final concentration of $4 \cdot 10^8$ bacteria/mL. 10^7 bacteria are incubated in a 96-V bottom well plate with conjugated antibodies, either isotype controls mix or goat anti-human IgA-FITC, donkey anti- human IgM-PE and goat anti-human IgG-A647 (Jackson Immunoresearch Laboratories). Acquisition of the cells events was performed on a FACS CANTO II (Becton Dickinson) after washing with a 1x-PBS, 2% w/v BSA, 0.02% w/v Sodium azide solution (4000g, 10min, 4°C) and analysis was performed with Flow-Jo software (Treestar). Medians of fluorescence were used to measure the seric Ig responses levels.

Cytokines quantification

IL-6, IL-10 and IL-17 were measured in the serum by a 3-step digital assay using the HD-1 Analyzer and Single Molecule Array (Simoa) technology (178). Working dilutions were 1/4 for all the sera and working volumes of 25 μ L (Quanterix Corporation).

Soluble CD14 quantification

Pure sera were used to quantify soluble CD14 by ELISA with 100µL of sample per well (Quantikine® ELISA kit, R&D). Experimental procedure was performed according to the manufacturer's recommendations.

Peripheral blood mononuclear cell phenotyping

B cell and T cell phenotyping were performed with a surface staining using the following markers respectively: CD19-BV510, CD27-APC, IgG-PE-Cy7, IgM-PerCP Cy5.5, IgD-BV421 (BD Biosciences), IgA-PE (Jackson Immunoresearch) and CD3-H500, CCR7-PE-Cy7, CD4-APC-Cy7 (BD Biosciences), TCRγδ-PE (Beckman Coulter), CD45RA-PerCP Cy5.5 (e-Bioscience), CD8-A405 (Invitrogen), CD279-APC (BioLegend). T regulator cell phenotyping was performed according to Miyara *et al* (179, 180) with the following markers: CD4-PerCP, CD15s-A647, CD25-PE-Cy7, CD45RA-APC-H7, CD127-BV421, Ki67-FITC, and FoxP3-PE (BD Biosciences). FoxP3 and Ki67 were stained after cell permeabilization with the FoxP3 Fixation/Permeabilization buffer set (eBiosciences, cat#00-5521). Cytokines secreting T cells were detected after a 6-hour Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) - Ionomycin calcium salt (Sigma Aldrich) stimulation and Golgi blocking (Golgi stop, BD Biosciences) and stained with: CD4-APC-Cy7 (BD Biosciences), CD3-PerCP (BD Biosciences), CD8-A405 (Invitrogen), Aqua (LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit, Invitrogen), IL-22-A647 (e-Bioscience), IFNγ-FITC (BD Biosciences), IL-17A-PE (eBioscience).

Stool collection and whole microbiota purification

Stool were collected immediately after emission in a container allowing anaerobic bacteria preservation (Anaerocult band, Mikrobiologie), aliquoted in a CO₂ rich-02 low atmosphere and stored at -80°C. Fecal bacterial were extracted by gradient purification in anaerobic

conditions (Freter chamber) as previously described (166). Briefly, thawed feces were diluted in 1x-PBS (Eurobio), 0,03% w/v sodium deoxycholate (NaDC). An aliquot was centrifuged twice (+21000g, 10 min) and supernatant, so called fecal water, was collected and stored at -80°C. The remaining material was diluted in 1xPBS, 60% w/v Nycodenz, 0,03 % w/v NaDC, and loaded on a continuous density gradient obtained by a freezing-thawing cycle of a Nycodenz solution. Bacterial extract was obtained after ultracentrifugation (9000 rpm, 45 min, +4°C) (Beckman Coulter ultracentrifuge, swinging rotor SW28), and washed three times in 1x-PBS (Eurobio), 0,03% w/v sodium NaDC. The final pellet was diluted in 1xPBS-10%Glycerol, immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C(1).

Free intestinal Ig titers

IgA, IgM and IgG levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the fecal water samples obtained as described above. The assays were performed in a 96-flat bottom plate (Maxisorp, Mume Immunoplate) according to the manufacturer's recommendations (Human Ig ELISA Quantification Set, Bethyl Laboratories). Immune complexes were revealed by incubation with the 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidine (TMB, Rockland) and the reaction was stopped by a 1M HCl solution. Plates were read at 450 nm (Multiscan Ex Thermofisher Saint Herblain). Final concentrations were calculated using the 4-Parameter Logistic curve equation of the standard dilutions normalized to the feces weight.

Enrichment of SIgA-opsonized intestinal microbes

Gradient purified gut microbiota (10^{10} bacteria per sample) from 30 healthy controls were thawed and washed twice in 1ml of 1xPBS. Bacteria were enriched using MACS cell separation. Briefly, bacteria were incubated with PE-conjugated anti-human IgA (Jackson Immunoresearch Laboratories) for 20 minutes in the dark at 4°C, washed twice and then incubated with anti-PE MicroBeads (Miltenyi, Paris, France) for 20 minutes in the dark at 4°C. Labeled bacteria were then enriched on two consecutive MACS columns. First flow-

through (IgA- fraction) and final eluted fraction (IgA+ fraction) were collected and cryopreserved as dry pellet at -80°C. Purity of sorted bacterial fractions was systematically verified by flow cytometric analysis.

Fluorescence-activated cell sorting of IgM-opsionized gut microbes

Purified microbiota (10^9 /condition) was thawed, washed in 1x-PBS and stained with the isotype control (R-phycoerythrin-conjugated Donkey IgG, Jackson Immunoresearch Laboratories,) as a negative control, and the anti-human IgM-PE (Jackson Immunoresearch Laboratories). Acquisition and sorting were performed on a 2 lasers- 2 ways Fluorescent-activated cell sorter (S3 cell sorter, Bio-Rad Laboratories, California, USA) with a minimum rate of 80% of purity for both fractions. Purity of the fractions was systematically verified after sorting. 1.10^6 bacteria per fraction were collected and immediately stored at -80°C.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted using two distinct but overlapping protocols for whole stool and sorted microbiota, respectively. Whole stool samples were treated as previously described [24]. Briefly, 200 mg of faecal sample was lysed chemically (guanidine thiocyanate and N-lauroyl sarcosine) and mechanically (glass beads) followed by elimination of cell debris by centrifugation and precipitation of genomic DNA. Finally, genomic DNA was RNase treated. DNA concentration and molecular size were estimated by Nanodrop (Thermo Scientific) and agarose gel electrophoresis. Sorted commensal samples were treated similar to whole stool samples with the exception that DNA precipitation was performed in smaller volumes and with extra-long incubation times due to the scarcity of bacterial content.

Whole genome metagenomic library construction

Libraries were constructed according to manufactures protocol (Life Technologies). Briefly, extracted genomic DNA was sheared by sonication, size-exclusion purified by Agencourt

beads (Beckman Coulter), ligated to P1 and P2 adaptor oligonucleotides with appropriate barcodes, PCR amplified and loaded onto the flow-chip for downstream SOLiD sequencing.

DNA sequencing and Gene abundances profiling

Microbiota gene content was determined by high-throughput SOLiD sequencing of total and IgA-enriched faecal DNA (181). An average of 70.5 million \pm 23.6 million (mean \pm s.d.) and 54.4 million \pm 20.8 million 35-base-long high-quality single reads were determined for each whole stool and IgA-enriched sample, respectively (a total of 7.7 Gb of sequence). 119 metagenomic samples (34 healthy donors, 17 selective IgA deficient patients, 7 CVID patients, 30 healthy IgA plus fraction and 30 healthy IgA minus fraction) (**Supplementary Data**) were analyzed. High-quality reads were mapped to the reference 3.9 million gene catalog (9) using bowtie package (182) with a maximum of 3 mismatches and length above 35bp. Reads mapping at multiple positions were discarded. An average of 21.0 million \pm 9.5 million and 16.0 million \pm 6.8 million uniquely mapped reads per whole stool and IgA-enriched sample, respectively, were retained for estimating the abundance of each reference gene by using METEOR software. Abundance of each gene in an individual was normalized with the method coined Reads Per Kilobase per Million (RPKM) as previously described (183). Briefly, gene abundance was determined as the number of reads that uniquely mapped to a defined gene. Subsequently, normalized gene abundances were transformed in frequencies by dividing them by the total number of uniquely mapped reads for a given sample. The resulting microbial gene profile was used for further analyses. For samples where 6 million or more sequence reads were obtained ($n = 58$ (none sorted data), $n=56$ (sorted data)), 6 M sequence reads were drawn randomly (without replacement). These randomly drawn reads were mapped to the 3.9 million genes catalog and the number of reads counted to form a downsized depth or abundance matrix. The 6 million downsized depth matrix was used to estimate gene abundances and CAG richness.

Bioinformatical analysis

- CAGs matrix construction

The projection of genes into co-abundance gene groups was performed using a pre-defined list of 7,381 CAGs (9). Every pre-defined CAG is a vector of genes ordered by increasing connectivity. For a bacterial genome, the most connected genes correspond to the marker genes present in all individuals carrying this organism (core genome). Starting with the gene frequency matrix, we projected the list of connected genes in each pre-defined CAG and extract the corresponding frequency profile of the 50 most connected ones. Provided that at least 10% of marker genes are found, each frequency profile will be used to compute the mean vector corresponding to the CAG frequency.

- Differential co-abundance gene groups identification

Genes from the gene-profile matrix were used to identify those that were differentially abundant between the SIgAd patients and healthy donors groups as described in (13). Briefly, Wilcoxon tests were employed to compute the probabilities that genes frequency profiles did not differ between SIgAd patients and healthy donors groups by chance alone. Benjamini and Hochberg multiple test correction was applied to the P-values. By performing a selection based on a significance threshold of $P < 0.01$, we identified 18,025 genes that were differentially abundant between the two groups. The same method and P-value were applied to identify the differentially abundant genes between the IgA+/IgA- fractions in healthy donors. We identified 110,558 genes that were differentially abundant between the two groups. In a second step, the differentially abundant genes were projected into co-abundance gene groups (CAGs) defined in the 3.9 million genes catalogue. To validate a differential CAG, the threshold used was a minimum of 50 differentially abundant genes per CAG (CAG are kept only if they are equal or exceed 50 connected genes) including at least 10% of marker genes. The frequency profile of the 50 most connected genes was used to compute the mean

vector corresponding to the CAG frequency. Of the 18,025 differential genes between SIgAd patients and healthy donors, 8191 fell into 33 CAGs composed of 53– 997 genes after the projection step. For the IgA⁺ and IgA⁻ fractions comparison, 80415 out of 110558 differential genes fell into 119 CAGs of 50–3105 genes. Wilcoxon tests were employed to compute the probabilities that CAGs frequency profiles did not differ between the two compared groups (SIgAd/HD, IgA⁻/IgA⁺ fractions) by chance alone. Benjamini and Hochberg multiple test correction was applied to the P-values. The CAG taxonomical annotation was performed as described in Le Chatelier *et al.*(44).

- Dependency associations

Dependency associations between CAGs were defined as described previously (Nielsen *et al* (9)). This analysis relies on the detection of CAGs that are systematically associated with other CAGs in n= 396 healthy donors. Briefly, they consider dependencies between CAGs based on their sample-wise overlapping detection. First, they used a Fisher exact test to identify statistically significant CAGs detection overlap. Secondly, they validated the dependencies only when the dependent CAG were systematically observed with their associated host CAG. Thus, a dependent CAG, called satellite CAG, should never occur independently of the host CAG. Using these criteria, they identified 886 dependencies, most of them involving a small CAG as a satellite, corresponding to phage/bacteria or pan-genome/core-genome relationship. They also detected 45 MGS-MGS dependency-associations, involving MGS as satellite and host microorganisms that may reflect bacterial symbiosis events. In this study, we have considered the 45 MGS-MGS dependency-associations detected by Nielsen *et al* (9) as a minimal obligatory network that should be retrieved in healthy donors and we hypothesized that it could be disturbed in IgA deficiency. The presence of the 45 links was subsequently investigated in our cohort, and for each link, we have determined the frequency of its presence in both groups. Based on our healthy donors

frequencies distribution, we have determined the 99% confidence interval according to the gamma distribution law defining a threshold of frequency of 84% below which the link was considered significantly decreased at the population level. The investigation of the 45 links presence-absence profiles in our cohort allowed us to distinguish four possible situations. For each link and each individual, if the MGS satellite is present in the absence of the host MGS we consider the link as lost. If the MGS satellite is present in the presence of the host MGS we consider the link as confirmed. If the MGS host is present in the absence of the satellite MGS or if the two are absent, the situation is not taken into account (no information about the link).

16S rRNA metagenomic analysis of sorted IgM-opsonized gut microbiota

Microbiota composition was analysed by pyrosequencing of the V3–V4 region of 16S rRNA gene (184). The 16S rRNA gene was amplified with a semi-nested PCR using primers V3fwd (+357): 5' TACGGRAGGCAGCAG 3', V4rev (+857): 5' ATCTTACCAGGGTATCTAATCCT 3' and X926_Rev (+926) 5' CCGTCAATTCMTTTRAGT 3'. Polymerase chain reaction amplicon libraries were sequenced using a MiSeq Illumina platform (Genotoul, Toulouse, France). The resulting sequences were analysed using the open source software package Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)(185).

Following removal of the primers and barcodes, sequences were filtered as follows: (i) minimum and maximum read length of 250 bp and 500 bp respectively, (ii) no ambiguous base calls, (iii) no homopolymeric runs longer than 8 bp and (iv) minimum average Phred score > 27 within a sliding window of 50 bp. Sequences were aligned with NAST against the GreenGenes reference core alignment set (available in QIIME as core_set_aligned.fasta.imputed) using the 'align_seqs.py' script in QIIME. Sequences that did not cover this region at a percent identity > 75% were removed. Operational taxonomic units

were picked at a threshold of 97% similarity using cd-hit (186) from 'pick_otus.py' script in QUIIME. Picking workflow in QUIIME with the cd-hit clustering method currently involves collapsing identical reads using the longest sequence-first list removal algorithm, picking OTU and subsequently inflating the identical reads to recapture abundance information about the initial sequences. Singletons were removed, as only OTU that were present at the level of at least two reads in more than one sample were retained (9413 ± 5253 sequences per sample). The most abundant member of each OTU was selected through the 'pick_rep_set.py' script as the representative sequence. The resulting OTU representative sequences were assigned to different taxonomic levels (from phylum to genus) using the GreenGenes database (release August 2012), with consensus annotation from the Ribosomal Database Project naïve Bayesian classifier [RDP 10 database, version 6 (187)]. To confirm the annotation, the resulting OTU representative sequences were then searched against the RDP database, using the online program seqmatch (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) and a threshold setting of 90% to assign a genus to each sequence.

Statistical Analysis

- Figure 3: Log 2 ratio of IgM+/IgM- bacterial abundances was performed at the lowest taxonomic identification level (genus or family) to analyze IgM+ relative opsonisation. Only dominant taxa were taken into account, ie taxa that are present in at least 50% of the patients. Zero was normalized by pair and adjusted to the lowest abundance of all taxa. Heatmap representation (a column represents a patient) and hierarchical clustering are used to plot the results (Qlucore® software).
- Flow Cytometry analysis was performed using Flow Jo (9.3.2) Treestar® software.
- Statistical non parametric tests were used whenever necessary: Mann-Whitney was used when comparing two groups, Kruskal Wallis with multiple comparison post-test

of Dunns when comparing three groups, Fisher's exact test was used for contingency, Wilcoxon paired rank test for paired analysis, and Spearman coefficient for correlations. Graphpad Prism® version 6 was used to perform statistical analysis of all the figures except the Figure 2.

5- Supplementary Materials and Methods

Seric Ig levels : Seric Ig levels were assessed by nephelometry using the Siemens BN2 Nephelometer, Siemens, Camberley, UK. IgA detection threshold was 0,07 mg/mL, this value being the admitted threshold to define IgA deficiency (115).

Cytokines quantification: In the first step of the assay, the capture beads coated with an anti-cytokine antibody were combined with the serum. After washing, the biotinylated detector antibody was added to the reaction to bind the captured cytokine. Following a second wash, the streptavidin- β -galactosidase (SBG) was added to bind the detector antibody resulting in enzyme labeling of captured cytokine. After washing, the beads were resuspended in a resorufin β -D-galactopyranoside (RGP) substrate solution and transferred immediately into the array of a Simoa disc to be individually captured into the microwells. The β -galactosidase on captured cytokine hydrolyzed the RGP substrate into a fluorescent product that provides the signal for measurement. At low cytokine concentration, the percentage of bead-containing wells in the array that have a positive signal is proportional to the amount of cytokine present in the sample (digital measurement). At higher concentration, when most of the bead-containing wells have one or more labeled cytokine molecules, the total fluorescence signal is proportional to the amount of cytokine present in the sample (analog measurement). The unknown concentration of cytokines in the serum samples were interpolated from the standard curves.

