Microbiote intestinal et inflammation : prédiction de la réponse aux anti-TNFα dans les maladies inflammatoires chroniques et modulation de la croissance bactérienne in vitro en réponse au TNFα

Thomas Bazin

▶ **To cite this version:**

Thomas Bazin. Microbiote intestinal et inflammation : prédiction de la réponse aux anti-TNFα dans les maladies inflammatoires chroniques et modulation de la croissance bactérienne in vitro en réponse au TNFα. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0285 . tel-02021372

HAL Id: tel-02021372
https://theses.hal.science/tel-02021372

Submitted on 15 Feb 2019

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 de BORDEAUX

Thèse pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité Microbiologie

Dr Thomas Bazin

Microbiote intestinal et inflammation : prédiction de la réponse aux anti-TNFα dans les maladies inflammatoires chroniques et modulation de la croissance bactérienne *in vitro* en réponse au TNFα

Directeur de thèse : Professeur Thierry SCHAEVERBEKE

Soutenue le 18 décembre 2018

Jury

Monsieur Philippe SEKSIK, Professeur, hôpital Saint-Antoine, AP-HP……Président
Madame Sandrine GUIS, Professeur, hôpital Sainte Marguerite, AP-HM……Rapporteur
Monsieur Benoît FOLIGNÉ, Professeur, Université de Lille……Rapporteur
Monsieur Frank ZERBIB, Professeur, hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux……Examinateur
Madame Claire ROUBAUD, Docteur, hôpital Xavier Arnozan, CHU de Bordeaux……Examinateur
Monsieur Dominique LAMARQUE, Professeur, hôpital Ambroise Paré, AP-HP……Invité

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Philippe Seksik d'avoir présidé mon jury de thèse, ainsi que le Professeur Sandrine Guis et le Professeur Benoît Foligné d'avoir pris le temps de juger ce travail. Je remercie le Professeur Frank Zerbib, le Professeur Dominique Lamarque et le Docteur Claire Roubaud d'avoir accepté d'être membres de mon jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Thierry Schaeverbeke qui a dirigé cette thèse. Votre enthousiasme, votre savoir encyclopédique et votre pensée toujours positive m'ont incité à élargir mon point de vue, à aller voir plus loin en toute sérénité. La transversalité que vous défendez a été dès le début de mon travail un véritable moteur et a conservé ma motivation initiale intacte. Votre gentillesse, votre calme et votre bienveillance tout au long de ces trois années ont été inestimables et m'ont permis de garder le cap y compris dans les moments difficiles.

Je remercie vivement Thomas Pradeu, qui a accepté d'initier un béotien au domaine fascinant mais exigeant de la philosophie des sciences. La rigueur scientifique et conceptuelle que tu appliques dans tous tes travaux m'a montré par l'exemple que les sciences « dures » pouvaient et devaient évoluer. Tu m'as transmis la certitude qu'une définition précise du cadre théorique est indispensable à tout projet de recherche.

Je remercie Fatima M'Zali de m'avoir permis de réaliser les études microbiologiques sur cultures dans son laboratoire. Ton ouverture d'esprit, ta manière de raisonner, mélange d'influences personnelles, anglo-saxonnes et d'esprit start-up, ont été très rafraîchissants.

Je remercie le Professeur Cécile Bébéar de m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces trois années de doctorat.

Je remercie le Professeur Frank Zerbib et le Professeur David Laharie, qui ont été mes mentors en gastro-entérologie et qui ont continué à me soutenir lors de ce long travail, en restant impliqués dans les différents projets.

Je remercie le Professeur Laurence Delhaes pour l'émulation intellectuelle autour du tout nouveau groupe myco/microbiote bordelais. Merci pour toutes ces discussions, ces idées, ces conseils et cette rigueur tout en douceur que tu sais transmettre.

Je remercie Katarzyna Hooks pour son aide si précieuse en particulier dans l'analyse bioinformatique des données de séquençage et dans le design des amorces de PCR. Merci également pour mon premier dîner de Thanksgiving !

Je remercie Marie-Elise Truchetet, qui est un modèle pour moi bien que plus portée sur l'immunologie ! Merci pour ta présence chaleureuse et tes conseils pratiques.

Je remercie également les membres du groupe microbiote, en particulier le Professeur Philippe Lehours, Claire Roubaud et notre benjamine Sophie Cambos.

Je remercie toute l'équipe de bioinformatique, en particulier Macha Nikolski et Aurélien Barré.

De l’équipe de rhumatologie, je remercie très chaleureusement Thomas Barnetche et Steeve Brousseau pour leur aide inestimable dans les différentes phases des projets de recherche, ainsi que le Professeur Christophe Richez.

De l’équipe de gastro-entérologie, je remercie Aurore Mathias et Wassil Merrouche pour leur aide précieuse lors de la mise en place du projet MIST.

Je remercie vivement Laetitia Lacaze-Buzy pour son aide patiente lors des différentes étapes de l’appel d’offre interne et pour tous ses efforts efficaces de coordination, qui ont permis le lancement de l’étude MIST.

Je remercie Christophe Hubert de m’avoir initié au séquençage, ainsi qu’Erwan Guichoux pour ses réponses précises à toutes mes (nombreuses) questions et pour la collaboration future dans le cadre du projet MIST.

De l’équipe d’Aquitaine Microbiologie, merci en particulier à Audrey pour sa gentillesse et son aide indispensable.

Un grand merci à Raphaël et à Renaud, mes alter egos bordelais dans le monde du myco/microbiote, pour les discussions stimulantes mais aussi pour ces grands moments de solidarité autour de verres !

Un grand merci à Lynn pour d’une part sa motivation contagieuse et sa capacité de travail impressionnante et d’autre part pour son amitié qui transcende les barrières linguistiques et qui est plus forte que la pluie en montagne !

Merci à Jan-Pieter Konsman pour ses conseils, son ouverture d’esprit et ces séances de travail au soleil. Merci à Sophie Gerber pour ses conseils et ses idées venues des plantes.

Merci au Professeur Moreau, le plus étudiant des néo-retraités, pour sa gentillesse mais aussi pour tous ces ponts qu’il sait construire entre les différents pans de ses vastes connaissances livresques et pratiques.

Merci à Derek et à Leonardo pour toutes ces discussions satellisées autour indifféremment d’un repas de Nouvel An chinois ou d’une poutine.

Je remercie enfin tous les patients qui ont accepté de participer aux différentes études, ainsi que le personnel des services impliqués pour leur collaboration indispensable.

À Élodie

À mes parents

« As there is a dialectic between organisms and their environments, each forming the other, so there is a dialectic of method and problematic in science. »

Richard C. Lewontin

Titre : Microbiote intestinal et inflammation : prédiction de la réponse aux anti-TNFα dans les maladies inflammatoires et modulation de la croissance bactérienne *in vitro* en réponse au TNFα

Résumé : L'interface hôte/microbiote intestinal est un système d'interactions complexes dont le déséquilibre est associé au développement des maladies inflammatoires chroniques. Les traitements anti-TNFα sont très efficaces dans ces maladies, mais seulement chez certains patients.
L'objectif de ce travail était de rechercher un lien entre composition du microbiote intestinal et réponse aux traitements anti-TNFα dans deux types de maladies inflammatoires chroniques, les spondyloarthrites et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.
Nous avons retrouvé des variations de la composition du microbiote intestinal après traitement par anti-TNFα chez des patients atteints de spondyloarthrite et avons identifié un nœud taxonomique prédictif de la réponse thérapeutique à trois mois. Ce nœud taxonomique, l'ordre des *Burkholderiales*, étant ainsi un biomarqueur potentiellement utilisable en pratique clinique, nous avons déposé une demande de brevet européen, qui est en cours d'instruction. Ce travail a été poursuivi par un nouveau protocole de recherche clinique incluant des patients atteints de spondyloarthrites mais aussi de maladies inflammatoires chroniques intestinales. Ce protocole est financé par le CHU de Bordeaux dans le cadre de l'Appel d'Offre Interne. Il permettra de valider les hypothèses de notre premier travail, en réalisant notamment des PCR quantitatives utilisant des amorces spécifiques de l'ordre des *Burkholderiales*. Nous avons de plus retrouvé in vitro pour la première fois à notre connaissance une modulation de la croissance bactérienne chez *Bacteroides fragilis* en réponse au TNFα humain.

Mots-clés : microbiote intestinal, maladies inflammatoires chroniques, spondyloarthrite, maladies inflammatoires chroniques intestinales, TNFα, anti-TNFα

Title: Gut microbiota and inflammation: prediction of anti-TNFα response in chronic inflammatory diseases and modulation of bacterial growth in vitro in response to TNFα

Abstract: The host/gut microbiota interface is a system of complex interactions whose imbalance is associated with the development of chronic inflammatory diseases. Anti-TNFα treatments are very effective in these diseases, but only in some patients.
The purpose of this work was to find a link between the composition of the intestinal microbiota and clinical response to anti-TNFα treatments in two types of chronic inflammatory diseases, spondyloarthritis and inflammatory bowel disease.
We found variations in the composition of the intestinal microbiota after treatment with anti-TNFα in patients with spondyloarthritis and identified a taxonomic node predictive of the therapeutic response at 3 months. This taxonomic node, the *Burkholderiales* order, being a biomarker potentially usable in clinical practice, we have filed a European patent application, which is currently under investigation. This work was continued by a new clinical research protocol including patients with spondyloarthritis but also with inflammatory bowel diseases. This protocol is funded by the Bordeaux University Hospital as part of the internal call for tenders. It will validate the hypotheses of our first work, notably by performing quantitative PCRs using specific primers targeting the order of Burkholderiales. In vitro, we have also found for the first time, to our knowledge, a modulation of bacterial growth in *Bacteroides fragilis* in response to human TNFα.

Keywords: digestive microbiota, chronic inflammatory diseases, spondyloarthritis, inflammatory bowel diseases, TNFα, anti-TNFα

Laboratoire d'accueil : unité INRA EA 3671, Infections humaines à mycoplasmes et à chlamydiae, directeur d'unité Pr Cécile Bébéar, Université Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaus CEDEX

Plan

Liste des figures 11
Liste des tableaux 11
Abréviations 12
1 Les maladies inflammatoires chroniques 13
1.1 Définitions, concepts, physiopathologie 13
1.1.1 Maladies auto-immunes 13
1.1.2 Maladies auto-inflammatoires 17
1.1.3 Continuum entre auto-immunité et auto-inflammation 18
1.2 MICI 23
1.2.1 Épidémiologie, clinique 23
1.2.2 Physiopathologie 24
1.2.3 MICI : maladies inflammatoires ou auto-immunes ? 30
1.3 SpA 31
1.3.1 Épidémiologie, clinique 31
1.3.2 Physiopathologie 31
1.3.3 Maladie auto-inflammatoire ou auto-immune ? 34
1.4 Overlap SpA/MICI 34
2 Microbiote intestinal 36
2.1 Description 36
2.1.1 Notion de dysbiose 37
2.1.2 Stabilité 38
2.2 Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal 39
2.2.1 Évolution avec l'âge 40
2.3 Rôles physiologiques 41
Article de revue : les microbiotes exercent des effets protecteurs sur l'hôte par des mécanismes variés, à l'échelle locale mais aussi à distance 41
Article de revue : co-immunité hôte-microbiote : une relation intime qui dépasse la fonction de défense 41
2.4 Méthodes d'étude, critique des biais 42
2.4.1 Séquençage de gènes d'intérêt 43

2.4.2 Séquençage de l'ADN total ("shotgun métagénomique") 45
2.4.3 Analyse du métatranscriptome 45
2.4.4 Métaprotéomique, métabolomique 45
2.4.5 Diversité 46
2.4.6 Intégration des données « omics » 46
2.5 Microbiote et système immunitaire 47
2.5.1 Fonction barrière de l'épithélium et peptides antimicrobiens 47
2.5.2 Récepteurs du système immunitaire inné 48
2.5.3 Contrôle des populations de cellules T par le microbiote 50
2.5.4 Microbiote et auto-immunité/auto-inflammation 51
2.6 Associations pathologiques 52
2.6.1 Composition du microbiote intestinal comme biomarqueur en pathologie 52
2.6.2 Microbiote et MICI 53
2.6.3 Microbiote et SpA 54
2.7 Difficultés de l'étude du microbiote 55
3 Traitements 57
3.1 MICI 57
3.2 SpA 57
3.3 Anti-TNFα 58
4 Dialogue hôte/microbiote 65
4.1 Réaction de l'hôte aux microorganismes 65
4.2 Réaction des microorganismes aux signaux de l'hôte 66
4.2.1 Interaction bactéries/molécules autres que cytokines 67
4.2.2 Interaction cytokines eucaryotes/bactéries 67
4.2.3 Conséquences en pratique clinique 70
4.3 Commensaux, symbiontes, pathobiontes, pathogènes : un continuum dynamique 74
Projet 110
Hypothèses 110
Objectifs 111
Résultats expérimentaux 112
Article 1 : la composition du microbiote intestinal de patients atteints de spondyloarthrite pourrait permettre de prédire le profil de réponse aux anti-TNFα 113
Article 2 : le TNFα humain stimule *in vitro* la croissance de *Bacteroides fragilis* 125
5 Discussion 145

5.1 *Burkholderiales* 146
5.2 *Bacteroides fragilis* 146
6 Perspectives personnelles 147
7 Perspectives générales 148
7.1 Médecine personnalisée 148
7.2 Complexité 149
7.2.1 Facteurs contribuant à la complexité et à la variabilité 149
7.2.2 L'intégration complète des données comme solution au développement de thérapies spécifiques d'une cible 150
7.2.3 Omics, biologie de système et médecine de réseau 151
7.2.4 Interactome : en pratique 152
7.2.5 Capacités analytiques humaines, intelligence artificielle et expérience 154
Bibliographie 156
Annexes 177

Avant-propos

Les maladies inflammatoires chroniques (MIC) sont un problème grandissant de santé publique, à la physiopathologie mal comprise car éminemment complexe. Elles résultent d'une réponse immunitaire anormale chez des patients génétiquement prédisposés, déclenchée par des facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs, le rôle du microbiote intestinal, à la frontière entre l'environnement et le soi, se révèle progressivement, grâce en particulier aux techniques de séquençage permettant de s'affranchir des étapes de culture. Cependant, les résultats obtenus grâce à ces nouvelles techniques sont souvent inconstants et leurs applications en pratique clinique sont pour l'instant très limitées.

La prise en charge thérapeutique des MIC est actuellement basée sur une méthode empirique, qui cible des cytokines ou des cellules immunitaires retrouvées en abondance anormale chez les patients ou dans les modèles animaux. Si cette méthode a permis de grandes avancées cliniques et le soulagement efficace de beaucoup de malades, elle est insatisfaisante pour plusieurs raisons : les traitements ne sont que suspensifs et non curatifs ; leur influence sur le cours évolutif des MIC est incertain ; de nombreux patients ne répondent pas cliniquement ; surtout ils ne ciblent qu'une anomalie immunitaire alors que les désordres immunologiques sont multiples. Leur mécanisme d'action précis est mal compris, en raison, entre autres, des multiples redondances et interdépendances dans les voies de signalisation.

Il existe donc d'une part un besoin d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et des mécanismes d'action des médicaments, et d'autre part un besoin urgent de développer des tests prédictifs de réponse aux différents traitements, afin de personnaliser la prise en charge et d'éviter par là un retard de soulagement des symptômes et un coût inutile pour la société.

Les travaux de cette thèse s'articulent autour des traitements anti-TNFα, premières biothérapies ciblées à avoir été découvertes dans les MIC. Ils ont porté :

- sur la recherche de signatures liées à la composition du microbiote intestinal prédictives de la réponse aux traitements anti-TNFα dans une MIC, les spondyloarthrites (SpA)
- sur la recherche d'effets directs du TNFα sur les composants du microbiote intestinal

Pour permettre de mieux comprendre les enjeux et les objectifs de ces travaux, l'introduction de ce manuscrit comprend :

- un rappel de la physiopathologie des MIC, en détaillant spécifiquement les deux pathologies au centre de ce travail : les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) dont la physiopathologie a été particulièrement détaillée et pour lesquelles un rôle du microbiote intestinal est attesté, et les SpA, avec un intérêt particulier porté aux implications de la régulation de l'équilibre Th17/Treg ;
- une description du microbiote intestinal, de ses fonctions en détaillant spécialement la notion de co-immunité, de ses moyens d'étude et des associations pathologiques notamment avec les MICI et les SpA ;

- un rappel des traitements utilisés dans les MICI et les SpA, en exposant les spécificités des traitements anti-TNFα ;
- un rappel des interactions et du dialogue entre hôte et microbiote intestinal, en détaillant particulièrement les actions connues du TNFα directement sur les microorganismes.

Liste des figures

Figure 1 : Principe du déclenchement de la réponse immunitaire selon la théorie Danger
Figure 2 : Cellules intervenant à la fois dans les mécanismes immuns innés et acquis
Figure 3 : Continuum entre maladies auto-inflammatoires et auto-immunes
Figure 4 **:** Différenciation Th17/Treg et équilibre Th17/Treg en pathologie
Figure 5 : Nombre de cellules et masses des différents types cellulaires dans un corps humain adulte de 70kg.
Figure 6 : Microbiote et « dysbiose »
Figure 7 : Représentation schématique du « paysage de stabilité » de la composition du microbiote
Figure 8 : Méthodes d'étude du microbiote humain
Figure 9 : Structure des molécules anti-TNFα utilisées dans le traitement des MICI et des SpA.
Figure 10 : Microbiote intestinal et maladies inflammatoires chroniques
Figure 11 : Le schéma accord/certitude (certainty-agreement diagram)
Figure 12 : Expansion des connaissances et construction de l'interactome dans les MICI

Liste des tableaux

Tableau 1 : Vue d'ensemble des caractéristiques principales des pathologies inflammatoires et auto-immunes
Tableau 2 : Effets connus des cytokines eucaryotes sur des bactéries pathogènes Gram-négatives

Abréviations

CPA : cellule présentatrice de l'antigène
DAMPs : Danger Associated Molecular Patterns
MAI : maladie auto-immune
MAMPs : Microbial Associated Molecular Patterns
MC : maladie de Crohn
MIC : maladie inflammatoire chronique
NGS : next-generation sequencing
NOD : nucleotide-binding oligomerization domain
PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns
PCR : polymerase chain reaction
PRR : pattern-recognition receptors
RCH : rectocolite hémorragique
SpA : spondyloarthrite
SA : spondylarthrite ankylosante
TNF : tumor necrosis factor
TLR : toll-like receptors

Etude bibliographique

1 Les maladies inflammatoires chroniques

L'inflammation est un processus physiologique aigu dont à la fois l'initiation et la résolution sont contrôlées. En cas de défaut de contrôle d'une de ces étapes, l'inflammation peut devenir chronique et provoquer des pathologies. Le rôle le plus connu de l'inflammation est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures mais elle intervient également dans la cicatrisation et le développement (Truchetet and Pradeu 2018).

Les maladies inflammatoires chroniques (MIC), quand un agent externe infectieux ou toxique causal n'a pas été identifié, sont classiquement divisées en maladies auto-immunes ou en maladies médiées par l'immunité (encore appelées auto-inflammatoires). Au fil des découvertes, ce distingo semble s'effacer devant l'importance des chevauchements entre les mécanismes impliqués. En pratique, les maladies inflammatoires chroniques d'étiologie incertaine sont le résultat de perturbations de réseaux biologiques hautement complexes et interdépendants qui incluent des composants génétiques et environnementaux (Z. Wen and Fiocchi 2004).

1.1 Définitions, concepts, physiopathologie

1.1.1 Maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes (MAI) sont un groupe hétérogène de pathologies qui ont pour point commun une réaction inadaptée du système immunitaire aux déterminants du soi. Les lymphocytes T attaquent des antigènes endogènes, activant les lymphocytes B producteurs d'anticorps auto-réactifs. L'auto-réactivité soutenue entraîne des dommages tissulaires.

L'hétérogénéité des caractéristiques cliniques et biologiques des MAI rend probable le fait que certaines maladies actuelles ne représentent qu'un regroupement artificiel de pathologies non liées étiologiquement.

Les critères classiques définissant une MAI incluent l'existence de clones B produisant des anticorps polyréactifs, des anticorps spécifiques d'auto-antigènes et des auto-anticorps pathologiques, de clones T spécifiques d'auto-antigènes ayant la capacité de créer une maladie auto-immune lorsqu'ils sont transférés, et enfin l'identification précise d'auto-antigènes spécifiques d'organes et la reproduction de maladies auto-immunes dans des modèles animaux (Rose and Bona 1993).