6- Figures legends

Figure 1: IgA deficient patients and gut microbiota composition

(A) Free IgA levels in fecal water were measured by ELISA in healthy donors (HD, n=34) and selective IgA deficient patients (SIgAd, n= 21). (B) CD19+IgA+ and CD19+IgG+ (surface staining) cells were detected by flow cytometry as shown in the FACS plot example as well as (C) peripheral CD19+CD27+ (memory B cells), CD19+CD27+IgD - (switched memory B cells) cells. (D) Metagenomic analysis performed at phylum level in healthy donors (n=34) and selective IgA deficient patients (n=17). Individual donor histograms and pie charts pooled data, each color represents a major phylum (pink: Bacteroidetes, yellow: Firmicutes, blue: not assigned, grey: Proteobacteria, green: Actinobacteria). (E) Global diversity at metagenomic species level (white whiskers plots) and specific diversity within each dominant phylum (color code refers to section D) were calculated by a Shannon index in both groups. Ends of whiskers represent the minimum and maximum of all the data and boxes represent data spreading. (F) Left. Co-abundance gene groups (CAGs) richness was calculated for each group as the number of different CAGs for each donor (the presence of a CAG was considered if at least one read was detected). Right. Gene richness (gene count) was calculated for both groups. (G) Venn diagram representing CAGs shared by both groups (n=1772), healthy donors (n=79) or SIgA-deficient patient-specific (n=24). For all sections, horizontal bars represent medians. Indicated p values were calculated by a Mann Whitney test.

Figure 2: IgA+ bacterial repertoire in healthy donors and differential analysis between patients and controls at CAG level

(A) Opsonization levels of ex-vivo, purified and fixed microbiota are measured by a flow cytometry based assay. Grey histograms represent isotype control and black line anti-IgA stained microbiota. In the scatter dot plot, each symbol represents a donor (n=34 HD and n=21 SIgAd). Horizontal bars represent medians. Indicated p-values were calculated by a Mann-Whitney test (B) IgA+ fraction of the healthy donors (n=30) was enriched by magnetic sorting and IgA- and IgA+ fractions were sequenced (NGS, Illumina and Solid) and analyzed. (C) IgA+ metagenomic species (n=30) list assigned at their lowest taxonomic level and ranked by statistical significance, from the more to the less significant (from the bottom to the top). Each CAG is unique. Horizontal histograms represent the log₁₀ [1/p value] for each CAG. (D) IgA+ CAGs frequencies in healthy donors. Ends of whiskers plots represent minimum and maximum of all the data set, vertical bar represents the medians, and the boxes represent the spreading of the data. (E) Differential CAG (n=33) between IgA deficient patients and healthy donors assigned at their lowest taxonomic level and ranked by statistical difference. White histograms represent CAG that are underrepresented in IgA deficiency (n=14) whereas grey histograms represent CAG that are overrepresented in IgA deficiency (n=19), compared with healthy donors. (F) Differential CAGs frequencies in IgA-deficient patients. White whiskers represent underrepresented species and grey whiskers represent overrepresented species. cf D.

Figure 3: Opsonization of IgA-deficient microbiota and bacterial targets of IgM

(A) Representative flow cytometry-based IgM detection on whole purified microbiota in a healthy donor and an IgA deficient patient. Grey histograms represent isotype controls and black line IgM staining. (B) IgM opsonization levels in healthy donors (n=34) and SIgAd patients (n=21) by flow cytometry, as well as free IgM levels in fecal water measured by ELISA. Horizontal bars represent medians. p values are calculated by a Mann-Whitney test. (C) Peripheral B-cell phenotyping of two IgM+ subsets: IgM+IgD+CD27+ (marginal zone cells) and IgM+IgD-CD27+ (“IgM only” cells) in healthy donors and patients. Horizontal bars represent medians and Mann-Whitney test was used to calculate p-values. (D) IgM+ and IgM- fractions were sorted by flow cytometry in 10 patients and their composition was analyzed by 16S-sequencing. IgM+ enrichment of the dominant taxa at their lowest taxonomic identification level is measured by the Log₂ [IgM+/IgM-] OTU abundances and plotted for the n=33 dominant OTU on a normalized heat-map with hierarchical clustering. Green color represents the lowest ratio and red color represents the higher ratio (range of the ratios: -6 to +6). (E) Medians of the IgM+ enrichment ratio. Each horizontal bar represents the median ratio of the 10 donors by OTU. (F) Paired analysis of the abundances in both fractions for each OTU of interest. p-values are calculated by a paired-rank Wilcoxon test.

Figure 4: IgM opsonization effects on microbial diversity

(A) IgM opsonization levels specific to each phylum obtained by 16-S sequencing (\log_2 of the [IgM+/IgM-] OTU abundances) are correlated to the Shannon diversity index calculated from metagenomic sequencing (Figure 1) for the same phylum in $n=9$ patients with selective IgA deficiency. Only dominant phyla are shown. Spearman coefficient (r) and p -values (p) are plotted on the graphs. (B) Phyla distribution, MGS richness and diversity are shown for $n=7$ patients with common variable immunodeficiency. Diversity is calculated by a Shannon index either for all the MGS (white whiskers plot) or within each phylum (pink: Bacteroidetes, yellow: Firmicutes, blue: non determined, grey: Proteobacteria, green: Actinobacteria). Ends of whiskers represent the minimum and maximum of all the data and boxes represent data spreading. Horizontal bars represent medians and p values were calculated by a Mann Whitney test.

Figure 5: Systemic inflammatory and bacterial translocation markers

(A) Peripheral cytokine-secreting CD4⁺ T cells after PMA-Calcium Ionophore stimulation (6h). On the left, intra-cellular detection of IFN γ /IL-17 or IL-17/IL-22 in a healthy donor (left column) and a patient (right column). On the right, scatter dot plots showing percentages of peripheral CD4⁺IFN γ ⁺, CD4⁺IL-17⁺, CD4⁺IL-22⁺ and CD4⁺IL-17⁺IL-22⁺ cells in both groups. (B) Seric IL-6, IL-10 and IL-17 levels (pg/mL) measured by digital ELISA in both groups. (C) Seric soluble CD14 levels (pg/mL) were measured by conventional ELISA. Peripheral PD-1 expressing CD4⁺T cells were detected by flow cytometry in both groups. (D) CD4⁺-regulatory subsets were measured by flow cytometry, naïve T reg cells (CD4⁺CD45RA⁺FoxP3), effector T reg cells (CD4⁺CD45RA⁻FoxP3 bright), as well as activated conventional CD4⁺ cells (CD4⁺CD45RA⁻FoxP3 low). For all sections, horizontal bars represent medians and p -values were obtained by a Mann-Whitney test.

Figure 6: Bacterial dependency associations networks in IgA deficiency and healthy donors

(A) For each individual and each MGS-MGS dependency association there is four possible situations. If the satellite MGS is present without his host MGS we consider the link as lost. If the satellite MGS is present with his host MGS we consider the link as conserved. If the host MGS is present in the absence of the satellite MGS, no information is given about the link. If the host and satellite MGS are both absent no information is given about the link.

(B) The distribution of the confirmed links percentage for the 45 MGS-MGS dependencies.

(C) The 45 MGS-MGS dependency-associations network compared between healthy donors and IgA deficiency patients. Each of the two networks shows the 45 highly significant and directional dependency-associations among 60 MGS. Blue circles represent host MGS. Purple triangle represent satellite MGS. Purple triangle into the blue circle represent MGS both satellite and host according to the dependency-association. Black arrows indicate the confirmed dependency-associations among MGS (directional arrow from the satellite MGS to the host MGS) in healthy donors and IgA deficiency. Red cross indicates the lost dependency-association in healthy donors and IgA deficiency.

7- Supplementary figures legends

Figure S1: Seric IgA and IgG levels in IgA deficient patients

Ig levels were assessed in healthy donors (HD) and selective IgA deficient patients (SIgAd) by nephelometry (BN II, Siemens) , with a threshold of detection of 0.07 mg/mL for IgA. Horizontal bars represent median and p-values are calculated by a Mann-Whitney test.

Figure S2: Differentially abundant CAGs.

(S2A) Differentially abundant CAGs between IgA+ and IgA- fractions. Abundance of 50 'tracer' genes for each CAG in the IgA+ (n=30) and IgA- (n=30) fractions. Genes are in rows, abundance is indicated by colour gradient (white, not detected; red, most abundant); the enrichment significance is shown (p indicates the Wilcoxon P-values and q indicated the Wilcoxon P values corrected by the Benjamini and Hochberg method).

Individuals are shown in columns. The IgA+ and IgA- fractions are separated by a vertical black line. The differentially abundant CAGs are ordered by decreasing p and q values. CAGs enriched in IgA+ and in IgA- fractions are separated by a horizontal red line.

(S2B) Differentially abundant CAGs between healthy donors and IgA deficiency patients. Abundance of 50 'tracer' genes for each CAG in the healthy donors (n=34) and IgA deficiency patients (n=17). Genes are in rows, abundance is indicated by colour gradient (white, not detected; red, most abundant); the enrichment significance is shown (p indicates the Wilcoxon P-values and q indicated the Wilcoxon P values corrected by the Benjamini and Hochberg method). Individuals are shown in columns. The healthy donors and IgA deficiency patients are separated by a vertical black line. The differentially abundant CAGs are ordered by decreasing p and q values. CAGs enriched in healthy donors and in IgA deficiency are separated by a horizontal red line.

(S2C) Taxonomic distribution at phylum (left column) and family (right column) levels of : (upper part of the figure) the enriched CAGs in IgA+ fraction of healthy donors, (middle part

of the figure) Under-represented CAGs in IgA deficiency, (lower part of the figure) Enriched CAGs in IgA deficiency.

Figure S4

(Upper part) Seric IgM responses levels of n=16 healthy donors detected by flow cytometry against *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*. Sera were incubated with alive and fixed bacteria at normalized concentrations of immunoglobulins and Ig binding was detected with a conjugated antibody. MFI levels are plotted on a logarithmic scale. Positivity threshold is defined as the isotype control staining MFI level. p-values are calculated by a Mann-Whitney test.

(Lower part) IgA and IgM opsonization levels in CVID patients with complete IgA deficiency (n=15) by flow cytometry as well as free IgA and IgM levels in fecal water measured by ELISA. Horizontal bars represent medians. p values are calculated by a Mann-Whitney test

8-References and Notes

1. M. J. Molloy *et al.*, Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis. *Cell host & microbe* **14**, 318-328 (2013).
2. S. Hapfelmeier *et al.*, Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* **328**, 1705-1709 (2010).
3. L. V. Hooper, A. J. Macpherson, Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology* **10**, 159-169 (2010).
4. K. Suzuki *et al.*, Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1981-1986 (2004).
5. S. Fagarasan *et al.*, Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* **298**, 1424-1427 (2002).
6. G. R. Harriman *et al.*, Targeted deletion of the IgA constant region in mice leads to IgA deficiency with alterations in expression of other Ig isotypes. *Journal of immunology* **162**, 2521-2529 (1999).
7. D. H. Reikvam *et al.*, Epithelial-microbial crosstalk in polymeric Ig receptor deficient mice. *European journal of immunology* **42**, 2959-2970 (2012).
8. O. L. Wijburg *et al.*, Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella typhimurium infection. *The Journal of experimental medicine* **203**, 21-26 (2006).
9. N. Lycke, L. Erlandsson, L. Ekman, K. Schon, T. Leanderson, Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *Journal of immunology* **163**, 913-919 (1999).
10. M. Wei *et al.*, Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nature immunology* **12**, 264-270 (2011).
11. S. Kawamoto *et al.*, The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* **336**, 485-489 (2012).
12. S. Kawamoto *et al.*, Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152-165 (2014).
13. C. R. Stokes, J. F. Soothill, M. W. Turner, Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* **255**, 745-746 (1975).
14. L. Yel, Selective IgA deficiency. *Journal of clinical immunology* **30**, 10-16 (2010).
15. N. Wang, L. Hammarstrom, IgA deficiency: what is new? *Current opinion in allergy and clinical immunology* **12**, 602-608 (2012).
16. V. A. Oxelius *et al.*, IgG subclasses in selective IgA deficiency: importance of IgG2-IgA deficiency. *The New England journal of medicine* **304**, 1476-1477 (1981).
17. L. Mellander, J. Bjorkander, B. Carlsson, L. A. Hanson, Secretory antibodies in IgA-deficient and immunosuppressed individuals. *Journal of clinical immunology* **6**, 284-291 (1986).
18. P. Brandtzaeg *et al.*, Immunohistochemical study of nasal mucosa in patients with selective IgA deficiency. *International archives of allergy and applied immunology* **82**, 483-484 (1987).
19. W. B. Chodirker, T. B. Tomasi, Jr., Gamma-Globulins: Quantitative Relationships in Human Serum and Nonvascular Fluids. *Science* **142**, 1080-1081 (1963).
20. A. Aghamohammadi *et al.*, IgA deficiency: correlation between clinical and immunological phenotypes. *Journal of clinical immunology* **29**, 130-136 (2009).
21. J. F. Ludvigsson, M. Neovius, L. Hammarstrom, Association between IgA deficiency & other autoimmune conditions: a population-based matched cohort study. *Journal of clinical immunology* **34**, 444-451 (2014).
22. G. H. Jorgensen *et al.*, Clinical symptoms in adults with selective IgA deficiency: a case-control study. *Journal of clinical immunology* **33**, 742-747 (2013).
23. D. A. Peterson, N. P. McNulty, J. L. Guruge, J. I. Gordon, IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell host & microbe* **2**, 328-339 (2007).

24. T. C. Cullender *et al.*, Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut. *Cell host & microbe* **14**, 571-581 (2013).
25. N. W. Palm *et al.*, Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* **158**, 1000-1010 (2014).
26. N. J. Mantis, Rediscovering IgA. *Mucosal immunology* **4**, 588-589 (2011).
27. W. Al-Herz *et al.*, Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Frontiers in immunology* **2**, 54 (2011).
28. J. Qin *et al.*, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65 (2010).
29. M. Arumugam *et al.*, Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-180 (2011).
30. H. B. Nielsen *et al.*, Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature biotechnology* **32**, 822-828 (2014).
31. K. Moor *et al.*, Analysis of bacterial-surface-specific antibodies in body fluids using bacterial flow cytometry. *Nature protocols* **11**, 1531-1553 (2016).
32. F. Plaza Onate *et al.*, Quality control of microbiota metagenomics by k-mer analysis. *BMC genomics* **16**, 183 (2015).
33. N. Qin *et al.*, Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* **513**, 59-64 (2014).
34. R. Albalat, C. Canestro, Evolution by gene loss. *Nature reviews. Genetics* **17**, 379-391 (2016).
35. G. Karlsson *et al.*, Immunohistochemical study of nasal mucosa in patients with common variable immunodeficiency. *International archives of allergy and applied immunology* **82**, 481-482 (1987).
36. P. Brandtzaeg, I. Fjellanger, S. T. Gjeruldsen, Immunoglobulin M: local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency. *Science* **160**, 789-791 (1968).
37. U. Klein, R. Kuppers, K. Rajewsky, Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* **89**, 1288-1298 (1997).
38. J. D. Planer *et al.*, Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature* **534**, 263-266 (2016).
39. E. W. Rogier *et al.*, Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 3074-3079 (2014).
40. C. Lindner *et al.*, Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nature immunology* **16**, 880-888 (2015).
41. S. Koskinen, Long-term follow-up of health in blood donors with primary selective IgA deficiency. *Journal of clinical immunology* **16**, 165-170 (1996).
42. S. F. Jorgensen *et al.*, Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal immunology* **9**, 1455-1465 (2016).
43. L. A. van der Waaij, P. C. Limburg, G. Mesander, D. van der Waaij, In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* **38**, 348-354 (1996).
44. J. J. Bunker *et al.*, Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* **43**, 541-553 (2015).
45. C. Juste *et al.*, Bacterial protein signals are associated with Crohn's disease. *Gut* **63**, 1566-1577 (2014).
46. A. L. Kau *et al.*, Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Science translational medicine* **7**, 276ra224 (2015).
47. G. D'Auria *et al.*, Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-represented microbiota core. *Scientific reports* **3**, 3515 (2013).
48. M. Dzidic *et al.*, Aberrant IgA responses to the gut microbiota during infancy precede asthma and allergy development. *The Journal of allergy and clinical immunology*, (2016).