L'étude des MAI était donc initialement focalisée sur l'étude de l'activation lymphocytaire. La présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) est limitée aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA), qui, par conséquent, contrôlent l'activation des lymphocytes B et T-helpers. L'activation lymphocytaire n'a lieu qu'en cas de présentation antigénique par une CPA elle-même activée. La tolérance est donc dépendante de la présentation antigénique par

les CPA non activées. En effet, si la CPA est non activée, elle n'exprime pas de molécules de co-stimulation. Elle garde la capacité de présentation de l'antigène au lymphocyte T, mais elle induit dans ce cas une tolérance à l'antigène. Comme les antigènes issus de la phagocytose sont également présentés de façon ubiquitaire par le CMH I, les CPA ont également un rôle de régulation des lymphocytes T cytotoxiques. Le rôle des CPA, et en particulier des cellules dendritiques (CD), est donc d'une importance capitale dans le maintien de la tolérance.

Les cellules dendritiques : lien entre immunité innée et adaptative

Il existe trois types de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : les cellules dendritiques (CD), les macrophages et les lymphocytes B. Seules les CD sont capables de stimuler les lymphocytes T naïfs ; elles sont appelées CPA professionnelles. Les CD ont pour origine des précurseurs médullaires. Deux grands sous-types sont individualisés, différant sur les plans phénotypique et fonctionnel : les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les cellules dendritiques sont spécialisées dans la capture, le transport, l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Elles sont disséminées dans tout l'organisme et sont particulièrement nombreuses dans les tissus en contact avec le milieu extérieur. Elles sont dotées de capacité de migration et de ce fait peuvent se déplacer du site de capture des antigènes vers les organes lymphoïdes secondaires.

A l'état basal, les CD sont immatures : elles ont une grande capacité à reconnaître et à capturer les antigènes, mais elles sont de faibles activateurs des lymphocytes T.

Les CD reconnaissent les microorganismes grâce aux récepteurs PRR, spécifiques de motifs conservés, les PAMPs ou MAMPs (cf ci-dessous). Elles sont également capables de reconnaître les signaux Danger (DAMPs) et la présence de cellules effectrices de l'immunité innée (neutrophiles, mastocytes, cellules NK, basophiles) par des interactions cellulaires directes ou indirectement *via* la reconnaissance de cytokines. La présence de signaux associés à l'inflammation va induire la maturation des CD. Les CD activées ont une capacité forte d'activation des lymphocytes T grâce à la synthèse de molécules de co-stimulation.

Un antigène capturé et présenté sans étape de maturation des CD induira une tolérance immunitaire. *A contrario* si un antigène est capté dans un environnement associé à des signaux Danger, une réponse immunitaire acquise sera initiée.

Les CD sont donc capables de reconnaître et d'intégrer des signaux variés : cytokines, signaux Danger, molécules environnementales et en particulier microbiennes.

1.1.1.1 La persistance de signaux de dommages tissulaires à l'origine des MAI

Il a été montré que l'auto-réactivité pouvait survenir dans toute situation où il existe des dommages tissulaires. Une activation transitoire de lymphocytes auto-réactifs lors d'infections, par exemple, ne rentre donc pas dans la définition des MAI. Il est cependant probable que certaines MAI pourraient être la conséquence d'infections persistantes. Dans une telle situation, les lésions tissulaires continues pourraient maintenir la réponse immunitaire en produisant des signaux associés aux dommages cellulaires (signaux Danger) de façon persistante. La notion de persistance caractérise donc l'auto-immunité pathologique.

Contrastant avec les « vraies » maladies auto-immunes, l'auto-immunité rencontrée dans les infections persistantes est une réponse biologiquement logique mais inadéquate du système immunitaire. Cependant, des études animales dans des conditions strictement germ-free confirment que l'auto-immunité peut survenir en l'absence d'agents infectieux, ce qui montre qu'une « vraie » auto-immunité existe réellement (Maldonado *et al.* 1999; Mizutani *et al.* 2005). En effet, une réponse immunitaire persistante envers des antigènes tissulaires pourrait être déclenchée et maintenue par des anomalies de l'élimination des débris cellulaires, ce qui mène à la persistance de débris cellulaires dans le milieu extra-cellulaire (Tveita 2010). La présence continue de tels constituants cellulaires pourrait, par elle-même, apporter les signaux Danger nécessaires à l'initiation et au maintien de la

réponse cellulaire et humorale. Cela implique qu'un évènement extérieur n'est pas forcément nécessaire au déclenchement de l'auto-immunité, même si des lésions tissulaires d'origine externe (UVs, hypoxie, infections, traumatismes etc.) peuvent accélérer ou étendre le processus.

Les MAI pourraient donc être la conséquence d'anomalies à l'échelle tissulaire plutôt que d'anomalies du système immunitaire lui-même. En considérant l'auto-immunité transitoire comme une étape normale ou au moins acceptable de la réponse immunitaire, l'intérêt dans l'étude des MAI a donc été déplacé de l'étude de l'activation lymphocytaire vers le recrutement et l'activation persistance des CPA par les signaux Danger libérés par les cellules des tissus impliqués.

1.1.1.2 La théorie Danger

Malgré des dizaines d'années d'étude de la fonction immunitaire et de la régulation de l'immunité à la fois dans des modèles animaux et humains, les mécanismes impliqués dans l'auto-immunité restent obscurs. La théorie Danger a permis de modifier le cadre conceptuel de la compréhension de la tolérance immunitaire et de sa rupture dans l'auto-immunité. Après la théorie du soi/non-soi et parallèlement à la théorie du non-soi infectieux a été proposée par Matzinger dans les années 1990 la théorie immunologique basée sur le concept Danger (Matzinger 2002).
Selon cette théorie, le système immunitaire ne réagit que lorsque la stimulation antigénique s'accompagne de signaux de lésions tissulaires, appelés DAMPs pour Danger Associated Molecular Patterns. Il peut s'agit de molécules variées comme l'ATP, l'HMGB1 (high mobility group box-1 protein), les protéines heat-shock, les molécules du complément, des produits de dégradation de l'acide hyaluronique mais aussi l'ARNm, des lipoprotéines et des acides gras etc (Piccinini and Midwood 2010).

Ces DAMPs induisent la maturation (l'activation) des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) environnants sont alors perçus comme dangereux et la réponse immunitaire est initiée dans le but de détruire les agents délétères associés à ces PAMPs.

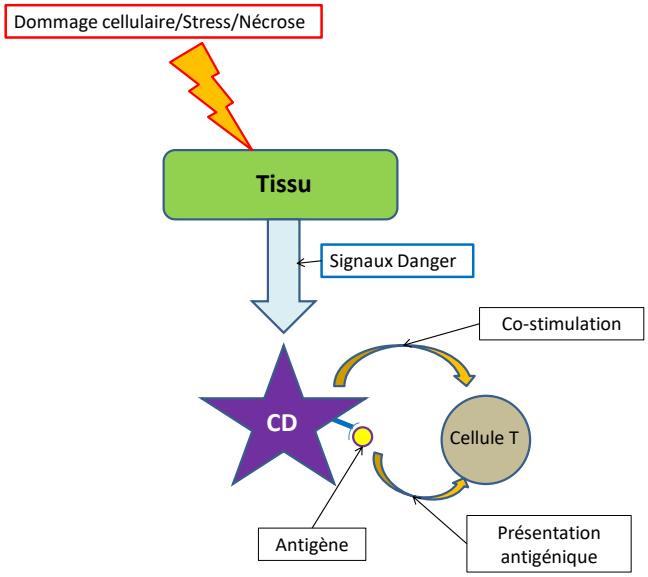


Figure 1 : Principe du déclenchement de la réponse immunitaire selon la théorie Danger

Dans ce modèle, le système immunitaire est inactif à l'état basal. Les DAMPs sont requis pour initier une réponse immunitaire. La tolérance immunitaire est donc un phénomène passif qui se poursuit pendant toute la vie et ne se limite pas à l'éducation thymique. Tous les antigènes rencontrés, dès lors qu'ils ne sont pas associés à des DAMPs, sont naturellement tolérés. Cela explique notamment la tolérance envers la flore commensale, qui évolue au cours de la vie.

Ainsi, cette théorie Danger permet, entre autres, d'expliquer mieux que les théories existantes la tolérance envers les commensaux. Leur présence n'entraînant pas de lésions tissulaires, les PAMPs, ou plus largement les MAMPs (Microbial Associated Molecular Patterns (Patten and Collett 2013)) au contact des cellules immunitaires ne seront pas associés à un danger et seront donc tolérés.

Cependant, l'idée que les microorganismes du microbiote intestinal sont tolérés parce qu'ils ne provoquent pas de dommages cellulaires est une simplification excessive. En effet, ces microorganismes dialoguent en permanence avec l'hôte, établissant activement un équilibre dans lequel le système immunitaire n'est pas inactif, mais au contraire répond aux stimuli microbiotaux d'une manière contrôlée (Pradeu and Cooper 2012).

1.1.1.2.1 Modèle Danger et auto-immunité

La théorie Danger suggère que la plupart des anomalies de l'auto-immunité n'ont pas pour origine première la réponse immunitaire, mais plutôt des anomalies de la physiologie tissulaire (Tveita 2010). Ce changement de paradigme est important dans la mesure où il déplace l'attention vers la rupture de l'homéostasie tissulaire, avec un rôle majeur des cellules présentatrices d'antigènes.

Dans ce modèle l'auto-réactivité est un phénomène normal qui survient lors d'une inflammation tissulaire quelle que soit sa cause. En effet, des lymphocytes T auto-réactifs sont activés au même titre que les lymphocytes T allo-réactifs au cours d'une agression.

Physiologiquement, cette induction est suivie d'une phase de résolution, qui nécessite une disparition des stimuli activateurs (DAMPs) ou leur remplacement par des signaux inhibiteurs. La plupart des cellules T meurent, mais une minorité devient des cellules mémoire. Cette situation n'est pas pathologique en soi, puisque ces cellules auto-réactives reconnaissent certes les antigènes du soi, mais sans co-stimulation associée, dans la mesure où le signal danger a disparu. La tolérance est donc un équilibre qui peut être rompu. Si le soi est à nouveau associé à un signal dangereux, la tolérance est rompue et les cellules T auto-réactives perdent leur capacité de tolérance.

Le problème n'est donc pas ce qui crée l'auto-réactivité, puisqu'elle existe physiologiquement, mais le stimulus qui active les lymphocytes T auto-réactifs et le stimulus qui maintient les lymphocytes T auto-réactifs activés. Pour le système Danger, ce stimulus est la nécrose cellulaire. Le facteur qui active les lymphocytes T auto-réactifs peut alors être toute cause entraînant une nécrose cellulaire (pathogène, toxique, ischémique, etc.). Des mutations des gènes impliqués dans l'apoptose ou l'élimination des signaux danger peuvent entraîner une pérennisation de l'activation. On retrouve ce type de mutations dans le lupus érythémateux disséminé (Tveita 2010).

Cependant, certaines observations vont à l'encontre de la théorie Danger. Par exemple, certains PAMPs sont capables d'induire une réponse inflammatoire même en l'absence de signaux Danger (Vance 2000), et le relargage de cytokines pro-inflammatoires n'est pas capable à lui seul d'induire une réponse T fonctionnelle (Joffre *et al.* 2009).

1.1.2 Maladies auto-inflammatoires

Le concept d'auto-inflammation a été proposé en 1999 pour décrire un groupe de pathologies dans lesquelles une fièvre récurrente et des formes variées d'inflammation systémique impliquant les cellules myéloïdes étaient observées, sans critères classiques d'auto-immunité (McDermott *et al.* 1999). Les meilleurs exemples d'auto-inflammation pure sont les rares syndromes monogéniques de fièvre périodique : la fièvre méditerranéenne familiale (FMF), les cryopyrinopathies (CAPS) et le syndrome périodique associé au récepteur du TNFα (TRAPS), par exemple. Ces maladies sont caractérisées par un déficit génétique de régulation de la réaction inflammatoire. Ainsi, les cryopyrinopathies sont la conséquence de polymorphismes de la cryopyrine, l'élément détectant les DAMPs et activant l'inflammasome, ces polymorphismes augmentant la sensibilité de l'inflammasome aux signaux Danger. La FMF est la conséquence de polymorphismes affectant la pyrine, qui modifient ses propriétés de régulation de la formation de l'inflammasome. La physiopathologie du TRAPS est mal élucidée. Les mutations du gène codant pour le récepteur au TNF induisent probablement des erreurs de repliements moléculaires et une stagnation dans le réticulum endoplasmique qui produit un stress oxydatif et le relargage de cytokines inflammatoires. Les crises peuvent être déclenchées par le stress, l'exposition au froid, des infections ou certains médicaments. Ces pathologies sont l'archétype des « vraies » maladies auto-inflammatoires.

1.1.3 Continuum entre auto-immunité et auto-inflammation

La distinction entre auto-immunité et auto-inflammation est discutable. Tout d'abord, l'immunité innée et l'immunité acquise sont intimement liées. En effet, plusieurs cellules de l'immunité ont des fonctions intéressant à la fois le système adaptatif et inné. Les cellules T natural killer invariantes (iNKT), à ne pas confondre avec les cellules NK qui sont des lymphocytes non T non B, font partie d'un sous-groupe de lymphocytes qui partagent des caractéristiques propres aux cellules de l'immunité acquise (récepteurs issus de réarrangements d'ADN somatique) et de l'immunité innée (récepteurs semi-invariants interagissant avec un panel limité d'antigènes) (Van Kaer, Parekh, and Wu 2011). Les cellules iNKT jouent un rôle d'adjuvant envers les lymphocytes B lorsqu'elles sont activées par un antigène (Dellabona, Abrignani, and Casorati 2014) et influencent de nombreuses autres cellules du système immunitaire (Matsuda *et al.* 2008)

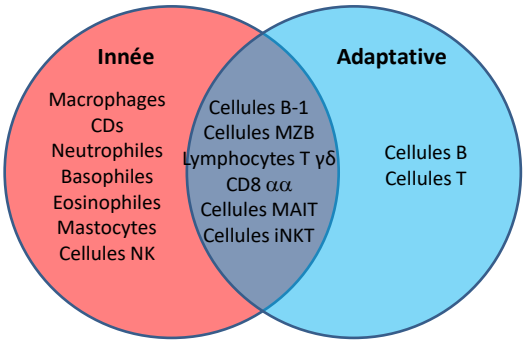


Figure 2 : Cellules intervenant à la fois dans les mécanismes immuns innés et acquis. CDs : cellules dendritiques, iNKT : cellules T invariantes natural killer, MAIT : cellules T invariantes associées aux muqueuses, MZB : zone marginale B, NK : natural killer

Les cellules NK par exemple exercent également des fonctions biologiques complexes attribuées à la fois au système immunitaire inné et acquis (Vivier *et al.* 2011).

Ensuite, les maladies auto-inflammatoires et les maladies auto-immunes partagent plusieurs points communs. Ces maladies sont soit polygéniques soit monogéniques, sont systémiques et sont fréquemment associées à des atteintes du système musculo-squelettique. Elles sont caractérisées par une activation chronique du système immunitaire qui peut conduire à des lésions tissulaires chez des individus génétiquement prédisposés.

De plus, certains composants associés aux pathologies auto-inflammatoires sont également impliqués dans les mécanismes auto-immuns.

L'inflammasome est un complexe multi-protéique composé entre autres de récepteurs de type NLR, et s'assemble lors de la liaison de ces récepteurs à des signaux pathologiques. Des mutations des

protéines liées à l'inflammasome, en particulier les gènes des NOD-like receptors (NLRs) classiquement considérés comme faisant partie de l'immunité innée, sont fortement associées aux maladies auto-inflammatoires, alors que le lien entre l'inflammasome et les maladies auto-immunes est moins clair. Cependant, le rôle de ce complexe multi-protéique dans certaines maladies auto-immunes est suspecté, puisqu'un large spectre de signaux endogènes de danger peut activer les NLRs et que les produits de l'inflammasome, comme l'IL-1ß, peuvent activer l'immunité adaptative. Une association entre les SNPs localisés sur le gène de l'inflammasome NLRP1 et le lupus érythémateux disséminés a été rapportée.

Certaines anomalies de l'activation du complément sont également considérées comme faisant partie des maladies auto-inflammatoires (Manthiram *et al.* 2017). Le système du complément est un groupe de 25 protéines impliquées dans l'élimination directe des pathogènes ou dans la régulation du système. Il existe trois voies d'activation du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Si les deux dernières peuvent être activées indépendamment du système immunitaire acquis, la voie classique nécessite la reconnaissance d'anticorps et fait donc partie de l'immunité acquise. Les anomalies de la voie classique entraînent des manifestations de lupus.

Les maladies auto-inflammatoires et auto-immunes pourraient donc être considérées comme faisant partie d'un grand groupe de pathologies inflammatoires qui inclut des maladies purement inflammatoires et des maladies purement auto-immunes (Doria *et al.* 2012).

Tableau 1 : Vue d'ensemble des caractéristiques principales des pathologies inflammatoires et auto-immunes

	Maladies auto-inflammatoires	Maladies auto-immunes
Système immunitaire	Immunité innée	Immunité adaptative
Évolution clinique	Poussées ; facteurs déclenchants locaux	Progression continue
Biologie	Absence d'auto-anticorps	Auto-anticorps
Susceptibilité génétique	Monogénique > polygénique ; gènes impliqués dans les voies de signalisation cytokinique et dans la reconnaissance des pathogènes	Polygénique > monogénique ; gènes impliqués dans la réponse immunitaire adaptative, comme le CMH de classe II
Thérapeutique	Antineutrophiles, anticytokines	Anti cellules B, anti cellules T
Concept	Théorie "Danger" (Matzinger)	Modèle de discrimination soi/non-soi
Exemples	Monogénique : FMF, TRAPS, PAPA, CMRO ; polygénique : maladie de Crohn, goutte, maladie de Behcet	Polygénique : PR, LED, diabète de type I, thyroïdite d'Hashimoto, MG, maladie coeliaque ; monogénique : APS-1, IPEX, ALPS

ALPS : syndrome lymphoprolifératif auto-immun; APS-1 : syndrome-1 polyendocrine auto-immun ; CMRO ; ostéomyélite multifocale récurrente ; FMF : fièvre méditerranéenne familiae ; IPEX : syndrome de dérégulation immunitaire, polyendocrinopathie et syndrome lié à l'X ; MG : myasthenia gravis ; PAPP : syndrome d'arthrite pyogénique, pyoderma gangrenosum et acné ; PR : polyarthrite rhumatoïde ; LED : lupus érythémateux disséminé ; TRAPS : syndrome périodique associé au récepteur du TNF

Dans une étude conceptuelle historiquement importante datant de 2006 (McGonagle and McDermott 2006), McGonagle et McDermott ont proposé de classer les maladies inflammatoires médiées par l'immunité (IMIDs) dans un continuum allant de l'auto-immunité à l'auto-inflammation, la dernière étant causée par la réponse immune innée à des facteurs déclenchants spécifiques, comme des microorganismes ou des micro-traumatismes (Tableau 1). En dehors de ces maladies purement auto-inflammatoires, les maladies auto-inflammatoires résultent de la combinaison de facteurs de risques

génétiques et de stress environnemental. Par conséquent, ces maladies répondent mieux au blocage cytokinique qu'aux traitements ciblant le système immunitaire acquis (Ambarus *et al.* 2012).

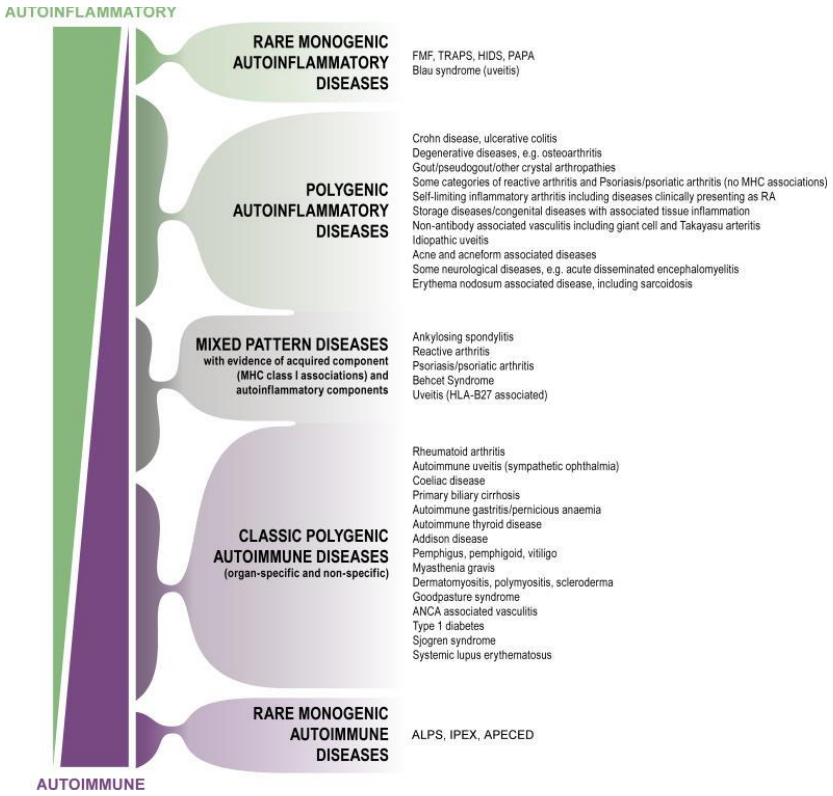


Figure 3 : Continuum entre maladies auto-inflammatoires et auto-immunes (McGonagle and McDermott 2006)

On remarque que, suivant cette classification, les MICI et les SpA sont considérées comme des maladies mixtes, dont la physiopathologie fait intervenir des mécanismes à la fois auto-inflammatoires et auto-immuns.