49. K. Forslund *et al.*, Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262-266 (2015).
50. H. Sokol *et al.*, Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16731-16736 (2008).
51. K. Machiels *et al.*, A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275-1283 (2014).
52. H. Sokol *et al.*, Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases* **15**, 1183-1189 (2009).
53. E. Elinav *et al.*, NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* **145**, 745-757 (2011).
54. B. van den Bogert, M. Meijerink, E. G. Zoetendal, J. M. Wells, M. Kleerebezem, Immunomodulatory properties of Streptococcus and Veillonella isolates from the human small intestine microbiota. *PloS one* **9**, e114277 (2014).
55. I. Mashima, F. Nakazawa, The influence of oral Veillonella species on biofilms formed by Streptococcus species. *Anaerobe* **28**, 54-61 (2014).
56. M. Strach, M. Siedlar, D. Kowalczyk, M. Zembala, T. Grodzicki, Sepsis caused by Veillonella parvula infection in a 17-year-old patient with X-linked agammaglobulinemia (Bruton's disease). *Journal of clinical microbiology* **44**, 2655-2656 (2006).
57. S. Okai *et al.*, High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. *Nature microbiology* **1**, 16103 (2016).
58. A. Mathias, B. Corthesy, Recognition of gram-positive intestinal bacteria by hybridoma- and colostrum-derived secretory immunoglobulin A is mediated by carbohydrates. *The Journal of biological chemistry* **286**, 17239-17247 (2011).
59. M. Veldhoen *et al.*, The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**, 106-109 (2008).
60. T. Klemola *et al.*, Immunohistochemical findings in jejunal specimens from patients with IgA deficiency. *Gut* **37**, 519-523 (1995).
61. M. Perreau *et al.*, Exhaustion of bacteria-specific CD4 T cells and microbial translocation in common variable immunodeficiency disorders. *The Journal of experimental medicine* **211**, 2033-2045 (2014).
62. C. Chenevier-Gobeaux, D. Borderie, N. Weiss, T. Mallet-Coste, Y. E. Claessens, Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **450**, 97-103 (2015).
63. D. M. Rissin *et al.*, Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature biotechnology* **28**, 595-599 (2010).
64. M. Miyara *et al.*, Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899-911 (2009).
65. M. Miyara *et al.*, Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 7225-7230 (2015).
66. E. R. Mardis, Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics* **9**, 387-402 (2008).
67. B. Langmead, Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current protocols in bioinformatics* **Chapter 11**, Unit 11 17 (2010).
68. M. A. Dillies *et al.*, A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Briefings in bioinformatics* **14**, 671-683 (2013).
69. E. Le Chatelier *et al.*, Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541-546 (2013).
70. K. H. Wilson, R. B. Blitchington, R. C. Greene, Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* **28**, 1942-1946 (1990).
71. J. G. Caporaso *et al.*, QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* **7**, 335-336 (2010).

72. W. Li, A. Godzik, Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**, 1658-1659 (2006).
73. J. R. Cole *et al.*, The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research* **37**, D141-145 (2009).

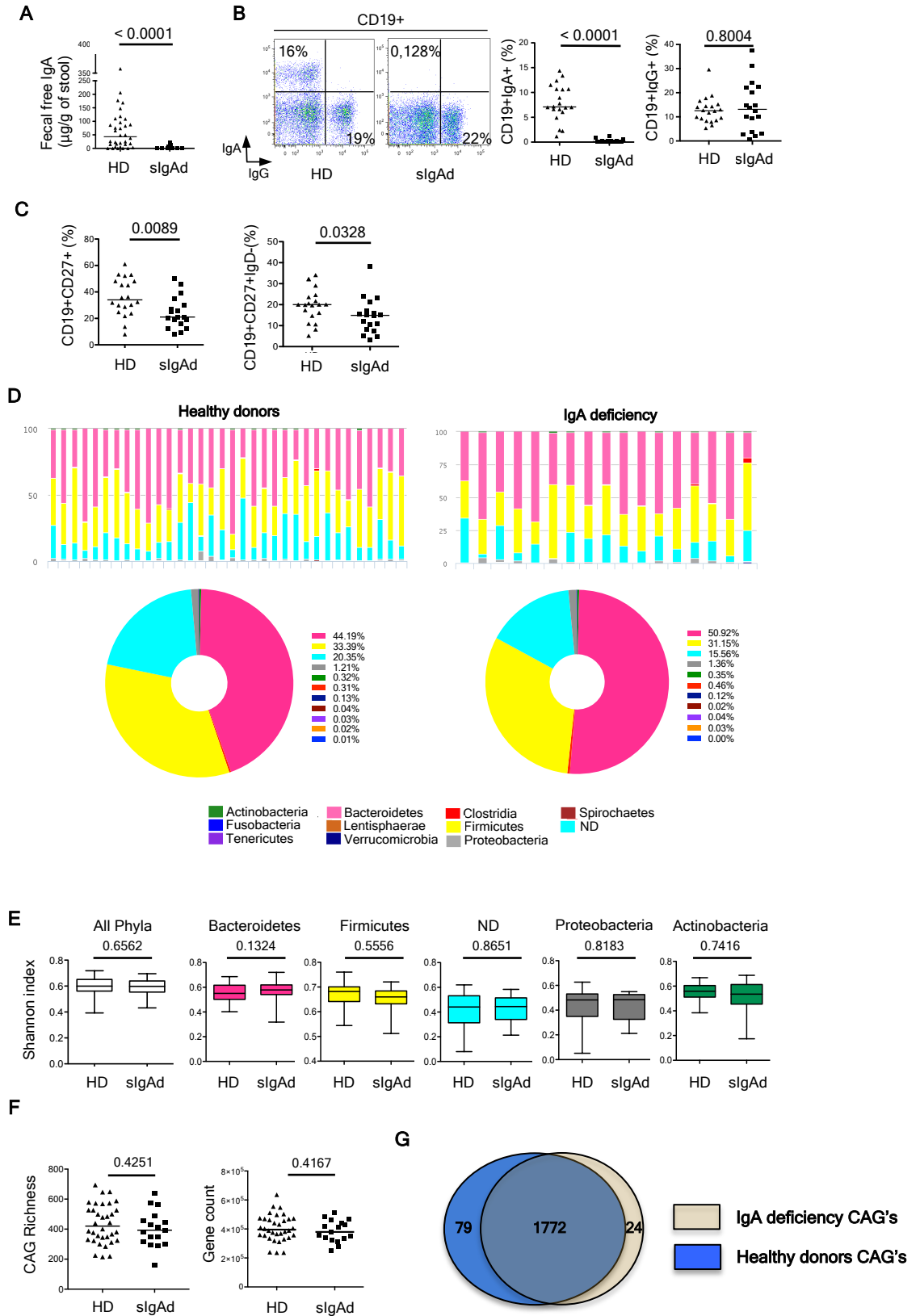


Figure 1

Selective IgA deficient patients

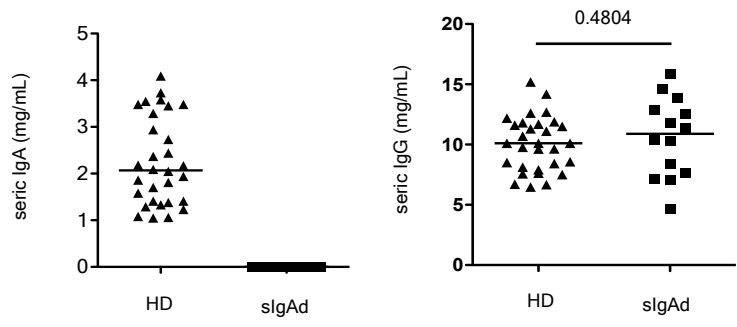


Figure S1

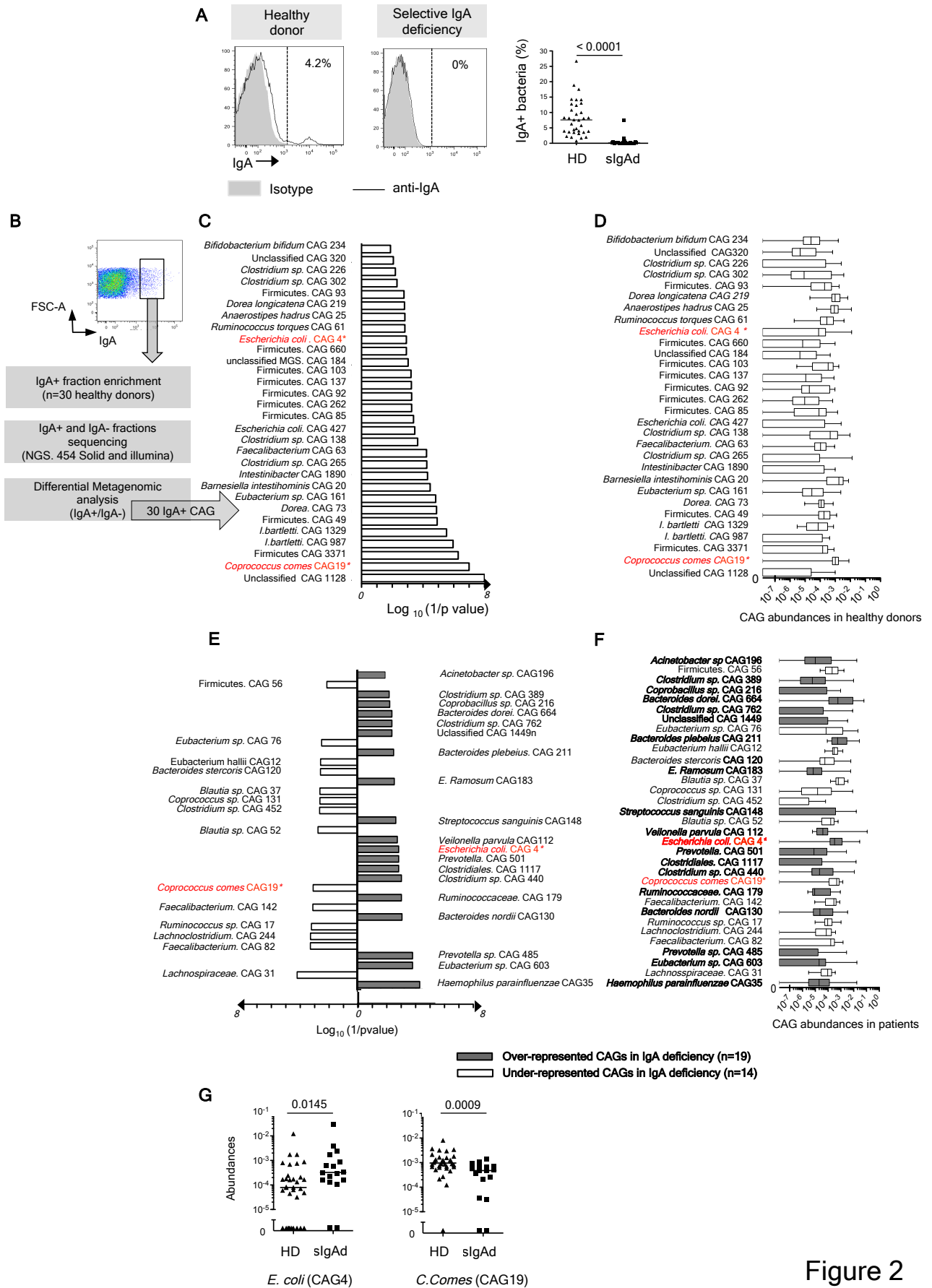


Figure 2

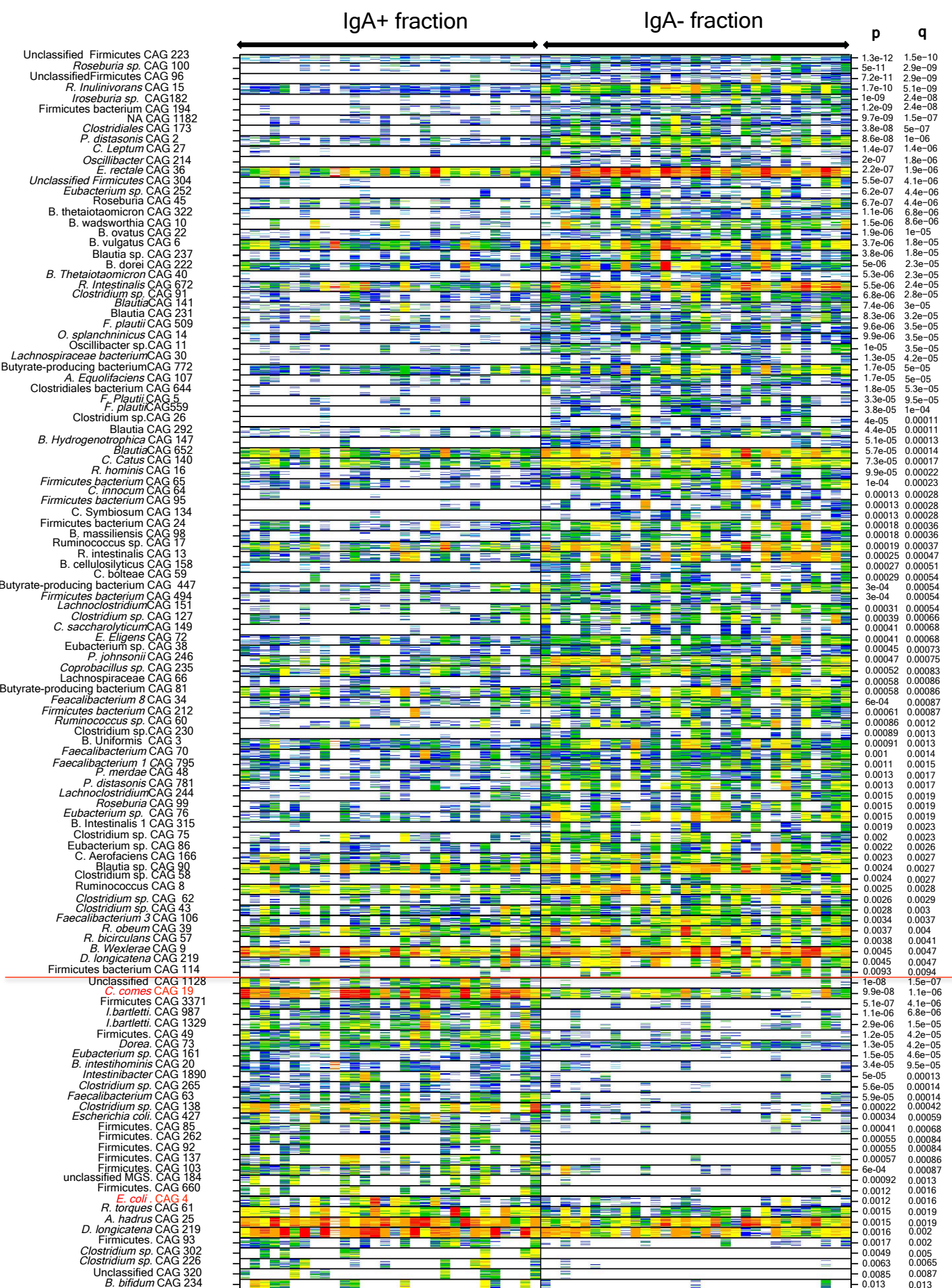
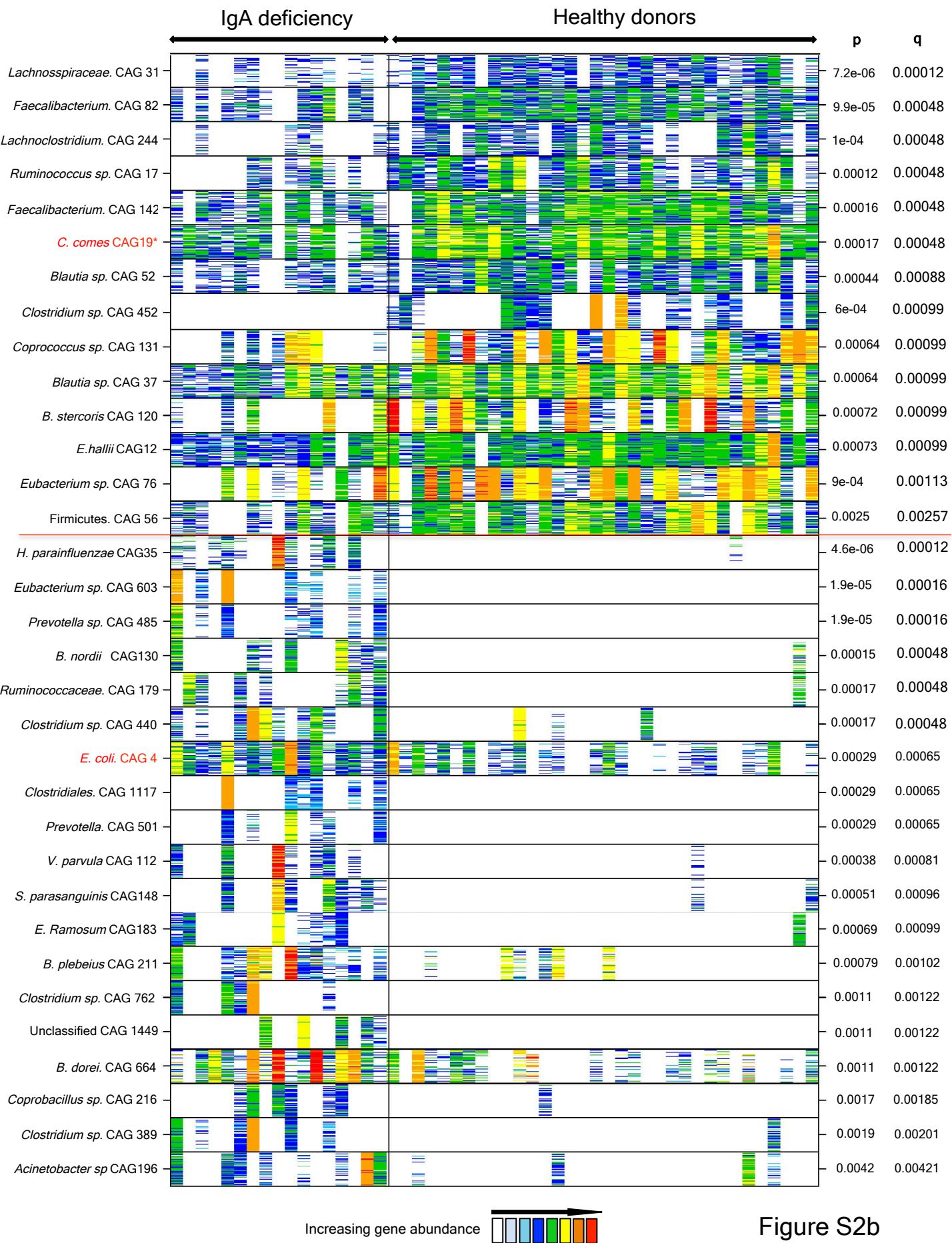
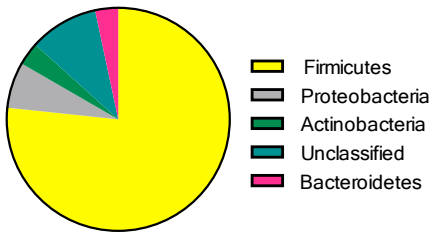