Cette vision est historiquement intéressante, mais les découvertes récentes montrent que la plupart des pathologies citées sont en fait des pathologies mixtes. De plus, les techniques de séquençage de nouvelle génération ont permis la découverte de nouvelles pathologies monogéniques qui sont venues compléter le spectre des maladies auto-inflammatoires (Manthiram *et al.* 2017). Certaines sont associées à une signature de type interféron de type I, comme les syndromes associés à des anomalies du protéasome dont le CANDLE, ou le SAVI. L'interféron de type I joue un rôle bien connu dans la tolérance au soi et dans le développement d'auto-anticorps (Manthiram *et al.* 2017) ; il n'est donc pas étonnant de retrouver des auto-anticorps chez les patients atteints de SAVI, ce qui renforce l'idée de continuum entre auto-inflammation et auto-immunité. Cela remet en cause la classification de McGonagle et McDermott dans laquelle les maladies monogéniques sont exclusivement des maladies purement auto-inflammatoires ou auto-immunes.

Dans la suite de ce manuscrit nous utiliserons le terme inclusif maladies inflammatoires chroniques (MIC) pour désigner ces deux maladies sans préjuger des mécanismes impliqués.

1.1.3.1 Différenciation lymphocytaire CD4+ et MIC

Les relations entre deux aspects du système immunitaire que sont la défense de l'hôte contre les agressions extérieures et la genèse des MIC sont encore méconnues. L'équilibre Treg/Th17 et, en particulier, l'axe IL23/IL17 jouent un rôle à la fois dans les MIC et dans la protection contre les infections, et pourraient donc représenter le chaînon manquant.

L'immunité innée est capable de déclencher ou non une réponse adaptative en réaction à un stimulus selon sa nature et le contexte micro-environnemental. Elle est également capable de moduler cette réponse qualitativement. Après migration dans un organe lymphoïde secondaire, la CD activée par la combinaison de signaux Danger et de PAMPs entre en contact avec un lymphocyte T CD4+ naïf. Les cytokines libérées par la CPA vont polariser la différenciation du lymphocyte T.

A la fin des années 1980 il a été montré que les lymphocytes T CD4 auxiliaires ou helper (Th) étaient hétérogènes quant à leur capacité à produire des cytokines effectrices. Des clones nommés Th1, différenciés sous l'influence de l'IL-12 produisaient préférentiellement de l'Interféron (IFN)-γ et d'autres clones nommés Th2 produisaient de l'Interleukine (IL)-4. Les Th2 représentent une voie de différenciation par défaut, favorisée par la présence d'IL-4 dans le microenvironnement.

Ce paradigme s'est confirmé dans des modèles *in vitro* utilisant des lymphocytes T naïfs primaires ainsi *qu'in vivo* aussi bien chez l'homme que chez la souris. Cette hétérogénéité des profils cytokiniques est associée à une dichotomie fonctionnelle. Les lymphocytes Th1 sont particulièrement importants pour produire des réponses cytotoxiques dans le cadre d'infections à germes intracellulaires, tels que *Toxoplasma gondii, Leishmania major, Listeria monocytogenes* ou *Mycobacterium tuberculosis*, alors que les lymphocytes Th2 induisent préférentiellement une réponse humorale importante dans les infections à germes extracellulaires, comme les helminthes (Ouyang, Kolls, and Zheng 2008). Lorsque ces réponses T sont exagérées ou non contrôlées, elles peuvent être associées à certaines pathologies, notamment les maladies auto-immunes pour les réponses Th1 et les maladies allergiques pour les réponses Th2 (Ouyang, Kolls, and Zheng 2008). Bien que l'IFN-γ et l'IL-4 caractérisent toujours aujourd'hui la signature d'un profil Th1 et Th2, respectivement, un nombre croissant de cytokines potentiellement produites par les lymphocytes T a été identifié au cours des dernières années et a accru la complexité des profils cytokiniques T CD4. Le TNFα et l'IL-10, par exemple, peuvent être produits aussi bien lors de réponses Th1 que Th2 et définissent respectivement un profil « inflammatoire » et un profil « régulateur » (Ito *et al.* 2005; Trinchieri 2007).

Le paradigme Th1/Th2, datant des années 1980, a été remis en cause en 2005 avec la découverte des lymphocytes T auxiliaires Th17 (Harrington *et al.* 2005). La signature cytokinique des Th17, incluant l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22, l'IL-23 et l'IL-25, favorise l'inflammation *via* l'induction d'autres cytokines et chemokines pro-inflammatoires (A. Luo *et al.* 2017). L'IL-17 a pour cible essentielle les cellules épithéliales dans lesquelles elle induit la production de facteurs de croissance (G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) et stem cell factor), de chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8) et de mucines au niveau des cellules épithéliales bronchiques. Ces lymphocytes se différencient sous l'influence du TGF-bêta, de l'IL-6 et de l'IL-21. L'IL-23 joue un rôle dans la différenciation mais aussi dans le maintien et l'amplification des Th17.

Une autre population lymphocytaire, celle des lymphocytes T régulateurs (Treg) dont la différenciation est sous l'influence du TGF-bêta et de l'IL-2, a été étudiée dans le même temps, ce qui a permis d'identifier deux catégories principales : les Treg inductibles (iTreg), induits en périphérie par le contact avec un antigène dans des conditions tolérogènes et les Treg naturels (nTreg), produits en permanence par le thymus. Ces Treg ont des propriétés légèrement distinctes mais participent tous au maintien de l'homéostasie immunologique. Globalement, les Treg ont une action opposée à celle des Th17, et jouent un rôle majeur dans la suppression de la réponse immunitaire innée et acquise (A. Luo *et al.* 2017). L'équilibre Th17/Treg est donc crucial dans le contrôle de la réponse inflammatoire. Malgré leur fonction opposée, les Th17 et les Treg nécessitent tous les deux la présence de TGF bêta pour leur différenciation ; cette cytokine bloque par ailleurs la différenciation Th1 et Th2.

Il est maintenant admis que les cellules T différenciées ont la capacité de changer leur phénotype et de se redifférencier vers d'autres formes. Cette flexibilité intrinsèque, ou plasticité, est influencée par le milieu cytokinique, les produits microbiens et les produits du métabolisme (Ueno *et al.* 2017).

1.1.3.1.1.1 Th17 et défense anti-infectieuse

Les cellules Th17 sont impliquées dans la défense contre les infections à certaines bactéries extracellulaire comme *Klebsiella pneumoniae* (Ouyang, Kolls, and Zheng 2008) ou champignons en particulier au niveau des barrières muqueuses. Plusieurs bactéries comme *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori* ou *Mycobacterium tuberculosis* mais aussi des champignons comme *Candida albicans* ou *Aspergillus fumigatus* induisent une réponse de type Th17. La production d'IL-17 et d'IL-22 par ces cellules stimule la sécrétion de peptides antimicrobiens et le recrutement des neutrophiles. La réponse anti-infectieuse induite par les Th17 est puissante, sa régulation est donc primordiale afin de ne pas causer d'inflammation excessive.

1.1.3.1.1.2 Équilibre Th17/Treg et MIC

Depuis une dizaine d'année l'implication des lymphocytes Th17 et Treg dans le maintien d'une homéostasie immunitaire a été mise en évidence. Les lymphocytes Th17 contribuent à la protection envers les pathogènes mais aussi au développement de pathologies auto-immunes et inflammatoires (McGeachy and McSorley 2012). Il est maintenant clairement accepté qu'un déséquilibre entre ces populations conduisait au développement et à la progression des maladies inflammatoires (A. Luo et al. 2017).

Un lien direct est établi entre l'arthrite induite au collagène et la réponse Th17 chez des souris IL-17$^{-/-}$ (Nakae *et al.* 2003) par la diminution de l'intensité de l'atteinte articulaire dans des modèles d'arthrite induite par l'injection d'anticorps (Lubberts *et al.* 2004) ou de récepteurs solubles neutralisant l'IL-17 (Bush *et al.* 2002). Il a été suggéré que les MIC étaient liées à la voie Th17 et non plus à la voie Th1 comme proposé par le paradigme Th1/Th2.

Chez l'homme l'importance de la voie Th17 dans certaines maladies auto-immunes est bien établie (A. Luo *et al.* 2017). Les réponses Th17 sont ainsi notamment associées à la sclérose en plaques, le psoriasis, la MC et la RCH *(*Ouyang, Kolls, and Zheng 2008*;* Peyrin-Biroulet *et al.* 2007; A. Luo *et al.*

2017). Une réponse de type Treg est associée à certaines infections, certains cancers et à la polyarthrite rhumatoïde (Figure 4).

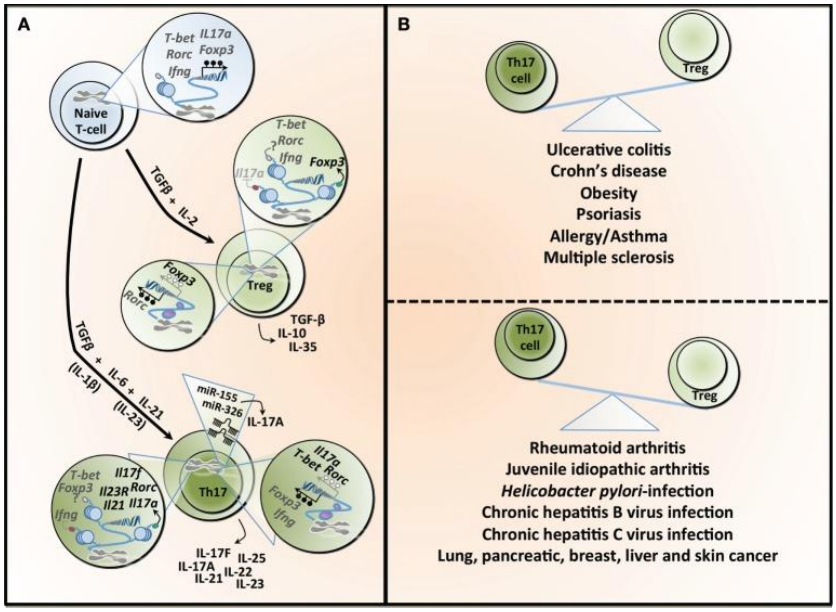


Figure 4 : Différenciation Th17/Treg et équilibre Th17/Treg en pathologie (A. Luo *et al.* 2017)

Les réponses Treg et Th17 pourraient être impliquées dans les deux composantes des MIC : l'auto-immunité *via* leur action au niveau des centres germinatifs et l'auto-inflammation. L'axe IL-23/IL-17 fait l'objet de recherches dans le traitement des MIC, dans le but de freiner la différenciation ou l'amplification des Th17, les cytokines de la famille de l'IL-17 ou la voie de transcription du signal, et plusieurs molécules sont déjà disponibles.

1.1.3.1.1.3 Th17, lien entre auto-immunité et défense de l'hôte

Un contrôle altéré de l'inflammation est impliqué dans la physiopathologie des MIC, mais la cause princeps de l'inflammation reste à définir. Plusieurs études suggèrent que l'exposition à certains microorganismes pourrait initier la réponse inflammatoire avec pour issue une réponse dysimmunitaire. Dans ce schéma l'IL-17 et les cellules Th17 jouent un rôle précoce dans le processus inflammatoire et établissent un lien entre immunité innée et adaptative.

1.2 MICI

1.2.1 Épidémiologie, clinique

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), composées de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH) sont des maladies chroniques, évoluant par poussées. Les symptômes associent des douleurs abdominales et une diarrhée parfois sanglante, en rapport avec une inflammation et/ou des ulcérations de la muqueuse digestive. La MC peut toucher tout le tube

digestif de la bouche à l'anus, alors que la RCH atteint exclusivement le colon avec une évolution ascendante partant du rectum. Les MICI sont associées dans 30 à 40% des cas à des manifestations inflammatoires extra-digestives, par ordre de fréquence les pathologies rhumatismales inflammatoires, ophtalmologiques et dermatologiques (Ardizzone *et al.* 2008). Peuvent s'associer un syndrome inflammatoire, une inflammation, une anémie multifactorielle ou une altération de l'état général. Le pic d'incidence de la MC se situe entre 20 et 30 ans, entre 30 et 40 ans pour la RCH.

La MC touche environ une personne sur mille et la RCH cinq personnes sur mille, mais ces valeurs sont en augmentation, avec une prévalence variable entre les pays, estimée à environ 1% de la population en Europe (Ventham *et al.* 2013). L'incidence et la prévalence sont nettement augmentées dans les pays dits développés ; on observe de plus au sein de l'Europe un gradient épidémiologique Nord/Sud, les pays nordiques étant les plus touchés (Nerich *et al.* 2010). L'espérance de vie des patients atteints de MICI est globalement comparable à celle de la population générale, avec cependant une morbidité importante. 80% des patients atteints de MC seront ainsi opérés au cours de leur vie. L'altération de la qualité de vie est constante et importante chez les patients atteints de MICI.

Le diagnostic est porté sur un faisceau d'arguments endoscopiques, histologiques et radiologiques pour la MC (Van Assche *et al.* 2010; Dignass *et al.* 2012).

1.2.2 Physiopathologie

L'origine des MICI est multifactorielle, leur physiopathologie résultant d'une interaction entre des facteurs environnementaux et un terrain génétique prédisposant, entraînant une dysrégulation du système immunitaire conduisant à l'inflammation digestive (Zhang *et al.* 2017).

1.2.2.1 Génétique

Il existe 50% de concordance de la MC chez les jumeaux monozygotes contre moins de 10% chez les dizygotes, et 15% des patients atteints de MC ont au moins un membre de leur famille atteint de MICI. Ce risque est moins important pour les RCH.

Les études récentes sur des dizaines de milliers de patients (genome-wide association studies ou GWAS) ont identifié plus de 200 loci de susceptibilité, chacun n'intervenant individuellement que chez un très faible pourcentage de patients. La plupart des patients présentent une susceptibilité de type polygénique ; cependant certaines mutations rares contribuent à des phénotypes particuliers comme un début de la maladie précoce (avant 5 ans) ou très précoce (avant 2 ans). Ces anomalies monogéniques interviennent dans l'homéostasie du système immunitaire digestif par plusieurs mécanismes.

La mutation la plus fréquente, découverte en 2001, est située sur le gène NOD2/CARD15. On retrouve chez 1/3 des patients atteints de MC une ou plusieurs mutations NOD2/CARD15. La protéine NOD2/CARD15 joue un rôle critique dans la protection innée contre les infections intestinales. En cas de mutation, la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth est diminuée

(Kobayashi *et al.* 2005). Deux gènes liés au processus d'autophagie, *IRGM* et *ATG16L1,* ainsi que des gènes liés aux maladies auto-immunes comme *IL23R* et *PTPN2* sont également fréquemment mutés, soulignant la participation de l'immunité innée mais également acquise (Loddo and Romano 2015). Nous détaillerons plus loin le rôle de ces mutations dans la physiopathologie des MIC.

Le fait que la génétique n'explique qu'une petite partie des maladies plaide en faveur d'une influence majeure de facteurs causaux environnementaux ou liés au microbiote, probablement *via* des modifications épigénétiques (Loddo and Romano 2015). Cependant, l'identification de variants génétiques pourrait permettre une meilleure stratification des patients ainsi qu'une meilleure personnalisation du traitement.

1.2.2.2 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux (exposome) identifiés dans les grandes études de populations sont associés au mode de vie occidental ; ils comprennent l'augmentation de l'hygiène, l'utilisation de tabac (qui aggrave la MC mais protège de la RCH), certains composés alimentaires, les infections digestives bactériennes, l'utilisation d'antibiotiques, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, de contraceptifs oraux et les antécédents d'appendicectomie (qui est rare dans les RCH) (Abegunde *et al.* 2016; van der Sloot *et al.* 2017).

A contrario, l'allaitement maternel, l'infection à *Helicobacter pylori* et la vitamine D sont des facteurs protecteurs de MICI.

Le rôle du microbiote intestinal sera traité dans le chapitre correspondant.

1.2.2.3 Système immunitaire

Le système immunitaire digestif est confronté à un défi particulier : il doit à la fois protéger la plus grande surface muqueuse du corps contre les infections et les dommages et maintenir une tolérance envers les antigènes alimentaires et les composants du microbiote intestinal. Il est actuellement admis que la perte de tolérance envers le microbiote digestif est l'évènement central dans la physiopathologie des MICI. Des facteurs variés contribuent probablement à cette perte de tolérance. Ils incluent des défauts de l'équilibre délicat entre les populations de cellules T effectrices et régulatrices (Ueno *et al.* 2017), une stimulation excessive des cellules dendritiques muqueuses, des infections ou des variants de protéines impliquées de façon critique dans la reconnaissance des antigènes bactériens, comme les produits des mutations NOD2/CARD15 associées à la MC (Z. Wen and Fiocchi 2004).

La réponse immunitaire adaptative a classiquement été considérée comme jouant un rôle majeur dans la physiopathologie des MICI. Cependant, les avancées récentes en immunologie et en génétique ont montré que l'immunité innée était également importante dans l'induction de l'inflammation digestive chez ces patients. En particulier, une fonction barrière altérée de l'épithélium digestif contribue à l'inflammation intestinale chez les patients présentant une RCH, et la production de peptides

antimicrobiens, le sensing microbien et l'autophagie sont particulièrement associés à la MC. La réponse Th17/Treg joue probablement un rôle majeur dans les MICI. Une meilleure compréhension des interactions entre les différents constituants des immunités adaptatives et innées est nécessaire (Geremia *et al.* 2014).

1.2.2.3.1 Anomalies de l'immunité innée

Dans la MC, on retrouve une réponse immunitaire altérée des macrophages, qui pourrait conduire à une clairance bactérienne inefficace et à la formation de granulome. On retrouve en effet dans les MICI une induction forte de NFkB dans l'épithélium digestif inflammatoire, causant une dysrégulation de la production cytokinique et des mécanismes de signalisation. Cela stimule la production de TNFα, d'IL-1 et de IL-6 par les macrophages (Slevin and Egan 2015).

En conditions normales, le dialogue entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques favorise l'homéostasie, la lymphopoïétine stromale thymique (LST) dérivée des cellules épithéliales orientant les cellules dendritiques vers un phénotype non-inflammatoire de type Th2. Dans la MC, les ARNm de la LST sont bas ou indétectables ; à la fois dans la MC et la RCH, les CDs muqueuses présentent des niveaux de TLR2 et TLR4 augmentés. Ces éléments suggèrent un conditionnement des cellules dendritiques vers un phénotype pro-inflammatoire, activé.

1.2.2.3.1.1 Mucus

La première ligne de défense envers les agents infectieux dans la lumière intestinale est la couche de mucus. Des souris double knock-out *Muc2*$^{-/-}$ développent une colite et des cancers digestifs, illustrant le rôle critique du mucus dans la prévention de la pénétration bactérienne et de l'inflammation digestive. Une expression réduite de l'ARNm de MUC1 a été observée dans l'iléon inflammatoire de patients atteints de MC, ainsi qu'une expression réduite des ARNm de MUC3, MUC4 et MUC5B dans l'iléon non inflammatoire (Buisine *et al.* 1999). De plus, le mucus colique des patients atteints de RCH permet aux bactéries digestives d'atteindre l'épithélium (Johansson *et al.* 2014).