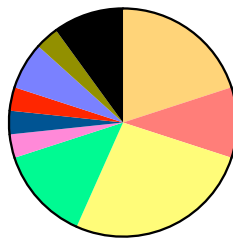
Figure S2a



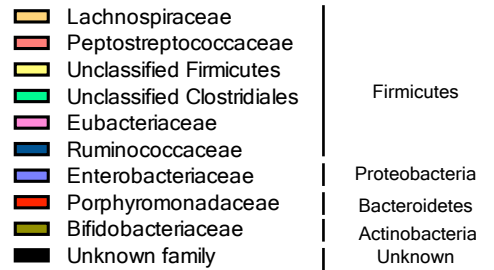
IgA+ CAG's (cf Fig2C)



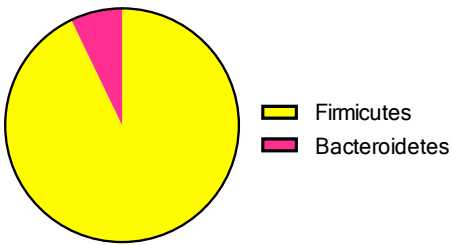
Total=30



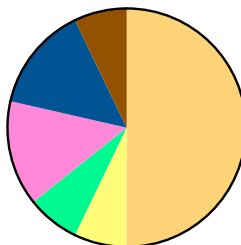
Total=30



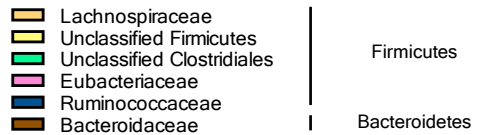
Depleted CAGs in IgA deficiency (cf Fig2E)



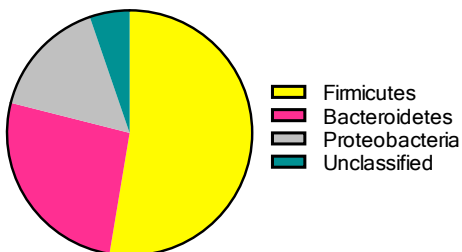
Total=14



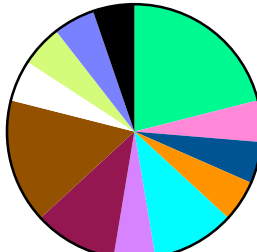
Total=14



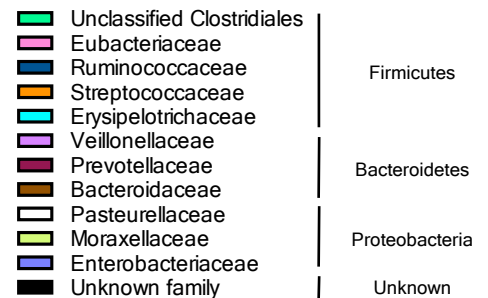
Expanded CAGs in IgA deficiency (cf Fig2E)



Total=19



Total=19

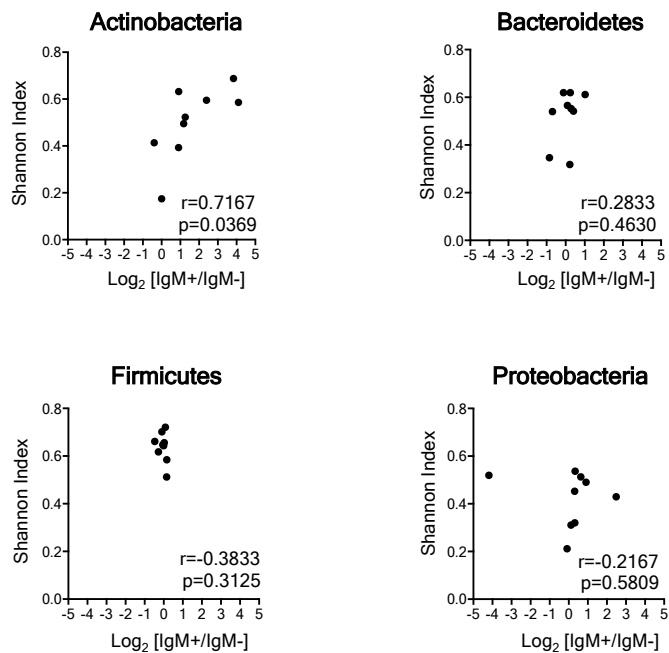


Phylum level

Family level

Figure S2c

A



B

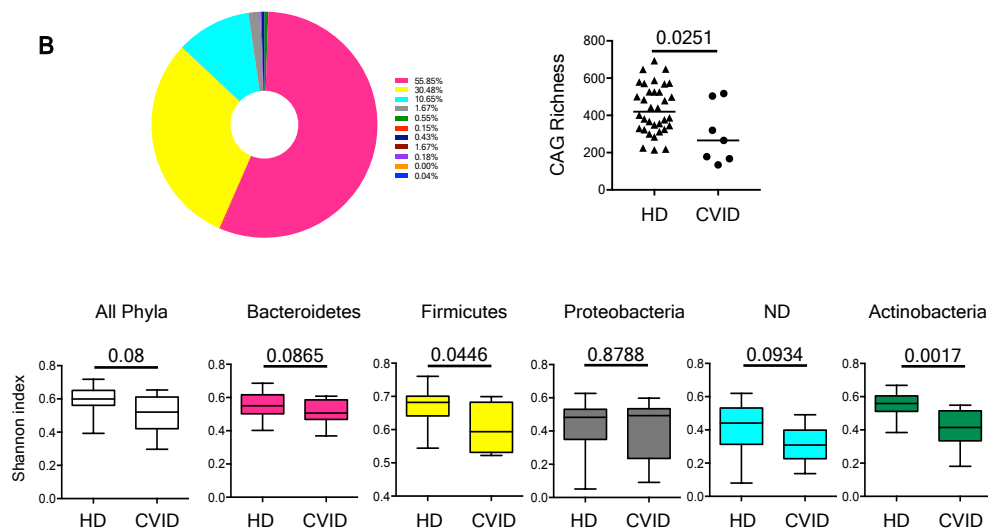


Figure 4

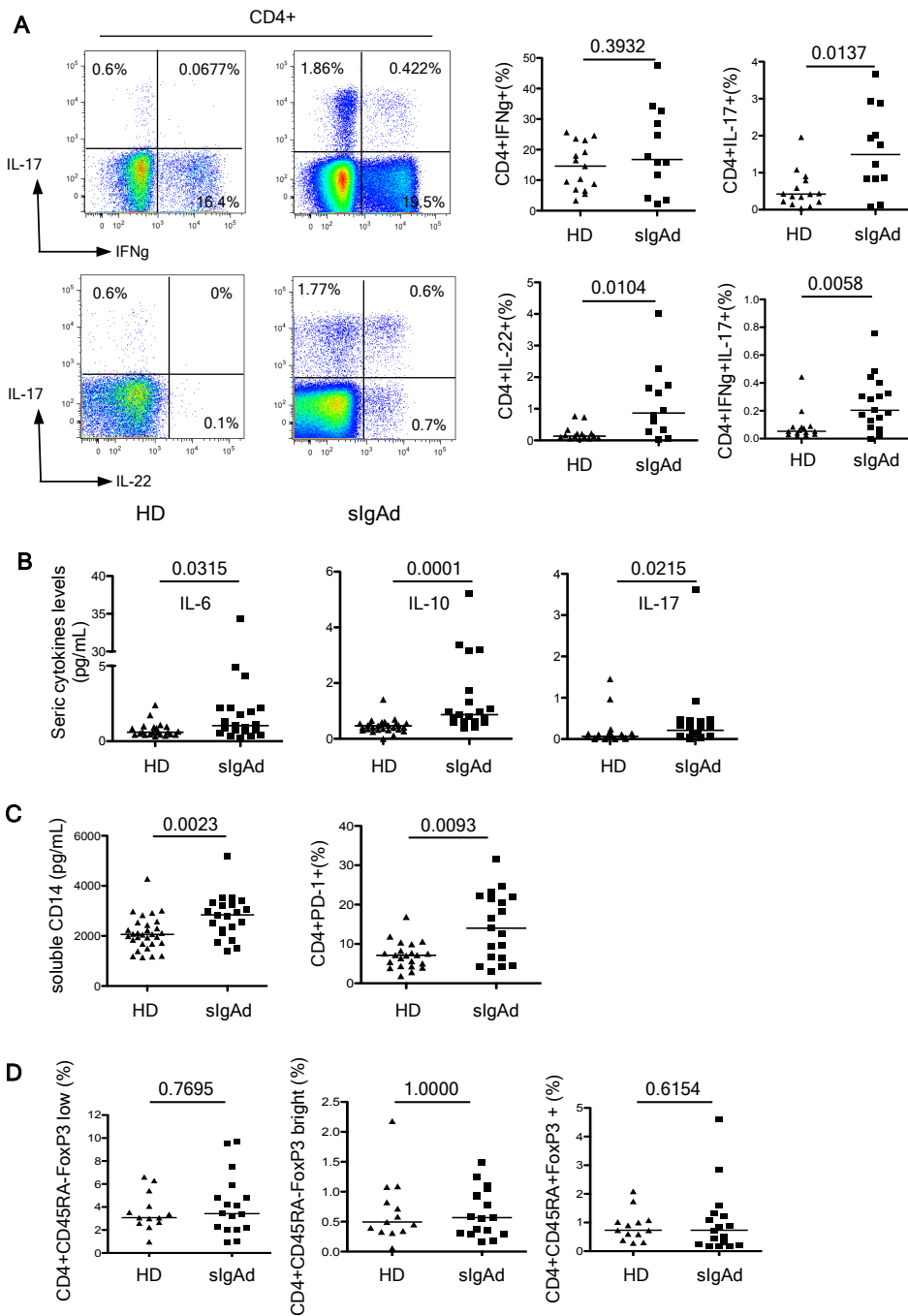
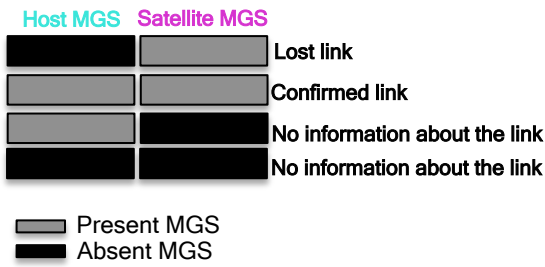
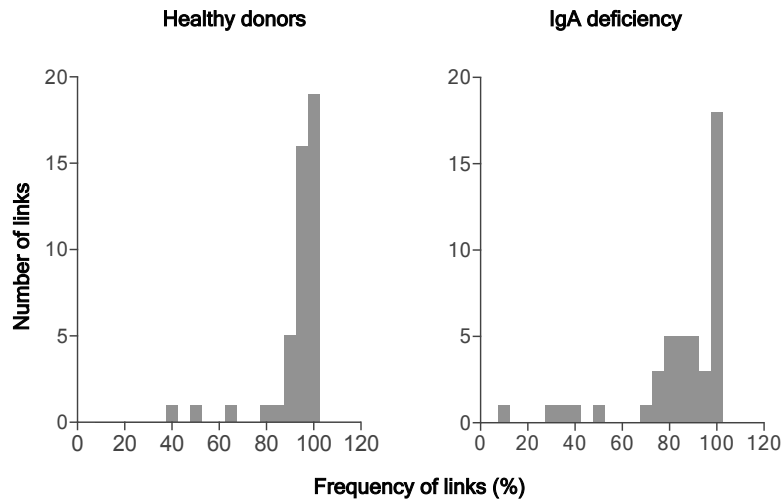