1.2.2.3.1.2 Perméabilité intestinale

Une dysrégulation de la barrière intestinale est impliquée dans de nombreuses pathologies (Turner 2009), une augmentation de la perméabilité intestinale augmentant l'exposition à des produits d'origine alimentaire ou microbienne ou aux xénobiotiques. Une augmentation de la perméabilité intestinale a été observée de longue date dans la MC (Bjarnason *et al.* 1983) et plus récemment dans la RCH (Salim and Söderholm 2011) et est positivement corrélée au risque de rechute (Wyatt *et al.* 1993). Cependant, la perméabilité intestinale est modifiée par de nombreux facteurs, rendant toute conclusion difficile (Wyatt *et al.* 1993). Les données issues des GWAS suggèrent cependant que des défauts de la barrière épithéliale représentent un mécanisme pathogénique primaire (Geremia *et al.* 2014).

1.2.2.3.1.3 Peptides antimicrobiens

Un défaut d'expression des peptides antimicrobiens a été observé chez les patients atteints de MC, avec en particulier une induction réduite des bêta défensines dans le colon inflammatoire de patients atteints de MC comparés aux patients atteints de RCH. De plus, les patients présentant une MC iléale ont une expression réduite d'α-défensine. Les cellules de Paneth sécrétant les peptides antimicrobiens expriment NOD2, dont le polymorphisme est fortement associé à la MC iléale. De façon intéressante, l'expression d'α-défensine est encore plus réduite chez les patients présentant un variant de susceptibilité pour NOD2 (Geremia *et al.* 2014).

1.2.2.3.1.4 Autophagie

La MC est associée à des mutations des gènes *ATG16L1* et *IRGM*, qui sont impliqués dans l'autophagie, un mécanisme cellulaire hautement conservé dans lequel la formation d'une vésicule autour d'une bactérie invasive intracellulaire ou autour de matériel cytoplasmique permet sa dégradation efficace. De façon intéressante, s'il est connu que la stimulation immunitaire *via* les TLRs active l'autophagie, l'activation de NOD2 l'active également, et les variants de NOD2 et d'ATG16L1 entraînent une autophagie altérée ainsi qu'une modification de la présentation antigénique par les CD (Geremia *et al.* 2014).

1.2.2.3.1.5 IL-23 et cellules lymphoïdes innées

Des études récentes ont montré que, en plus de son activité sur les cellules Th17, l'IL-23 pouvait également agir sur les cellules de l'immunité innée mixtes, en particulier sur les cellules T gamma delta et les iNKT. De plus, l'IL-23 stimule également la production cytokinique par les cellules lymphoïdes innées (ILCs). Buonocore *et al.* ont identifié une population d'ILCs répondant à l'IL-23, responsables de l'inflammation intestinale dans des modèles de colite innée (Buonocore *et al.* 2010). Une augmentation des ILCs productrices d'IL-17A et d'interféron gamma a été observée dans la MC (Geremia *et al.* 2014). Les ILCs pourraient participer à l'inflammation intestinale par leur production de cytokines et *via* le recrutement d'autres cellules inflammatoires.

1.2.2.3.2 Anomalies de l'immunité acquise

1.2.2.3.2.1 Anticorps

La réponse humorale est globalement augmentée dans les MICI, ce qui se traduit par une augmentation des modifications de la production des différentes sous-classes des immunoglobulines. On retrouve dans le sérum de 50 à 90% des patients atteints de RCH des anticorps anti-cytoplasme des

polynucléaires neutrophiles (pANCA), moins fréquemment chez les patients atteints de MC. Chez ces patients on retrouve par contre une propension à développer des anticorps dirigés contre plusieurs antigènes microbiens, par exemple le plus fréquemment contre *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), contre la flagelline (CBir1), contre la protéine C de la membrane externe d'*E. coli* ou encore contre les glycanes qui sont des composants de nombreuses cellules et microorganismes. Jusqu'à présent, il n'a pas été montré que ces anticorps décrits dans les MICI ont un effet pathogène direct, et les preuves d'une immunité à médiation cellulaire augmentée envers des antigènes microbiens sont limitées (Pirzer *et al.* 1991). Cependant, des études s'intéressant à la réponse immunitaire humorale ont apporté deux informations : il existe une corrélation entre la sévérité de la maladie et le nombre et le titre des anticorps anti-bactériens ; cela renforce l'idée que les antigènes microbiens sont impliqués dans la physiopathologie des MICI (de Souza and Fiocchi 2016).

Les pANCA et les ASCA ne sont ni sensibles ni spécifiques ; leur utilisation en pratique clinique est limitée à l'aide à la distinction entre RCH et MC, puisque les combinaisons pANCA positif/ASCA négatif et pANCA négatif/ASCA positif sont hautement spécifiques (95-100%) de ces maladies, respectivement, avec une sensibilité restant médiocre (50-60%), ce qui empêche d'utiliser ces dosages dans le cadre d'un dépistage (Z. Wen and Fiocchi 2004).

1.2.2.3.2.2 Cellules T

Les populations T effectrices sont également modifiées. Ces cellules ont pour caractéristique principale leur très grande plasticité en réponse à leur environnement, ce qui est particulièrement intéressant dans le cadre de l'étude des MICI. L'adaptation de l'hôte à des conditions changeant en permanence est requis pour l'homéostasie immunitaire ; un défaut d'adaptation (rigidité biologique) pourrait empêcher les processus de restauration et pourrait maintenir la réponse immunitaire, entraînant une inflammation chronique (O'Connor, Zenewicz, and Flavell 2010).

Jusqu'aux années 2000, la MC était décrite comme une maladie transmurale Th1 dépendante, basée sur une production élevée d'IL-12 et d'INF-gamma, quand la RCH était décrite comme une maladie Th2 atypique, basée sur une production élevée d'IL-5 et d'IL-13, mais basse d'IL-4. Ce paradigme Th1/Th2 a été remis en cause avec la découverte des cellules Th17 productrices d'IL-17 et de l'interaction entre les cellules Th1, Th2, Th17 et Treg. La production d'IL-17 est augmentée dans la muqueuse et le sérum de la plupart des patients atteints de MICI, mais est constamment plus élevée chez les patients atteints de MC que chez ceux atteints de RCH.

Les cellules Th17 produisent de nombreuses autres cytokines, incluant l'IL-21 et l'IL-22 ; toutes ne sont pas pro-inflammatoires, l'IL-22 limitant par exemple l'inflammation dans un modèle murin de colite (Sugimoto *et al.* 2008). Les cellules dendritiques humaines exposées à des bactéries concourent à la production d'IL-17, ce qui favorise l'inflammation et l'élimination des pathogènes, représentant donc un mécanisme de défense. Ce scénario pourrait ne pas se produire en cas de mutation *NOD2*, conduisant à une inflammation chronique IL-17 dépendante.

Les cellules T régulatrices sont cruciales pour la tolérance des antigènes du soi. Des défauts de fonction des cellules Treg sont associés au développement de pathologies infectieuses, auto-immunes et

inflammatoires chroniques dont les MICI (Mayne and Williams 2013). Les cellules Treg typiques CD4+FoxP3+CD25+ ont été détectées dans la muqueuse normale de la souris ; leur nombre augmente durant l'inflammation et guérit les colites Th1. Les cellules Treg sont sensibles aux changements de composition du microbiote intestinal en termes de nombre et d'état d'activation (Mayne and Williams 2013). Le rôle des cellules Treg dans les MICI est peu connu. Si le nombre de cellules Treg sanguines diminue en cas de maladie active, elles sont plus nombreuses dans la lamina propria et exercent une activité immunosuppressive *in vitro* (Maul *et al.* 2005). Cela suggère que leur capacité régulatrice est insuffisante pour contrôler les MICI, renforçant l'hypothèse selon laquelle la physiopathologie des MICI est due au moins en partie à un défaut de suppression immune (Huibregtse, van Lent, and van Deventer 2007). Stimuler la fonction des cellules Treg pourrait avoir des effets bénéfiques, ce qui est suggéré par la découverte que les anti-TNFα utilisés dans les MICI restaurent la fonction suppressive des cellules Treg (Valencia *et al.* 2006). De plus, les anti-TNFα augmentent le nombre de cellules Treg dans la muqueuse digestive de patients pédiatriques atteints de MC (Ricciardelli *et al.* 2008) et inhibent leur apoptose dans la muqueuse des patients adultes présentant une MICI active (Veltkamp *et al.* 2011).

Des changements quantitatifs dans les populations des lymphocytes Th17 et Treg ont été retrouvés à la fois dans les modèles murins de colite et chez les patients atteints de MICI. Une augmentation des transcrits d'*IL17* a été retrouvée dans la muqueuse de patients atteints de RCH et de MC par rapport aux sujets contrôles (Fujino *et al.* 2003; Sugihara *et al.* 2010). La relation entre IL-17 et la genèse des MICI est cependant complexe, les anticorps anti-IL-17 n'étant pas efficaces dans la MC (Hueber *et al.* 2012). Les concentrations sériques d'IL-22, une autre cytokine produite par les Th17, sont significativement augmentées dans les MICI et dans les modèles murins de colite. La réponse pro-inflammatoire excessive est liée à une différenciation et une accumulation diminuées des Treg, ainsi qu'à des anomalies fonctionnelles de ces Treg dans les tissus inflammés (Schiering *et al.* 2014) ou dans le sang périphérique des patients présentant une MICI active (Geremia *et al.* 2014). De plus, les patients atteints de MICI présentent une augmentation des populations de cellules T « transdifférenciées », suggérant une augmentation de la plasticité de ces populations (Ueno *et al.* 2017). Moduler l'équilibre Th17/Treg pourrait donc être exploité pour inhiber l'environnement tissulaire pro-inflammatoire. Plusieurs études ont en effet montré que cette modulation précise de l'équilibre entre les réponses pro et anti-inflammatoire pourrait diminuer l'inflammation intestinale (S.-Y. Lee et al. 2015; Bai et al. 2009).

De plus, les lymphocytes T muqueux sont résistants à l'apoptose dans la MC (Ina *et al.* 1999, 2). L'apoptose des lymphocytes T activés étant nécessaire pour éviter une réponse immune prolongée, l'accumulation inappropriée de lymphocytes T activés dans la MC pourrait participer à une inflammation chronique délétère. L'action pro-apoptotique des anti-TNFα utilisés dans la MC pourrait donc en partie expliquer leur efficacité (ten Hove *et al.* 2002; Shen *et al.* 2005). Le fait que l'etanercept n'induise pas d'apoptose des cellules T (Van den Brande *et al.* 2003; Shen *et al.* 2005) pourrait expliquer son inefficacité dans ces maladies. Cependant, cette explication a été remise en cause par la constatation de l'efficacité du certolizumab dans la MC, alors que cette molécule anti-TNFα ne semble pas capable d'induire l'apoptose des cellules T *in vitro* (Nesbitt *et al.* 2007).