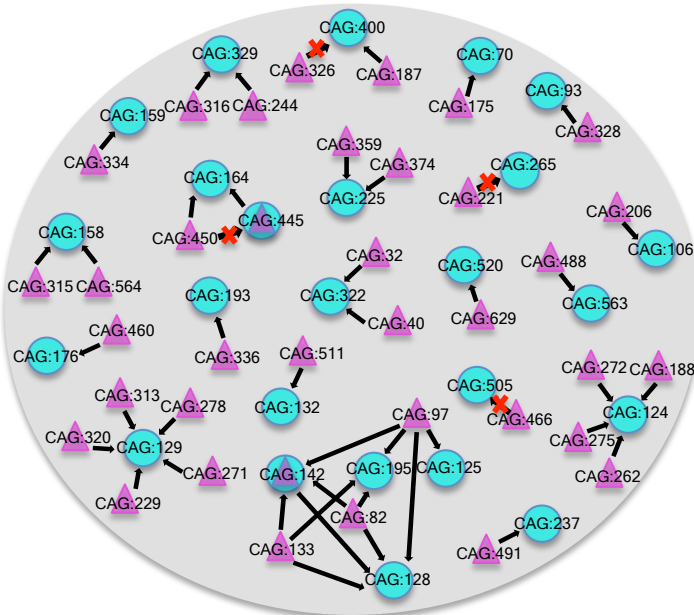
Figure 5

A

For each individual and each link, 4 possible situations

**B****C**

Healthy donors network



IgA deficiency network

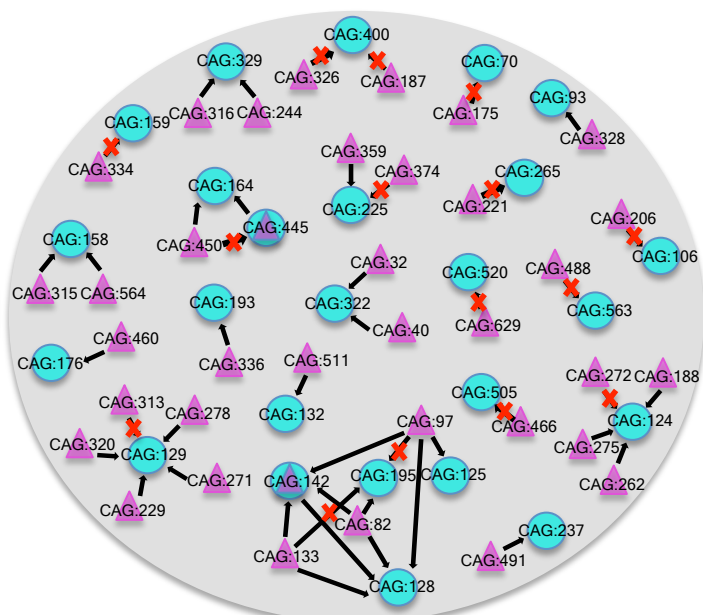


Figure 6

CAG number	CAG size	Taxo_level	Species	Genus	Family	Order	Class	Phylum	Superkingdom
CAG:35	3843	species	Haemophilus parainfluenzae	Haemophilus	Pasteurellaceae	Pasteuriales	Gammaaproteobacteria	Proteobacteria	Bacteria
CAG:130	3655	species	Bacteroides nordii	Bacteroides	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes	Bacteria
CAG:4	3523	species	Escherichia coli	Escherichia	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Gammaaproteobacteria	Proteobacteria	Bacteria
CAG:216	3481	species	Coprobacillus sp. D6 & sp. 29_1	Coprobacillus	Erysipelotrichaceae	Erysipelotrichales	Erysipelotrichia	Firmicutes	Bacteria
CAG:183	2961	species	Erysipelatoclostridium ramosum	Erysipelatoclostridium	Erysipelotrichaceae	Erysipelotrichales	Erysipelotrichia	Firmicutes	Bacteria
CAG:31	2884	family	NA	NA	Lachnospiraceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:112	2141	species	Veillonella parvula	Veillonella	Veillonellaceae	Selenomonadales	Negativicutes	Firmicutes	Bacteria
CAG:12	2101	species	Eubacterium hallii	Eubacterium	Eubacteriaceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:52	2045	species	Blautia sp. CAG:52	Blautia	Lachnospiraceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:131	2024	species	Coprococcus sp. CAG:131 & Coprococcus sp. ART55/1	Coprococcus	Lachnospiraceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:603	2013	species	Eubacterium sp. CAG:603	Eubacterium	Eubacteriaceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:244	2004	genus	NA	Lachnoclostridium	Lachnospiraceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:179	1998	genus	NA	unclassified Ruminococcaceae	Ruminococcaceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:56	1952	species	Firmicutes bacterium CAG:56	unclassified Firmicutes	unclassified Firmicutes	unclassified Firmicutes	unclassified Firmicutes	Firmicutes	Bacteria
CAG:485	1940	species	Prevotella sp. CAG:485	Prevotella	Prevotellaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes	Bacteria
CAG:19	1922	species	Coprococcus comes	Coprococcus	Lachnospiraceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:37	1919	species	Blautia sp. CAG:37	Blautia	Lachnospiraceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:17	1780	species	Ruminococcus sp. CAG:17	Blautia	Lachnospiraceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:148	1718	species	Streptococcus parasanCAGinis	Streptococcus	Streptococcaceae	Lactobacillales	Bacilli	Firmicutes	Bacteria
CAG:76	1716	species	Eubacterium sp. CAG:76	Eubacterium	Eubacteriaceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:196	1661	species	Acinetobacter sp. CAG:196	Acinetobacter	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Gammaaproteobacteria	Proteobacteria	Bacteria
CAG:211	1660	species	Bacteroides plebeius	Bacteroides	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes	Bacteria
CAG:154	1648	species	Prevotella copri	Prevotella	Prevotellaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes	Bacteria
CAG:1117	1601	genus	NA	Prevotella	Prevotellaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes	Bacteria
CAG:120	1594	species	Bacteroides stercoris	Bacteroides	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes	Bacteria
CAG:82	1297	species	Faecalibacterium 6	Faecalibacterium	Ruminococcaceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:501	1179	genus	NA	unclassified Clostridiales	unclassified Clostridiales	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:440	1124	species	Clostridium sp. CAG:440	unclassified Clostridiales	unclassified Clostridiales	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:452	1093	species	Clostridium sp. CAG:452	unclassified Clostridiales	unclassified Clostridiales	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:389	985	species	Clostridium sp. CAG:389	unclassified Clostridiales	unclassified Clostridiales	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:762	974	species	Clostridium sp. CAG:762	unclassified Clostridiales	unclassified Clostridiales	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:142	960	genus	NA	Faecalibacterium	Ruminococcaceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Bacteria
CAG:1449	293	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CAG:664	120	species	Bacteroides dorei	Bacteroides	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidia	Bacteroidetes	Bacteria

Supplementary table 2

MGS_host	Taxonomy_of_hosting_MGS	MGS_satellite	Taxonomy_of_Satellite_MGS	confirmed links in HD (%)	confirmed links in IgA deficiency (%)
CAG:129	Firmicutes bacterium CAG:129 & uncultured Collinsella sp.	CAG:229	Firmicutes	96,55172414	91,66666667
CAG:400	Clostridiales	CAG:187	NA	100	33,33333333
CAG:70	Faecalibacterium	CAG:175	uncultured Faecalibacterium sp.	90,90909091	68,75
CAG:93	unclassified Firmicutes	CAG:328	unclassified Firmicutes	96,15384615	90
CAG:106	Faecalibacterium 3	CAG:206	Faecalibacterium	93,93939394	82,35294118
CAG:124	Firmicutes bacterium CAG:124	CAG:188	unclassified Firmicutes	100	91,66666667
CAG:124	Firmicutes bacterium CAG:124	CAG:262	unclassified Firmicutes	89,65517241	85,71428571
CAG:124	Firmicutes bacterium CAG:124	CAG:272	Firmicutes bacterium CAG:272	95,65217391	75
CAG:124	Firmicutes bacterium CAG:124	CAG:275	NA	90,90909091	86,66666667
CAG:125	Faecalibacterium 2	CAG:97	Faecalibacterium	96,96969697	93,75
CAG:128	Faecalibacterium 4	CAG:82	Faecalibacterium 6	100	100
CAG:128	Faecalibacterium 4	CAG:97	Faecalibacterium	100	100
CAG:128	Faecalibacterium 4	CAG:133	Faecalibacterium	100	100
CAG:128	Faecalibacterium 4	CAG:142	Faecalibacterium	100	100
CAG:129	Firmicutes bacterium CAG:129 & uncultured Collinsella sp.	CAG:271	Firmicutes	100	91,66666667
CAG:129	Firmicutes bacterium CAG:129 & uncultured Collinsella sp.	CAG:278	NA	95,45454545	92,85714286
CAG:129	Firmicutes bacterium CAG:129 & uncultured Collinsella sp.	CAG:313	Firmicutes bacterium CAG:313	100	80
CAG:129	Firmicutes bacterium CAG:129 & uncultured Collinsella sp.	CAG:320	NA	92,30769231	100
CAG:132	Clostridium clostridioforme	CAG:511	Clostridium clostridioforme	90,90909091	86,66666667
CAG:142	Faecalibacterium	CAG:82	Faecalibacterium 6	100	100
CAG:142	Faecalibacterium	CAG:97	Faecalibacterium	100	100
CAG:142	Faecalibacterium	CAG:133	Faecalibacterium	100	100
CAG:158	Bacteroides cellulosilyticus	CAG:315	Bacteroides intestinalis 1	100	100
CAG:158	Bacteroides cellulosilyticus	CAG:564	Bacteroides intestinalis 1	100	100
CAG:159	Clostridiales	CAG:334	NA	84,61538462	83,33333333
CAG:164	Prevotella copri	CAG:445	Prevotella	100	100
CAG:164	Prevotella copri	CAG:450	Prevotella	100	100
CAG:176	Firmicutes bacterium CAG:176	CAG:460	Firmicutes bacterium CAG:460	100	100
CAG:193	unclassified Firmicutes	CAG:336	unclassified Firmicutes	92,85714286	92,85714286
CAG:195	Faecalibacterium 1	CAG:82	Faecalibacterium 6	96,875	100
CAG:195	Faecalibacterium 1	CAG:97	Faecalibacterium	93,93939394	81,25
CAG:195	Faecalibacterium 1	CAG:133	Faecalibacterium	93,93939394	82,35294118
CAG:225	Butyricimonas virosa	CAG:359	Butyricimonas	100	85,71428571
CAG:225	Butyricimonas virosa	CAG:374	Butyricimonas	93,75	75
CAG:237	Blautia sp. CAG:237	CAG:491	Blautia	96,55172414	91,66666667
CAG:265	Clostridium sp. CAG:221 - Clostridium sp. CAG:265	CAG:221	Clostridium sp. CAG:221 - Clostridium sp. CAG:265	51,85185185	38,46153846
CAG:322	Bacteroides thetaiotaomicron	CAG:32	Bacteroides faecis	97,05882353	100
CAG:322	Bacteroides thetaiotaomicron	CAG:40	Bacteroides thetaiotaomicron	97,05882353	100
CAG:329	unclassified Clostridiales	CAG:244	Lachnoclostridium	100	100
CAG:329	unclassified Clostridiales	CAG:316	Lachnoclostridium	100	100
CAG:400	Clostridiales	CAG:326	NA	37,5	10
CAG:445	Prevotella	CAG:450	Prevotella	63,33333333	30,76923077
CAG:505	Clostridium sp. CAG:505 - Firmicutes bacterium CAG:466	CAG:466	Clostridium sp. CAG:505 - Firmicutes bacterium CAG:466	81,25	75
CAG:520	Prevotella sp. CAG:520	CAG:629	Prevotella stercorea	95,83333333	80
CAG:563	Ruminococcus sp. CAG:563	CAG:488	Ruminococcus sp. CAG:488	92,85714286	50



 HD healthy donors

 IgA def IgA deficiency

Supplementary table 3

4 Discussion

Les fonctions de l'IgA ont été longtemps peu explorées et restent en partie incomprises. Le déficit sélectif en IgA chez l'homme a été considéré comme asymptomatique dans la majorité des cas, laissant supposer que l'IgA pouvait jouer un rôle modeste, ou tout au plus redondant.

Les travaux récents menés principalement chez la souris ont permis d'avancer dans notre compréhension des fonctions de l'IgA à l'interface avec les muqueuses. Outre celui de "défense immunitaire" contre les agents pathogènes principalement par le biais de l'exclusion immunologique, l'IgA participe activement à l'établissement, la diversification, le modelage et la stabilité de la flore intestinale commensale notamment en exerçant une pression sélective sur les bactéries commensales. Les mécanismes de cette pression sont multiples et peuvent intervenir à plusieurs niveaux comme l'inhibition directe de la croissance bactérienne, la régulation de certains épitopes bactériens, l'exclusion immunologique mais l'inventaire ainsi que la description mécanistique sont encore loin d'être établis. De plus, et réciproquement, la "santé" du microbiote intestinal est nécessaire non seulement au métabolisme de l'hôte, mais aussi à l'induction, à l'éducation et au maintien de réponses immunitaires innées et adaptatives "non aberrantes" (54). Les souris déficitaires en IgA présentent globalement une susceptibilité accrue aux enteropathogènes, une dysbiose intestinale, une colite inflammatoire et dans certains cas une hyperplasie des îlots lymphoïdes folliculaires intestinaux et des centres germinatifs des plaques de Peyer, une hypertrophie des organes lymphoïdes secondaires et des stigmates périphériques d'auto-immunité. Ce phénotype est réversible après la restauration d'IgA intestinales (101, 108), élément qui suggère fortement le lien de causalité entre l'absence de l'immunoglobuline et les manifestations cliniques. Le déficit en IgA sélectif humain, lorsqu'il est symptomatique (ce qui semble être fréquent d'après la littérature récente), se caractérise par une triade (i) infections des muqueuses, et notamment infections

digestives, (ii) auto-immunité, (iii) maladies inflammatoires de l'intestin avec ou sans hyperplasie folliculaire lymphoïde. De plus, dans le DICV, l'absence d'IgA biaise le phénotype vers les infections digestives, l'entéropathie inflammatoire et la lymphoprolifération polyclonale (1, 151).

L'impact de l'absence d'IgA sur la composition du microbiote et ses répercussions locales et systémiques éventuelles n'a jamais été exploré chez l'homme. Pour aborder cette problématique, nous avons constitué une cohorte de 36 patients déficitaires en IgA (n=15 DICV et n=21 dIgA sélectifs) et de 34 témoins appariés en âge, en origine ethnique, en régime alimentaire chez qui nous avons prélevé les selles et le sang de manière concomitante.

Nous avons dans un premier temps mis au point une technique de détection des anticorps à la surface des bactéries par cytométrie en flux (premier article (152)) pour pouvoir identifier les bactéries interagissant avec le compartiment humoral. Nous avons appliqué cette technique dans les conditions expérimentales suivantes: (i) la détection d'anticorps à la surface de microbiotes coliques purifiés *ex-vivo*, (ii) la détection d'anticorps sériques ou issus de sécrétions à la surface de souches bactériennes pures et/ou de consortia complexes (microbiotes purifiés) et (iii) le tri des fractions interagissant ou non avec les anticorps. Van der Waaij *et al* (165) ont été les premiers à employer la cytométrie en flux en 1996 pour détecter les anticorps présents à la surface des selles totales non purifiées de témoins sains. L'isolation des bactéries coliques par gradient de densité (166) que nous avons réalisée dans cette étude permet d'obtenir un concentré de bactéries pur qui permet de s'affranchir du bruit de fond généré par les selles totales. De plus, l'emploi de cette technique nous permet de préserver les épitopes conformationnels, nous permettant ainsi d'être au plus près des conditions *in vivo*.

Dans le deuxième article, nous avons cherché à investiguer les conséquences de l'absence d'IgA sécrétoire sur la flore intestinale chez l'homme ainsi que les répercussions

systémiques d'une éventuelle dysbiose, travail inédit dans la littérature, en se plaçant dans un modèle humain "knock out" en IgA.

Nous nous sommes assurés en pré-requis à cette étude que le déficit en IgA sériques s'associait à un déficit en IgA intestinales libres et opsonisantes (le compartiment sécrétoire des patients déficitaires en IgA n'avait été étudié que dans les sécrétions nasales et salivaires (154, 161)). Ensuite, nous avons établi par séquençage métagénomique la composition globale des selles de n=17 patients et nous l'avons comparée à n=34 donneurs sains. L'analyse de la distribution des phyla majoritaires, de la diversité bactérienne globale ainsi qu'au sein de chaque phylum, de la richesse des espèces bactériennes et de la richesse génique bactérienne ne retrouve pas de différence majeure entre les patients et les témoins. Ces résultats suggèrent que l'absence d'IgA sécrétoire n'altère pas la structure globale du microbiote intestinal chez l'homme, contrairement aux modèles murins de déficit en AID (85, 108), en pIgR (109, 110) et en PD-1 (85). De plus, Kawamoto *et al.* (86) ont montré que l'altération de la diversité du répertoire IgA entraînait une réduction de la diversité bactérienne que nous n'observons pas chez l'homme. Cette différence peut être due à (i) la présence de mécanismes compensatoires, (ii) le déficit en IgA humain s'installe avec le temps et n'est pas néonatal contrairement aux modèles murins expliquant une altération moins marquée ou (iii) à un autre niveau d'altération non appréhendé par cette analyse.

Nous avons ensuite observé qu'il existait une fraction restreinte du microbiote qui interagissait avec les IgA à hauteur d'un pourcentage médian de 7,6% du microbiote total des donneurs sains (pourcentage superposable à celui retrouvé dans la littérature (51)) et nous avons identifié cette fraction par séquençage métagénomique après enrichissement par tri magnétique chez n=30 donneurs sains. L'enrichissement par tri magnétique introduit une difficulté supplémentaire dans l'analyse car les fractions IgA- et IgA+ ne sont pas pures, et un chevauchement dans l'identification des fractions est attendu. L'utilisation de l'approche des

gènes différentiels décrite par Qin *et al.* (159) pour déterminer les espèces différentielles nous a permis d'identifier n=30 candidats bactériens IgA+. Il s'agit en majorité de Firmicutes dont la plupart sont non identifiées au delà de ce niveau taxonomique. Le reste des phyla concernés sont les Protéobactéries et les Actinobactéries. Seulement une espèce appartient au phylum Bacteroidetes pourtant majoritaire dans le colon, reflétant potentiellement à la fois le caractère spécifique de l'opsonisation par l'IgA et le site d'induction majoritaire des réponses IgA iléal et non colique (15) (l'absence de réponses IgA intestinales contre la plupart des Bacteroidiales a été montrée *in vitro* par Western Blot en utilisant des IgA fécales (188)). Par ailleurs, nous retrouvons 3 espèces totalement inconnues. Les bactéries IgA+ que nous retrouvons sont superposables aux résultats publiés dans la littérature (24, 50, 51, 167) (cf tableau, annexe1) à l'exception d'*Akkermansia muciniphila* que nous ne retrouvons pas. Il est en revanche intéressant de noter que nous retrouvons trois espèces du genre *Intestinibacter*, qui a récemment été décrit dans la littérature et qui présente des gènes de résistance au stress oxydatif ainsi que des gènes codant pour le métabolisme de la dégradation du fucose, en faisant un candidat potentiel à la dégradation de la mucine (37), le localisant ainsi dans le mucus intestinal à l'instar d'*Akkermansia muciniphila*. De plus, plusieurs espèces appartiennent à des genres qui constituent le "core-microbiome" décrit par Falony *et al* (30). (*Clostridium sp*, *Ruminococcus torques*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus comes*). En outre, certaines espèces appartiennent aux genres qui colonisent en premier les nouveaux nés (24) (cf *Figure 2* de l'introduction) comme *Bifidobacterium bifidum*, *Anaerostipes hadrus*, *Ruminococcus torques*, *Faecalibacterium* et *Eubacterium sp*. Ces résultats plaident pour la contribution des réponses IgA dans le maintien et la stabilité du microbiote ainsi que pour la mémoire des réponses IgA induites à la naissance. Ainsi, les bactéries commensales inductrices de réponses IgA seraient d'une part les premières colonisatrices du nouveau né, et

d'autre part des bactéries majoritairement iléales et proches de la muqueuse. La stabilité de cet équilibre écologique serait ainsi assurée en partie par les réponses IgA.

Etant donné que la comparaison initiale peu résolutive entre les microbiotes sains et malades n'avait pas retrouvé de différence, nous avons recherché les espèces différentielles entre les deux groupes par la même approche des gènes différentiels (159). Nous retrouvons n=19 espèces surreprésentées versus n=14 espèces sous-représentées dans le groupe des patients en comparaison aux témoins. Les bactéries sous-représentées chez les patients sont peu diverses et appartiennent principalement au phylum Firmicutes, notamment deux espèces appartenant au genre *Faecalibacterium*, dont les propriétés anti-inflammatoires sur la muqueuse intestinale sont décrites (189, 190), diminution aussi observée dans la maladie de Crohn (46). En revanche, les espèces sur-représentées chez les patients sont diversifiées; on observe deux espèces du genre *Prevotella*, dont Elinav *et al.* (170) ont démontré les propriétés pro-inflammatoires et "colitogéniques" dans un modèle murin de déficit en NLRP6. Par ailleurs, comme dans les modèles murins, on retrouve une sur-représentation de Gamma-protéobactéries et notamment d'Enterobacteriaceae, de Pasteurellaceae et de Moraxellaceae, dont les propriétés pro-inflammatoires sont décrites, notamment par le biais du LPS (lipopolysaccharide) (191). Enfin, 3 espèces sur-représentées appartiennent habituellement à la flore orale : *Streptococcus sanguinis*, *Haemophilus parainfluenzae* et *Veilonella parvula*. Il est intéressant de noter que *Streptococcus sanguinis* et *Veilonella parvula* sont impliquées dans la formation de biofilms et seraient pro-inflammatoires (171, 172). En outre, les trois espèces sont impliquées dans les infections de l'endocarde chez l'homme. Notons que *Veilonella parvula* a déjà été rapportée dans un cas de sepsis chez un patient présentant une agammaglobulinémie de Bruton (173). Ce déficit immunitaire est caractérisé par une absence de lymphocytes B, et donc, notamment, d'IgA, renforçant l'hypothèse selon laquelle l'IgA est nécessaire au contrôle de cette espèce. Ainsi, les patients déficitaires en IgA présentent une

dysbiose modérée caractérisée par la diminution de certaines espèces anti-inflammatoires et l'augmentation d'espèces potentiellement pro-inflammatoires.

Enfin, en comparant les familles des espèces IgA⁺ de nos témoins à celles des espèces différentielles entre les patients et les témoins, on observe que toutes les familles diminuées chez les patients sauf une (Bacteroidaceae) sont ciblées par l'IgA et que 3 familles surreprésentées chez les patients seulement sont ciblées par l'IgA (Ruminococcaceae, Enterobacteriaceae, et Eubacteriaceae) si on se base uniquement sur nos témoins et 2 familles se rajoutent en compilant les résultats de la littérature (Streptococcaceae et Erysipelotrichaceae, cf tableau 1 annexe 2). Ces résultats suggèrent que l'absence d'IgA induit directement à la fois la perte de certaines espèces et l'expansion de certaines autres. Plus précisément, si on se place au niveau le plus résolutif de l'analyse, on retrouve deux espèces, *Coprococcus comes* (CAG19) et *Escherichia coli* (CAG4) qui sont à la fois ciblées par les IgA et à la fois différentielles, la première étant sous-représentée et la deuxième étant sur-représentée. Cette dualité reflète bien la contribution de l'IgA dans l'homéostasie bactérienne, en contrôlant certaines espèces d'une part, et en en protégeant d'autres d'autre part. Les mécanismes expliquant cette observation ne sont pas connus. Certes, les IgA contrôlent l'expansion de certaines bactéries par inhibition directe (101), répression de certains épitopes (94, 104), mais aussi possiblement par le biais de l'exclusion immunologique en éloignant les micro-organismes d'une niche ou d'un milieu favorable. A l'inverse, il est possible de proposer que les IgA peuvent agréger certaines bactéries et les localiser ainsi dans un milieu favorable (comme le mucus), et/ou favoriser les interactions entre elles. Par ailleurs, nous observons dans le déficit en IgA sélectif la sur-représentation d'espèces qui ne sont pas ciblées par l'IgA, et qui sont probablement une conséquence indirecte de l'absence d'IgA. Pour terminer, nous ne retrouvons pas, en l'absence d'IgA, de sur-représentation d'espèces classiquement impliquées dans les infections digestives des patients déficitaires en IgA (*Salmonella*,

Campylobacter). Ces observations soulignent bien que le rôle de l'IgA n'est pas limité à celui d'une opsonine neutralisante.

Nous avons ensuite étudié les conséquences locales de l'absence d'IgA et recherché la présence d'autres immunoglobulines à la surface des microbiotes des patients. La présence de plasmocytes IgM⁺ et non IgA⁺ dans la muqueuse intestinale ainsi que la sécrétion d'IgM salivaire dans le déficit en IgA humain avaient déjà été décrites (155, 175, 192). De plus, dans les modèles murins de déficit en IgA (15, 106-108), on observe une augmentation de la sécrétion d'IgM dans les muqueuses et des réponses IgM après vaccination muqueuse. Nous retrouvons la présence d'IgM libres mais aussi opsonisantes chez les patients (ce qui n'avait pas été montré chez l'homme), et de manière intéressante IgM et IgA ne sont pas co-sécrétées chez les témoins. Ainsi, l'IgM est sécrétée uniquement en cas d'absence d'IgA. Ceci est renforcé par l'étude de n=3 déficits en IgA partiels (résultats non montrés) qui ont systématiquement une co-opsonisation IgA/IgM dans les selles. La sécrétion d'IgA et non d'IgM chez les sujets sains peut s'expliquer par la prédominance de plasmocytes IgA⁺ dans les muqueuses d'une part, et la stabilité supérieure du complexe IgA-pièce sécrétoire versus IgM-pièce sécrétoire (2). Nous avons ensuite séparé les fractions IgM⁺ et IgM⁻ chez n=10 patients par cytométrie en flux, ce qui nous a permis d'obtenir des fractions très pures mais une quantité faible d'échantillon par fraction, nous amenant à réaliser une identification par séquençage 16-S et non par analyse métagénomique. L'analyse par pyroséquençage est moins résolutive et ne nous a pas permis d'explorer les OTU au delà du niveau taxonomique du genre. L'enrichissement des genres dans la fraction IgM⁺ a été mesuré par le ratio des abondances des OTU dans chaque fraction (abondance OTU fraction IgM⁺/ abondance OTU fraction IgM⁻) comme décrit dans la littérature (15, 50, 51). Cette analyse retrouve une grande variabilité inter-individuelle dans les spécificités des IgM, résultat inédit dans la littérature. Nous avons voulu savoir si la sécrétion d'IgM compensait vraiment l'absence d'IgA, qui est

une des hypothèses admises dans la littérature pour expliquer le caractère paucisymptomatique du déficit en IgA. En examinant plus précisément les genres ciblés par l'IgA dans notre cohorte de témoins sains, on observe que l'IgM opsonise les genres *Faecalibacterium*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (tous Gram positifs) mais qu'elle n'opsonise pas la famille des Enterobacteriaceae dont le chef de file est *Escherichia coli*, qui est par ailleurs sur-représenté chez les patients. Par ailleurs, on observe qu'elle opsonise de manière significative le genre *Pseudomonas*, appartenant à la classe des Gammaprotéobactéries. Bunker *et al.* (15) ont comparé l'opsonisation par IgM dans un groupe de souris AID^{-/-} à l'opsonisation par IgA dans un groupe de souris AID^{+/-} et ont retrouvé les mêmes genres, concluant que les deux immunoglobulines étaient équivalentes. En revanche, les travaux de l'équipe de S. Fagarasan (85, 86, 107, 108), retrouvent tous une altération quantitative et qualitative du microbiote intestinal quelque soit le modèle de déficit en IgA étudié, malgré la présence d'IgM, argument allant contre l'équivalence des deux immunoglobulines.

Nos résultats montrent donc que l'IgM opsonise certains genres commensaux également opsonisés par l'IgA. Cette interaction pourrait faire intervenir la pièce sécrétoire, car il s'agit de bactéries Gram positif (89). Nous montrons aussi que l'IgM n'opsonise pas, à l'exception du genre *Pseudomonas*, les Gammaprotéobactéries. Cette mauvaise opsonisation des Gammaprotéobactéries n'est pas surprenante, en effet les patients sont plus susceptibles aux infections par les entéropathogènes que la population générale, et pourrait par conséquent expliquer cette susceptibilité. De manière beaucoup plus inattendue, nos résultats suggèrent aussi que l'opsonisation par les IgM permet de maintenir la diversité au sein du phylum Actinobacteria. Cette interprétation est étayée par le fait que la diversité du phylum Actinobacteries est nettement réduite dans le DICV où on note une absence d'IgM sécrétoire chez 6/7 patients analysés (Figure supplémentaire S4). Kawamoto *et al.* (86) ont démontré dans des souris déficitaires en lymphocytes B que l'absence d'IgA induisait une réduction

drastique de la diversité bactérienne, notamment dans le phylum Firmicutes. *Ainsi les réponses IgM seraient utiles à la persistance et à la diversité de certaines espèces "bénéfiques" à l'hôte comme les Actinobactéries, le Faecalibacterium et le Clostridium et seraient moins efficaces dans le contrôle des pathobiontes.*

Nous avons voulu ensuite savoir si ces modifications du microbiote intestinal avaient une répercussion systémique chez les patients. Le phénotype lymphocytaire T CD4⁺ circulant ainsi que les dosages cytokiniques sériques retrouvent un biais du phénotype circulant vers une différenciation Th17 (193). Ce phénotype ne reflète pas obligatoirement le phénotype muqueux, et n'est donc pas forcément le reflet de la dysbiose intestinale mais Kemola *et al.* (175) avaient montré la présence d'une infiltration de lymphocytes T activés à haut index de prolifération par immunohistochimie dans les biopsies jéjunales de patients déficitaires en IgA en les comparant à des témoins sains. Par ailleurs, notons que l'induction de Th17 par des bactéries commensales dans des modèles murins présentant une maladie auto-immune a été rapportée (194). Pour préciser le lien entre la dysbiose et les anomalies lymphocytaires T systémiques observées, nous avons dosé le CD14 soluble, qui est clivé après liaison du LPS aux monocytes et est donc un reflet indirect de la translocation de bactéries Gram négatif (177), qui est élevé chez les patients, contrairement à ce qui avait été retrouvé dans la littérature (195). En outre, nous retrouvons un pourcentage de lymphocytes T CD4⁺PD1⁺ plus élevé chez les patients, reflétant potentiellement l'activation chronique et l'épuisement cellulaire induit par la translocation bactérienne, comme cela avait été montré dans le DICV (176). Par ailleurs, l'absence d'IgA monomérique circulante chez les patients peut aussi contribuer à l'inflammation systémique retrouvée, étant donné le rôle inhibiteur de l'IgA sérique décrit dans l'introduction de ce manuscrit (70-72).

Enfin, nous avons voulu savoir si l'absence d'IgA avait un impact sur le réseau bactérien c'est-à-dire sur les liens d'inter-dépendance que les bactéries établissent entre elles.

Nielsen *et al.* (9) ont modélisé *in silico* à partir du séquençage métagénomique de 396 donneurs sains un réseau bactérien basé sur la co-présence et la covariance des bactéries. Ils ont ainsi identifié 45 liens retrouvés systématiquement chez tous les donneurs, reflétant potentiellement un "squelette" d'interactions obligatoire ("core-interdependance"). En raison du faible nombre d'échantillons, la même analyse n'a pas pu être reproduite dans notre cohorte mais les 45 liens ont été recherchés dans les deux groupes. Il semblerait que les patients perdent au moins partiellement 15 liens, ce qui suggère que l'architecture de base est perturbée en l'absence d'IgA. La signification biologique de cette perte de liens n'est pas établie, cette étude ayant été modélisée *in silico*.

Les limitations de cette étude sont le biais de recrutement des patients, dont le déficit en IgA est symptomatique car ils sont recrutés à l'hôpital dans des centres d'expertise. Par ailleurs, ce recrutement implique une hétérogénéité du phénotype clinique car les patients ne présentent pas tous les mêmes complications (cf Annexe 4). De plus, le nombre faible de patients (en partie expliqué par l'exclusion des patients sous antibiothérapie en cours ou récente) nous empêche par conséquent (i) de réaliser une analyse en sous-groupes basée sur les phénotypes cliniques et (ii) de réaliser des corrélations statistiques entre le phénotype biologique et le phénotype clinique. De plus, la plupart des patients présentent un transit altéré ce qui n'a pas été stratifié selon le Bristol stool score (35) et peut induire un biais dans l'analyse. D'autre part, les facteurs déterminant la composition du microbiote n'ont pas tous été contrôlés systématiquement. En effet, nous avons certes exclu les individus ayant reçu une antibiothérapie et/ou des laxatifs dans les trois mois précédant l'inclusion, mais les autres facteurs extrinsèques n'ont pas systématiquement été recherchés. Les facteurs intrinsèques comme l'âge et le régime alimentaire ont été contrôlés, mais la description du régime alimentaire est très succincte et se limite à la recherche des exclusions alimentaires (absence de viande, de produits laitiers, de porc, régime sans gluten). Enfin, l'analyse de la fonction des

gènes bactériens ainsi que l'analyse des selles aux niveaux transcriptomique et protéomique n'a pas été réalisée dans ce travail.

5 Conclusions et Perspectives

Les travaux récents de la littérature suggèrent que les réponses IgA intestinales sont nécessaires non seulement à la défense contre les entéro-pathogènes mais aussi à l'établissement, au façonnement et à la stabilité de la flore intestinale commensale. A l'inverse, la "santé" de la flore intestinale commensale est cruciale pour l'hôte, notamment au plan immunologique, permettant l'induction et l'éducation du système immunitaire. Les souris déficitaires en IgA présentent une altération quantitative et qualitative du microbiote intestinal, une susceptibilité accrue aux entropathogènes, une colite inflammatoire associée à une hyperplasie des centres germinatifs muqueux et des organes lymphoïdes secondaires avec des stigmates périphériques d'auto-immunité. La normalisation du phénotype par la restauration des IgA suggère que la symptomatologie s'explique par l'absence de cette immunoglobuline. Le déficit en IgA humain, longtemps considéré comme asymptomatique, présente des caractéristiques communes avec le phénotype murin et notamment la susceptibilité aux infections digestives, l'association aux maladies inflammatoires de l'intestin, l'hyperplasie nodulaire lymphoïde et les maladies auto-immunes. Dans ce travail, nous avons voulu savoir si l'absence d'IgA chez l'homme s'associait à une dysbiose intestinale, et si elle avait des répercussions locales et/ou systémiques.

Nos résultats suggèrent, sous réserve des biais de l'étude, que le déficit en IgA humain se caractérise par des modifications du répertoire bactérien avec une diminution en bactéries anti-inflammatoires et une expansion de bactéries pro-inflammatoires d'une part, et une altération de l'architecture du réseau bactérien "obligatoire". De plus, l'absence de réponses IgA s'associe à la présence de réponses IgM qui contrôlent de manière insuffisante les entéro-pathogènes mais permettent de maintenir la diversité des Actinobactéries. Enfin, les patients présentent un biais et un épuisement du phénotype lymphocytaire T circulant pouvant refléter la stimulation antigénique chronique par translocation bactérienne répétée. De

manière plus fondamentale, cette étude nous a permis de mettre en évidence la complexité de la fonction de l'IgA, et son rôle double dans l'homéostasie de la flore intestinale car son absence peut induire à la fois une expansion et une diminution en espèces bactériennes qu'elle opsonise habituellement.

Ces travaux laissent plusieurs questions en suspens et ouvrent de nombreuses perspectives.

L'analyse de la fonction des gènes bactériens ainsi que l'analyse transcriptomique et protéomique des selles sera réalisée ultérieurement. En effet, Shulzenko *et al.* (191) ont démontré que la voie *Interferon γ* était surexprimée dans les cellules épithéliales intestinales de patients DICV (n=3), aux dépens de la voie d'absorption lipidique épithéliale expliquant leur diarrhée de malabsorption. De plus, il serait intéressant d'augmenter le nombre de patients ainsi que de recruter des patients non symptomatiques pour pouvoir (i) confirmer nos travaux, (ii) réaliser des corrélations statistiques entre les complications cliniques et le profil "immuno-microbien" des patients. Cette corrélation pourra mettre en évidence un lien entre la dysbiose et les manifestations cliniques des patients. Nous sommes en outre en train de préciser les répercussions systémiques humorales associées au déficit en IgA.

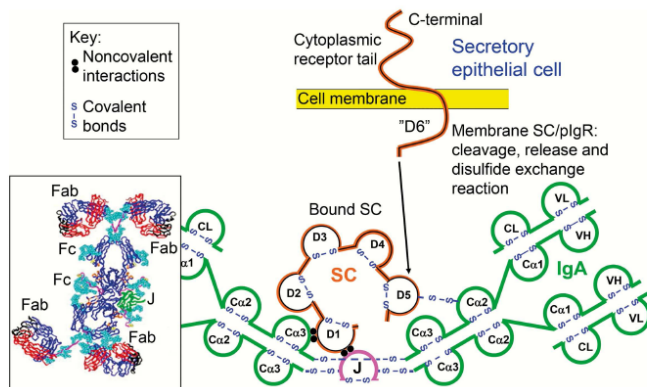
Par ailleurs, plusieurs questions fondamentales sur la physiologie de l'IgA persistent telles que (i) l'identification des épitopes bactériens commensaux immunogènes, (ii) l'affinité des réponses IgA, (iii) la spécificité de ces réponses impliquant la réactivité croisée éventuelle de ces anticorps. Plusieurs stratégies pourraient répondre à ces questions, il faut premièrement pouvoir disposer d'une source d'IgA sécrétoires et pouvoir ensuite cribler leurs spécificités. Pour la première partie, les IgA intestinales peuvent être obtenues par immortalisation des lymphocytes B mémoire IgA+ isolés de l'intestin (travail en cours dans le laboratoire), la génération d'anticorps monoclonaux *in vitro* et le criblage secondaire des surnageants de culture. La purification d'IgA polyclonales à partir des sécrétions (travail réalisé, cf article

Nature Protocols) permet aussi d'obtenir une source d'IgA sécrétoires, polyclonales cette fois. Le criblage des bactéries cibles peut se faire par cytométrie en flux (bactéries entières vivantes) et par Western Blot (lysats bactériens). Ensuite, pour identifier les épitopes immunogènes, on pourrait isoler les bandes d'intérêt sur la membrane de Western Blot, et/ou récupérer les complexes immuns mis en évidence par cytométrie en flux et identifier les épitopes par spectrométrie de masse. On pourrait aussi imaginer cribler les anticorps monoclonaux contre des protéines bactériennes purifiées par ELISA.

Enfin, ce travail ouvre la perspective d'applications thérapeutiques. En effet, les patients présentent une altération qualitative de la flore intestinale associée à une translocation bactérienne et un biais du phénotypage lymphocytaire T, anomalies encore plus marquées dans le DICV (164). Ces anomalies pourraient contribuer à expliquer les complications cliniques associées au déficit en IgA. De plus, beaucoup de patients reçoivent des antibiothérapies itératives qui favorisent et/ou entretiennent certainement la dysbiose. Nous proposons donc de réaliser chez ces patients une transplantation fécale complète ou une transplantation de quelques espèces ciblées seulement associée à une supplémentation orale en IgA. Nous espérons que cette thérapeutique permettra de (i) corriger la dysbiose, (ii) de diminuer la consommation d'antibiotiques et enfin (iii) d'améliorer les symptômes des patients notamment l'inflammation digestive et les complications auto-immunes.

6 Annexes

6.1 Annexe 1 : Structure des IgA sécrétoires



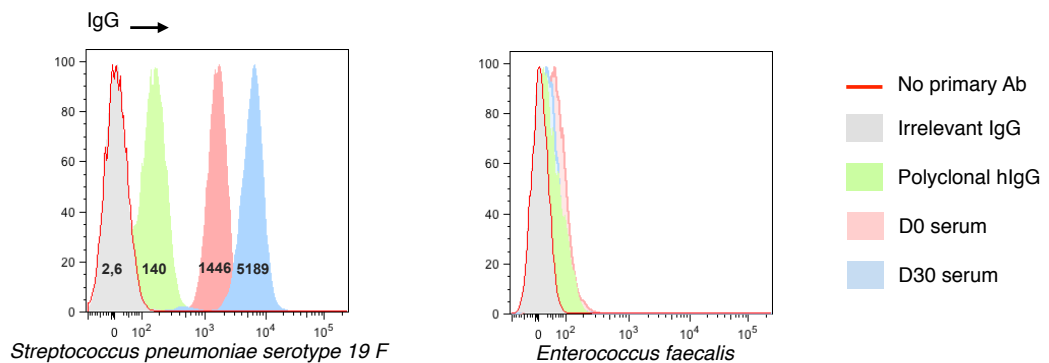
Brandtzaeg, *Frontiers in Immunology*, August 2013 (2)

Le dimère d'IgA, dont les deux monomères sont reliés de manière covalente par la chaîne J, s'associe de manière covalente au domaine extra-cellulaire du pIgR qui constitue la pièce sécrétoire. La liaison de la pièce sécrétoire au pentamère d'IgM est non covalente (non montré). SC: secretory component. J: chaîne de liaison J.

6.2 Annexe 2: Tableau des taxons commensaux intestinaux humains IgA+

Article	Class	Family	Studied population	Sequencing technique
D'Auria et al, Sci rep, 2013, <i>Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-represented microbiota core</i>	Actinobacteria	Nocardiaceae	Healthy adults n =6 donors	16S
	Bacteroidia	Bacteroidaceae		
	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae		
		ud-Sphingomonadales		
	Betaproteobacteria	Comamonadaceae		
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae		
	Clostridia	Enterococcaceae		
		Ruminococcaceae		
		Lachnospiraceae		
	Streptococcaceae			
Kau et al, Sci Transl Med, 2015 <i>Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from malnourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy</i>	Family	Species (OTU)	Children	16 S Discordant twin pairs for Kwashiorkor
	Enterobacteriaceae	E.coli	Kwashiorkor (n=11)	
		K.variicola		
		C.amalonaticus		
		E.hirae		
		E.casseliflavus		
		B.intestinalis		
		B.thetaiotaomicron		
		B.uniformis		
		B.fragilis		
		P.distasonis		
	Family	Species (OTU)	Healthy (n=11)	
	Verrucomicrobiaceae	Akkermansia muciniphila		
	Streptococcaeae	Streptococcus salivarius		
	Clostridiaceae			
Enterobacteriaceae	E coli/other Shigella			
Palm et al, Cell, 2014 <i>Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease.</i>	Family	Species (OTU)	Adults	16 S
	Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus torques</i>	Healthy n=20	
	Bifidobacteriaceae	UC Bifidobacterium		
	Verrucomicrobiaceae	Akkermansia muciniphila		
	Lachnospiraceae	Dorea spp		
	Erysipelotrichaceae	UC Erysipelotrichaceae		
	Actinomycetaceae	Actinomyces spp		
	Family	Species (OTU)	Ulcerative Colitis- Crohn n=27 CD n=8 UC	
	Lachnospiraceae	<i>Ruminococcus torques</i>		
	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium spp		
	Erysipelotrichaceae	UC Erysipelotrichaceae		
	Streptococcaceae	UC Streptococcus		
	Actinomycetaceae	Actinomyces spp		
Streptococcaceae	Streptococcus spp			
Planer et al, Nature 2016 <i>Developpement of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice</i>		Species (OTU)	Children	16 S
		<i>Ruminococcus torques</i>	Healthy n=41 twin pairs 24 months	
		Akkermansia muciniphila (n=2 different strains)		
		Clostridium nexile		
		Clostridium spiroforme		
		Bifidobacterium bifidum		
		Ruminococcus gnavus		
		Escherichia coli		

6.3 Annexe 3: Evaluation de la réponse vaccinale anti-pneumococcique par cytométrie en flux



Détection par cytométrie en flux des IgG anti-pneumocoque dans le serum d'une patiente vaccinée par le Pneumo 23®

Le serum d'une patiente a été prélevé avant (J0) et 30 jours (J30) après vaccination anti-pneumococcique. La mesure des titres anti-pneumococciques a été réalisée par cytométrie en flux après incubation de 10^5 *Streptococcus pneumoniae de serotype 19F* avec le serum d'intérêt (J0: histogramme rose, J30: histogramme bleu) ainsi qu'avec une solution d'immunoglobulines polyvalentes (polyclonal hIgG, histogramme vert) à titre de contrôle positif (concentrations normalisées d'IgG: $10\mu\text{g/mL}$). Les contrôles négatifs sont (i) un anticorps monoclonal chimérique de type IgG1 (Irrelevant IgG, $10\mu\text{g/mL}$, en gris) à titre de contrôle de l'anticorps primaire, (ii) l'anticorps secondaire sans anticorps primaire (Ligne rouge), et (iii) *Enterococcus faecalis*, représentant le contrôle négatif d'espèces (incubée dans les mêmes conditions expérimentales). Les médianes de fluorescence sont indiquées directement à l'intérieur des histogrammes.

6.4 Annexe 4: Récapitulatif des caractéristiques cliniques de la cohorte

	Témoins sains n (%)	Patients DIgA n (%)	Patients DICV n (%)	Valeur P
Nombre d'individus	34	21	15	
Age median	32,9 [23-61] ⁺	36 [18-67]	47 [26-70] ⁺	0,05
Sexe Ratio F: H	1:1	2:1	1:1	
IMC (index de masse corporelle)	21,9 [18,7 – 33,9]	22 [19,1-36]	ND	NS
Origine Ethnique				
Caucasienne	23 (68)	18 (86)	10 (66)	NS
Afrique du Nord	4 (11)	3 (14)	5 (34)	
Africaine	1 (3)	0	0	
Moyen Orient	4 (11)	0	0	
Asiatique	2 (5)	0	0	
Régime alimentaire				
varié	34 (100)	17 (80)	13 (90)	NS
végétarien	0	1 (5)	0	
sans gluten	0	2 (10)	1(5)	
sans porc	0	1(5)	1(5)	
Infections*	-	16 (76)	15(100)	
ORL/pulmonaires		12 (57)	15(100)	
Digestives		3(14)	4 (27)	
Vaginales		6/14 (42)	1/7(14)	
Antibiothérapie (>1/an)		12 (57)	11 (73)	
Maladies auto-immunes *		11 (52)	4(27)	
Cytopénies auto-immunes		5 (24)	4	
LES**/Sjögren		4 (19)	1	
Hashimoto		4 (19)	0	
Maladie Coeliaque		2(10)	0	
Maladie de Biermer		1(5)	0	
Vitiligo		2(10)	0	
Diabète de type 1		1(5)	0	
Spondylarthrite ankylosante		1(5)	0	
Symptomatologie digestive***		9(43)	11(73)	

* au moins une des infections ou une des maladies auto-immunes citées en dessous

** LES : Lupus erythémateux systémique

*** au moins un symptôme parmi diarrhée chronique ou douleurs abdominales hebdomadaires

7 Références bibliographiques

1. H. Chapel *et al.*, Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. *The Journal of allergy and clinical immunology* **130**, 1197-1198 e1199 (2012).
2. P. Brandtzaeg, Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Frontiers in immunology* **4**, 222 (2013).
3. L. V. Hooper, A. J. Macpherson, Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology* **10**, 159-169 (2010).
4. H. Sokol *et al.*, Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, (2016).
5. C. L. Monaco *et al.*, Altered Virome and Bacterial Microbiome in Human Immunodeficiency Virus-Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Cell host & microbe* **19**, 311-322 (2016).
6. V. Thomas, J. Clark, J. Dore, Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future microbiology* **10**, 1485-1504 (2015).
7. G. Meric, M. D. Hitchings, B. Pascoe, S. K. Sheppard, From Escherich to the Escherichia coli genome. *The Lancet. Infectious diseases* **16**, 634-636 (2016).
8. S. A. Sankar, J. C. Lagier, P. Pontarotti, D. Raoult, P. E. Fournier, The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Systematic and applied microbiology* **38**, 276-286 (2015).
9. H. B. Nielsen *et al.*, Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature biotechnology* **32**, 822-828 (2014).
10. Y. Hu *et al.*, Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature communications* **4**, 2151 (2013).
11. H. V. Lin *et al.*, Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PloS one* **7**, e35240 (2012).
12. A. M. Seekatz, V. B. Young, Clostridium difficile and the microbiota. *The Journal of clinical investigation* **124**, 4182-4189 (2014).
13. J. Qin *et al.*, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65 (2010).
14. G. P. Donaldson, S. M. Lee, S. K. Mazmanian, Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature reviews. Microbiology* **14**, 20-32 (2016).
15. J. J. Bunker *et al.*, Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* **43**, 541-553 (2015).
16. J. L. Kubinak *et al.*, MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell host & microbe* **17**, 153-163 (2015).
17. K. Aagaard *et al.*, The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine* **6**, 237ra265 (2014).
18. L. Fernandez *et al.*, The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research* **69**, 1-10 (2013).
19. M. G. Dominguez-Bello *et al.*, Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11971-11975 (2010).
20. M. G. Dominguez-Bello *et al.*, Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature medicine* **22**, 250-253 (2016).
21. A. Sevelsted, J. Stokholm, K. Bonnelykke, H. Bisgaard, Cesarean section and chronic immune disorders. *Pediatrics* **135**, e92-98 (2015).
22. E. S. Lim *et al.*, Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nature medicine* **21**, 1228-1234 (2015).
23. T. Yatsunenکو *et al.*, Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222-227 (2012).

24. J. D. Planer *et al.*, Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature* **534**, 263-266 (2016).
25. J. J. Faith *et al.*, The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* **341**, 1237439 (2013).
26. I. Martinez, C. E. Muller, J. Walter, Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. *PloS one* **8**, e69621 (2013).
27. M. J. Claesson *et al.*, Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **488**, 178-184 (2012).
28. E. Biagi *et al.*, Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PloS one* **5**, e10667 (2010).
29. M. J. Claesson *et al.*, Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl 1**, 4586-4591 (2011).
30. G. Falony *et al.*, Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* **352**, 560-564 (2016).
31. A. Zhernakova *et al.*, Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* **352**, 565-569 (2016).
32. G. D. Wu *et al.*, Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105-108 (2011).
33. J. L. Kubinak *et al.*, MHC variation sculpts individualized microbial communities that control susceptibility to enteric infection. *Nature communications* **6**, 8642 (2015).
34. P. J. Turnbaugh *et al.*, A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**, 480-484 (2009).
35. D. Vandeputte *et al.*, Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* **65**, 57-62 (2016).
36. M. A. Jackson *et al.*, Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut* **65**, 749-756 (2016).
37. K. Forslund *et al.*, Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262-266 (2015).
38. D. M. Fonseca *et al.*, Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. *Cell* **163**, 354-366 (2015).
39. M. Joossens *et al.*, Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* **60**, 631-637 (2011).
40. C. A. Lozupone, J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, R. Knight, Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220-230 (2012).
41. P. J. Turnbaugh *et al.*, The human microbiome project. *Nature* **449**, 804-810 (2007).
42. M. Arumugam *et al.*, Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-180 (2011).
43. E. van Nood *et al.*, Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England journal of medicine* **368**, 407-415 (2013).
44. E. Le Chatelier *et al.*, Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541-546 (2013).
45. A. Cotillard *et al.*, Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585-588 (2013).
46. H. Sokol *et al.*, *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16731-16736 (2008).
47. S. Jangi *et al.*, Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature communications* **7**, 12015 (2016).
48. J. Chen *et al.*, Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific reports* **6**, 28484 (2016).
49. J. U. Scher *et al.*, Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife* **2**, e01202 (2013).
50. A. L. Kau *et al.*, Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Science translational medicine* **7**, 276ra224 (2015).

51. N. W. Palm *et al.*, Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* **158**, 1000-1010 (2014).
52. K. Berer *et al.*, Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* **479**, 538-541 (2011).
53. N. Kamada, G. Y. Chen, N. Inohara, G. Nunez, Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology* **14**, 685-690 (2013).
54. T. Gensollen, S. S. Iyer, D. L. Kasper, R. S. Blumberg, How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* **352**, 539-544 (2016).
55. Ivanov, II *et al.*, Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498 (2009).
56. K. Atarashi *et al.*, Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337-341 (2011).
57. P. A. Crabbe, H. Bazin, H. Eyssen, J. F. Heremans, The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ-free intestinal tract. *International archives of allergy and applied immunology* **34**, 362-375 (1968).
58. N. K. Surana, D. L. Kasper, Deciphering the tete-a-tete between the microbiota and the immune system. *The Journal of clinical investigation* **124**, 4197-4203 (2014).
59. J. M. Natividad, E. F. Verdu, Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacological research* **69**, 42-51 (2013).
60. M. A. Otten, M. van Egmond, The Fc receptor for IgA (FcalphaRI, CD89). *Immunology letters* **92**, 23-31 (2004).
61. H. C. Morton, P. Brandtzaeg, CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* **49**, 217-229 (2001).
62. C. Andre, F. Andre, C. Fargier, Distribution of IgA 1 and IgA 2 plasma cells in various normal human tissues and in the jejunum of plasma IgA-deficient patients. *Clinical and experimental immunology* **33**, 327-331 (1978).
63. C. D. Castro, M. F. Flajnik, Putting J chain back on the map: how might its expression define plasma cell development? *Journal of immunology* **193**, 3248-3255 (2014).
64. W. Holtmeier, A. Hennemann, W. F. Caspary, IgA and IgM V(H) repertoires in human colon: evidence for clonally expanded B cells that are widely disseminated. *Gastroenterology* **119**, 1253-1266 (2000).
65. A. Lemke *et al.*, Long-lived plasma cells are generated in mucosal immune responses and contribute to the bone marrow plasma cell pool in mice. *Mucosal immunology* **9**, 83-97 (2016).
66. R. C. Monteiro, J. G. Van De Winkel, IgA Fc receptors. *Annual review of immunology* **21**, 177-204 (2003).
67. J. Diana *et al.*, Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice. *Journal of immunology* **191**, 2335-2343 (2013).
68. N. Rochereau *et al.*, Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS biology* **11**, e1001658 (2013).
69. T. N. Kazeeva, A. B. Shevelev, IgA-specific proteins of pathogenic bacteria. *Biochemistry. Biokhimiia* **74**, 12-21 (2009).
70. U. Blank, P. Launay, M. Benhamou, R. C. Monteiro, Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. *Immunological reviews* **232**, 59-71 (2009).
71. B. Pasquier *et al.*, Identification of FcalphaRI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcRgamma ITAM. *Immunity* **22**, 31-42 (2005).
72. Y. Kanamaru *et al.*, Inhibitory ITAM signaling by Fc alpha RI-FcR gamma chain controls multiple activating responses and prevents renal inflammation. *Journal of immunology* **180**, 2669-2678 (2008).
73. S. Ben Mkaddem, E. Rossato, N. Heming, R. C. Monteiro, Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): from autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmunity reviews* **12**, 666-669 (2013).
74. A. P. Baptista *et al.*, Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events. *Mucosal immunology* **6**, 511-521 (2013).

75. M. A. Berkowska *et al.*, Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* **118**, 2150-2158 (2011).
76. M. J. Shi, J. Stavnezer, CBF alpha3 (AML2) is induced by TGF-beta1 to bind and activate the mouse germline Ig alpha promoter. *Journal of immunology* **161**, 6751-6760 (1998).
77. B. B. Cazac, J. Roes, TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* **13**, 443-451 (2000).
78. S. Borte *et al.*, Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood* **114**, 4089-4098 (2009).
79. E. Castigli *et al.*, Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3903-3908 (2004).
80. F. Briere *et al.*, Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *The Journal of clinical investigation* **94**, 97-104 (1994).
81. A. Malik *et al.*, IL-33 regulates the IgA-microbiota axis to restrain IL-1alpha-dependent colitis and tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*, (2016).
82. H. Tezuka *et al.*, Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929-933 (2007).
83. A. Reboldi *et al.*, IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. *Science* **352**, aaf4822 (2016).
84. H. Ueno, J. Banachereau, C. G. Vinuesa, Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nature immunology* **16**, 142-152 (2015).
85. S. Kawamoto *et al.*, The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* **336**, 485-489 (2012).
86. S. Kawamoto *et al.*, Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152-165 (2014).
87. B. M. Stadtmueller *et al.*, The structure and dynamics of secretory component and its interactions with polymeric immunoglobulins. *eLife* **5**, (2016).
88. P. Brandtzaeg, Human secretory immunoglobulins. 3. Immunochemical and physicochemical studies of secretory IgA and free secretory piece. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and immunology* **79**, 165-188 (1971).
89. A. Mathias, B. Corthesy, Recognition of gram-positive intestinal bacteria by hybridoma- and colostrum-derived secretory immunoglobulin A is mediated by carbohydrates. *The Journal of biological chemistry* **286**, 17239-17247 (2011).
90. J. Rey, N. Garin, F. Spertini, B. Corthesy, Targeting of secretory IgA to Peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *Journal of immunology* **172**, 3026-3033 (2004).
91. N. Rochereau *et al.*, Delivery of antigen to nasal-associated lymphoid tissue microfold cells through secretory IgA targeting local dendritic cells confers protective immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* **137**, 214-222 e212 (2016).
92. F. Fransen *et al.*, BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. *Immunity* **43**, 527-540 (2015).
93. E. W. Rogier *et al.*, Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 3074-3079 (2014).
94. S. Hapfelmeier *et al.*, Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* **328**, 1705-1709 (2010).
95. C. Lindner *et al.*, Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nature immunology* **16**, 880-888 (2015).
96. C. Lindner *et al.*, Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine. *The Journal of experimental medicine* **209**, 365-377 (2012).
97. D. Ruane *et al.*, Microbiota regulate the ability of lung dendritic cells to induce IgA class-switch recombination and generate protective gastrointestinal immune responses. *The Journal of experimental medicine* **213**, 53-73 (2016).

98. J. Mirpuri *et al.*, Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota. *Gut microbes* **5**, 28-39 (2014).
99. M. Dzidic *et al.*, Aberrant IgA responses to the gut microbiota during infancy precede asthma and allergy development. *The Journal of allergy and clinical immunology*, (2016).
100. J. Benckert *et al.*, The majority of intestinal IgA⁺ and IgG⁺ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. *The Journal of clinical investigation* **121**, 1946-1955 (2011).
101. S. Okai *et al.*, High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. *Nature microbiology* **1**, 16103 (2016).
102. C. R. Stokes, J. F. Soothill, M. W. Turner, Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* **255**, 745-746 (1975).
103. D. A. Peterson, N. P. McNulty, J. L. Guruge, J. I. Gordon, IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell host & microbe* **2**, 328-339 (2007).
104. T. C. Cullender *et al.*, Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut. *Cell host & microbe* **14**, 571-581 (2013).
105. J. L. Kubinak, J. L. Round, Do antibodies select a healthy microbiota? *Nature reviews. Immunology*, (2016).
106. G. R. Harriman *et al.*, Targeted deletion of the IgA constant region in mice leads to IgA deficiency with alterations in expression of other Ig isotypes. *Journal of immunology* **162**, 2521-2529 (1999).
107. S. Fagarasan *et al.*, Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* **298**, 1424-1427 (2002).
108. K. Suzuki *et al.*, Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1981-1986 (2004).
109. D. H. Reikvam *et al.*, Epithelial-microbial crosstalk in polymeric Ig receptor deficient mice. *European journal of immunology* **42**, 2959-2970 (2012).
110. O. L. Wijburg *et al.*, Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella typhimurium infection. *The Journal of experimental medicine* **203**, 21-26 (2006).
111. N. Lycke, L. Erlandsson, L. Ekman, K. Schon, T. Leanderson, Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *Journal of immunology* **163**, 913-919 (1999).
112. M. Wei *et al.*, Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nature immunology* **12**, 264-270 (2011).
113. T. Espanol, M. Catala, M. Hernandez, I. Caragol, J. M. Bertran, Development of a common variable immunodeficiency in IgA-deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol* **80**, 333-335 (1996).
114. A. Aghamohammadi *et al.*, Progression of selective IgA deficiency to common variable immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol* **147**, 87-92 (2008).
115. W. Al-Herz *et al.*, Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Frontiers in immunology* **2**, 54 (2011).
116. V. A. Oxelius *et al.*, IgG subclasses in selective IgA deficiency: importance of IgG2-IgA deficiency. *The New England journal of medicine* **304**, 1476-1477 (1981).
117. A. Plebani, A. G. Ugazio, V. Monafò, G. R. Burgio, Clinical heterogeneity and reversibility of selective immunoglobulin A deficiency in 80 children. *Lancet* **1**, 829-831 (1986).
118. L. Yel, Selective IgA deficiency. *Journal of clinical immunology* **30**, 10-16 (2010).
119. N. Wang, L. Hammarstrom, IgA deficiency: what is new? *Current opinion in allergy and clinical immunology* **12**, 602-608 (2012).
120. G. H. Jorgensen *et al.*, Clinical symptoms in adults with selective IgA deficiency: a case-control study. *Journal of clinical immunology* **33**, 742-747 (2013).
121. J. F. Ludvigsson, M. Neovius, L. Hammarstrom, IgA deficiency and mortality: a population-based cohort study. *Journal of clinical immunology* **33**, 1317-1324 (2013).

122. J. F. Ludvigsson, M. Neovius, L. Hammarstrom, Risk of Infections Among 2100 Individuals with IgA Deficiency: a Nationwide Cohort Study. *Journal of clinical immunology* **36**, 134-140 (2016).
123. S. Koskinen, Long-term follow-up of health in blood donors with primary selective IgA deficiency. *Journal of clinical immunology* **16**, 165-170 (1996).
124. A. Aghamohammadi *et al.*, IgA deficiency: correlation between clinical and immunological phenotypes. *Journal of clinical immunology* **29**, 130-136 (2009).
125. A. M. Milano, L. R. Lawrence, L. Horowitz, Nodular lymphoid hyperplasia of the small intestine and colon with giardiasis. A case with borderline serum IgA levels. *The American journal of digestive diseases* **16**, 735-737 (1971).
126. K. Singh, C. Chang, M. E. Gershwin, IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* **13**, 163-177 (2014).
127. N. Wang *et al.*, Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Molecular medicine* **17**, 1383-1396 (2011).
128. G. H. Jorgensen, I. Thorsteinsdottir, S. Gudmundsson, L. Hammarstrom, B. R. Ludviksson, Familial aggregation of IgAD and autoimmunity. *Clin Immunol* **131**, 233-239 (2009).
129. P. Price *et al.*, The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunological reviews* **167**, 257-274 (1999).
130. J. F. Ludvigsson, M. Neovius, L. Hammarstrom, Association between IgA deficiency & other autoimmune conditions: a population-based matched cohort study. *J Clin Immunol* **34**, 444-451 (2014).
131. A. Albuquerque, Nodular lymphoid hyperplasia in the gastrointestinal tract in adult patients: A review. *World journal of gastrointestinal endoscopy* **6**, 534-540 (2014).
132. C. Cunningham-Rundles, P. J. Maglione, Common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* **129**, 1425-1426 e1423 (2012).
133. H. Chapel *et al.*, Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* **112**, 277-286 (2008).
134. C. Cunningham-Rundles, How I treat common variable immune deficiency. *Blood* **116**, 7-15 (2010).
135. A. A. Bousfiha *et al.*, A Phenotypic Approach for IUIS PID Classification and Diagnosis: Guidelines for Clinicians at the Bedside. *J Clin Immunol*, (2013).
136. C. Cunningham-Rundles, C. Bodian, Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* **92**, 34-48 (1999).
137. E. S. Resnick, E. L. Moshier, J. H. Godbold, C. Cunningham-Rundles, Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* **119**, 1650-1657 (2012).
138. B. Gathmann *et al.*, Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 116-126 e111 (2014).
139. I. Vorechovsky *et al.*, Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* **77**, 185-192 (1995).
140. A. Aghamohammadi *et al.*, Alterations in humoral immunity in relatives of patients with common variable immunodeficiency. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* **18**, 266-271 (2008).
141. C. Rivoisy *et al.*, Parental consanguinity is associated with a severe phenotype in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* **32**, 98-105 (2012).
142. M. C. van Zelm *et al.*, An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *The New England journal of medicine* **354**, 1901-1912 (2006).
143. J. Thiel *et al.*, Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* **129**, 801-810 e806 (2012).
144. M. C. van Zelm *et al.*, CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1265-1274 (2010).
145. K. Warnatz *et al.*, Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* **107**, 3045-3052 (2006).

146. E. Castigli *et al.*, TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* **37**, 829-834 (2005).
147. K. Warnatz *et al.*, B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13945-13950 (2009).
148. C. Wehr *et al.*, The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* **111**, 77-85 (2008).
149. M. Lucas *et al.*, Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *J Allergy Clin Immunol* **125**, 1354-1360 e1354 (2010).
150. O. Favre, A. Leimgruber, A. Nicole, F. Spertini, Intravenous immunoglobulin replacement prevents severe and lower respiratory tract infections, but not upper respiratory tract and non-respiratory infections in common variable immune deficiency. *Allergy* **60**, 385-390 (2005).
151. E. Oksenhendler *et al.*, Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46**, 1547-1554 (2008).
152. K. Moor *et al.*, Analysis of bacterial-surface-specific antibodies in body fluids using bacterial flow cytometry. *Nature protocols* **11**, 1531-1553 (2016).
153. M. J. Molloy *et al.*, Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis. *Cell host & microbe* **14**, 318-328 (2013).
154. L. Mellander, J. Bjorkander, B. Carlsson, L. A. Hanson, Secretory antibodies in IgA-deficient and immunosuppressed individuals. *Journal of clinical immunology* **6**, 284-291 (1986).
155. P. Brandtzaeg *et al.*, Immunohistochemical study of nasal mucosa in patients with selective IgA deficiency. *International archives of allergy and applied immunology* **82**, 483-484 (1987).
156. W. B. Chodirker, T. B. Tomasi, Jr., Gamma-Globulins: Quantitative Relationships in Human Serum and Nonvascular Fluids. *Science* **142**, 1080-1081 (1963).
157. N. J. Mantis, Rediscovering IgA. *Mucosal immunology* **4**, 588-589 (2011).
158. F. Plaza Onate *et al.*, Quality control of microbiota metagenomics by k-mer analysis. *BMC genomics* **16**, 183 (2015).
159. N. Qin *et al.*, Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* **513**, 59-64 (2014).
160. R. Albalat, C. Canestro, Evolution by gene loss. *Nature reviews. Genetics* **17**, 379-391 (2016).
161. G. Karlsson *et al.*, Immunohistochemical study of nasal mucosa in patients with common variable immunodeficiency. *International archives of allergy and applied immunology* **82**, 481-482 (1987).
162. P. Brandtzaeg, I. Fjellanger, S. T. Gjeruldsen, Immunoglobulin M: local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency. *Science* **160**, 789-791 (1968).
163. U. Klein, R. Kuppers, K. Rajewsky, Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* **89**, 1288-1298 (1997).
164. S. F. Jorgensen *et al.*, Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal immunology* **9**, 1455-1465 (2016).
165. L. A. van der Waaij, P. C. Limburg, G. Mesander, D. van der Waaij, In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* **38**, 348-354 (1996).
166. C. Juste *et al.*, Bacterial protein signals are associated with Crohn's disease. *Gut* **63**, 1566-1577 (2014).
167. G. D'Auria *et al.*, Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-represented microbiota core. *Scientific reports* **3**, 3515 (2013).
168. K. Machiels *et al.*, A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275-1283 (2014).
169. H. Sokol *et al.*, Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases* **15**, 1183-1189 (2009).

170. E. Elinav *et al.*, NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* **145**, 745-757 (2011).
171. B. van den Bogert, M. Meijerink, E. G. Zoetendal, J. M. Wells, M. Kleerebezem, Immunomodulatory properties of Streptococcus and Veillonella isolates from the human small intestine microbiota. *PloS one* **9**, e114277 (2014).
172. I. Mashima, F. Nakazawa, The influence of oral Veillonella species on biofilms formed by Streptococcus species. *Anaerobe* **28**, 54-61 (2014).
173. M. Strach, M. Siedlar, D. Kowalczyk, M. Zembala, T. Grodzicki, Sepsis caused by Veillonella parvula infection in a 17-year-old patient with X-linked agammaglobulinemia (Bruton's disease). *Journal of clinical microbiology* **44**, 2655-2656 (2006).
174. M. Veldhoen *et al.*, The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**, 106-109 (2008).
175. T. Klemola *et al.*, Immunohistochemical findings in jejunal specimens from patients with IgA deficiency. *Gut* **37**, 519-523 (1995).
176. M. Perreau *et al.*, Exhaustion of bacteria-specific CD4 T cells and microbial translocation in common variable immunodeficiency disorders. *The Journal of experimental medicine* **211**, 2033-2045 (2014).
177. C. Chenevier-Gobeaux, D. Borderie, N. Weiss, T. Mallet-Coste, Y. E. Claessens, Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **450**, 97-103 (2015).
178. D. M. Rissin *et al.*, Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature biotechnology* **28**, 595-599 (2010).
179. M. Miyara *et al.*, Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899-911 (2009).
180. M. Miyara *et al.*, Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 7225-7230 (2015).
181. E. R. Mardis, Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics* **9**, 387-402 (2008).
182. B. Langmead, Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current protocols in bioinformatics* **Chapter 11**, Unit 11 17 (2010).
183. M. A. Dillies *et al.*, A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Briefings in bioinformatics* **14**, 671-683 (2013).
184. K. H. Wilson, R. B. Blitchington, R. C. Greene, Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* **28**, 1942-1946 (1990).
185. J. G. Caporaso *et al.*, QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* **7**, 335-336 (2010).
186. W. Li, A. Godzik, Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**, 1658-1659 (2006).
187. J. R. Cole *et al.*, The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research* **37**, D141-145 (2009).
188. N. L. Zitomersky, M. J. Coyne, L. E. Comstock, Longitudinal analysis of the prevalence, maintenance, and IgA response to species of the order Bacteroidales in the human gut. *Infection and immunity* **79**, 2012-2020 (2011).
189. S. Miquel *et al.*, Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of Faecalibacterium prausnitzii. *mBio* **6**, (2015).
190. E. Quevrain *et al.*, Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* **65**, 415-425 (2016).
191. N. Shulzhenko *et al.*, Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nature medicine* **17**, 1585-1593 (2011).
192. E. Savilahti, IgA deficiency in children. Immunoglobulin-containing cells in the intestinal mucosa, immunoglobulins in secretions and serum IgA levels. *Clinical and experimental immunology* **13**, 395-406 (1973).

193. K. Hirota, B. Martin, M. Veldhoen, Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Seminars in immunopathology* **32**, 3-16 (2010).
194. N. Gagliani *et al.*, Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221-225 (2015).
195. J. Litzman *et al.*, Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia. *Clinical and experimental immunology* **170**, 321-332 (2012).