De plus, d'autres cellules immunitaires comme les natural killers (NK), les natural killers T (NKT) et les innate lymphoid cells (ILCs) qui partagent plusieurs fonctions avec les cellules T sont probablement impliquées dans la physiopathologie des MICI, de même que d'autres cellules impliquées dans le

processus inflammatoire comme les cellules épithéliales, endothéliales, mésenchymales et adipeuses, ainsi que d'autres composants comme l'inflammasome et les ARNs régulateurs (de Souza and Fiocchi 2016).

Ainsi, les anomalies immunitaires accompagnant les MICI sont clairement diverses, ce qui n'écarte pas la possibilité que le facteur déclenchant soit similaire, voire le même.

Ces perturbations immunologiques ne sont qu'une pièce du puzzle complexe dans la physiopathologie des MICI, et doivent être interprétées dans le contexte des autres composants de l'interactome (exposome, génome et microbiome…).

- DAMPs

L'inflammation, particulièrement lorsqu'elle est sévère comme dans le cas des MICI, induit des dommages et des formes variées de mort cellulaire, entraînant le relargage de multiples molécules nucléaires et cytosoliques possédant des propriétés pro-inflammatoires intrinsèques. Ces produits, appelés DAMPs, se lient aux récepteurs TLR1-9 et à d'autres récepteurs. Les DAMPs peuvent induire une inflammation « stérile », indépendante de la présence de PAMPs ou de MAMPs (Rock *et al.* 2010). Ainsi, tout évènement induisant le relargage de DAMPs pourrait induire une poussée de MICI.

Un aspect particulièrement intéressant en ce qui concerne les maladies chroniques est l'intégration des DAMPs avec les signaux MAMPs, qui induit une amplification et un maintien de l'inflammation (El Mezayen *et al.* 2007). Ce concept a été défini par Nathan et Ding qui ont émis l'idée que « l'inflammation non résolue » résultait de l'action concomitante des stimuli MAMPs/DAMPs, particulièrement une fois que l'inflammation est initiée dans l'organe affecté (Nathan and Ding 2010). Ainsi, un cycle auto-entretenu pourrait être initié après un stimulus inflammatoire primaire, causant la libération de DAMPs qui, à leur tour, pourraient induire une inflammation et des dommages médiés par les DAMPs et/ou les MAMPs, causant finalement une inflammation chronique. Inversement, la présence physiologique de MAMPs non associée à des DAMPs n'induirait pas d'inflammation.

1.2.3 MICI : maladies inflammatoires ou auto-immunes ?

La physiopathologie des MICI n'est à ce jour pas élucidée, mais elle fait intervenir des mécanismes classiquement définis comme appartenant à l'auto-immunité et des mécanismes médiés par l'immunité. Les phénomènes médiés par l'immunité incluent une variété d'anomalies de l'immunité humorale et cellulaire ainsi qu'une augmentation généralisée de la réactivité envers les antigènes bactériens intestinaux dans les deux MICI. Même si ni la MC ni la RCH ne remplissent pas tous les critères classiques d'auto-immunité (en particulier car il n'existe pas d'argument convaincant pour une spécificité d'organe des auto-anticorps), il est certain que des évènements auto-immuns surviennent dans les MICI.

De façon intéressante, un auto-antigène de l'épithélium colique reconnu par des anticorps de type IgG retrouvés dans la muqueuse de patients présentant une RCH a été décrit (Takahashi and Das 1985). Cet auto-antigène, probablement la tropomyosine (Geng *et al.* 1998), est également présent dans la

peau, les canaux biliaires, les yeux et les articulations, qui sont les sites typiques des manifestations extra-digestives de la RCH, suggérant qu'une réponse immunitaire médiée par les anticorps pourrait être responsable à la fois des manifestations digestives et extra-digestives (Halstensen, Das, and Brandtzaeg 1993).

De plus, il a été montré que le transfert de lymphocytes T CD4+ dirigés contre un antigène bactérien (appartenant à l'espèce pathogène *Helicobacter hepaticus*) était capable d'induire une colite chez des souris prédisposées infectées par cette bactérie (Kullberg *et al.* 2003), ce qui tend à rapprocher les MICI de la définition classique des MAI, même si considérer des antigènes bactériens comme des antigènes du soi n'est pas consensuel (Guerrero, Margulis, and Berlanga 2013).

1.3 SpA

1.3.1 Épidémiologie, clinique

Le terme récent spondyloarthrite (SpA) regroupe plusieurs dénominations classiques de maladies inflammatoires rhumatismales : la spondylarthrite anlylosante (SA), l'arthrite psoriasique, les arthrites associées aux MICI, l'arthrite réactionnelle, ainsi que la spondyloarthrite juvénile et le syndrome SAPHO. Les patients atteints de SpA peuvent être distingués en fonction de leur présentation clinique en patients présentant une SpA axiale (touchant majoritairement le rachis) ou en patients présentant une SpA périphérique. Les symptômes associent des douleurs et des synovites qui peuvent toucher toutes les articulations et qui prédominent au niveau du rachis et des articulations sacro-iliaques (syndrome pelvirachidien) et/ou des articulations distales selon le type clinique. Peuvent s'y associer des manifestations extra-articulaires oculaires, digestives MICI-like, dermatologiques et parfois cardiaques.

Le diagnostic de SpA est clinique et radiologique ; il existe des formes non radiographiques, y compris pour les SpA axiales (Rudwaleit *et al.* 2009, 2011). Les radiographies conventionnelles n'objectivant des anomalies qu'après plusieurs années d'évolution, l'utilisation de l'IRM, qui permet une détection précoce de l'inflammation articulaire, devient courante. L'utilité du PET-scanner est en cours d'évaluation. La prévalence des SpA est estimée à 0,43% dans la cohorte française GAZEL, avec une large prédominance masculine (sex-ratio de plus de 5/1) (Costantino *et al.* 2015).

1.3.2 Physiopathologie

Comme les MICI, les SpA sont des maladies multifactorielles dont la physiopathologie est imparfaitement comprise et résulte d'interactions entre un terrain génétique et des facteurs environnementaux.

1.3.2.1 Génétique

Il est connu depuis plusieurs décennies que le HLA-B27, allèle normal du complexe majeur d'histocompatibilité présent dans 6-8% de la population, expose à un risque relatif de 200 de développer une SA, avec une incidence de 90% chez les patients présentant une SA ('HLA-B27 and Risk of Ankylosing Spondylitis' 1978). De même, Costantino *et al.* ont observé que l'allèle HLA-B27 augmentait le risque de SpA d'un facteur 39 (Costantino *et al.* 2015). Le rôle du HLA-B27 n'est pas encore clairement compris. Il a été suggéré que la présentation d'antigènes bactériens (hypothèse du mimétisme moléculaire) ou d'antigènes du soi (hypothèse du peptide arthrogène) pourrait faciliter, à l'occasion d'une infection bactérienne ou d'une modification de la flore commensale, une rupture de la tolérance au soi. Une erreur de repliement de la chaîne lourde du HLA-B27 pourrait également mener à une réponse immunitaire cellulaire aberrante. Enfin, le HLA-B27 pourrait se lier aux récepteurs d'immunoglobulines tueuses (KIRs) qui module la fonction des cellules immunes et non-immunes. Plus récemment a été émise l'hypothèse que l'expression du HLA-B27 pourrait modifier le microbiote intestinal, en raison notamment de l'observation de différences de microbiote chez les souris HLA-B27/bêta2microglobuline comparées aux souris non transgéniques (Asquith and Rosenbaum 2016; Lin *et al.* 2014).

En plus de cette association forte entre HLA-B27 et SpA, il existe une association faible avec plus de 40 gènes.

La protéine 1 associée au réticulum endoplasmique (ERAP1) est une enzyme protéolytique qui clive les peptides afin qu'ils puissent se lier aux molécules du CMH de classe I. Les variations de présentation des antigènes microbiens pourraient modifier la réponse immunitaire spécifique au microbiote. Le polymorphisme *ERAP1* est l'association génétique la plus forte après le HLA-B27. Plus récemment un polymorphisme *ERAP2* a été retrouvé, indépendamment du statut HLA-B27.

Un polymorphisme IL23R est également retrouvé. Le rôle majeur de l'IL-23 a été démontré dans plusieurs modèles animaux de SpA. L'IL-23 joue un rôle clé dans la réponse Th17 impliquée dans la SA, le rhumatisme psoriasique et l'arthrite réactionnelle (Sherlock, Taylor, and Buckley 2015). Ces réponses Th17 impliquent les cellules T helper CD4+ et les ILCs, qui sont toutes deux liées au microbiote intestinal.

RUNX3 et *TBX23* codent deux facteurs de transcription et sont associés à la SA. Runx3 est un facteur critique pour la fonction des ILC3, et sa délétion spécifique sur les ILCs augmente la susceptibilité à l'infection par le pathogène digestif *Citrobacter rodentium* (Ebihara *et al.* 2015, 3). *TBX23* code pour le facteur de transcription T-bet, qui limite l'activation des cellules dendritiques digestives par le microbiote intestinal et l'activation médiée par les cytokines des ILCs inflammatoires (Ermann *et al.* 2014, 2; Garrett *et al.* 2007).

Les gènes codants pour la protéine tyrosine phosphatase, le PTN22, l'IL-27 et l'IL-33 sont également des gènes de susceptibilité pour la SpA. Ces gènes interviennent dans le maintien de la barrière muqueuse et dans l'homéostasie immune (Asquith and Rosenbaum 2016).

1.3.2.2 Environnement

Le rôle de facteurs environnementaux dans le déclenchement et la sévérité des SpA a été mis en évidence, comme le tabac, les évènements de vie stressants et le stress mécanique (Lukas, Dougados, and Combe 2016; Zeboulon-Ktorza *et al.* 2013; Benjamin and McGonagle 2009). De plus, il est connu de longue date que certaines infections digestives (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp. and *Campylobacter* sp) et uro-génitales (*Chlamydia* sp.) pouvaient déclencher des arthrites réactionnelles, 20% des patients développant une SA dans les 10 à 20 ans (Bazin *et al.* 2018). De plus, on suspecte qu'une infection chronique virale ou bactérienne à bas bruit au niveau des cellules souches médullaires pourraient contribuer à la physiopathologie des SpA, au moins à leur début (Berthelot and Sibilia 2016).

1.3.2.3 Système immunitaire

L'étude des anomalies immunitaires muqueuses dans les SpA est moins détaillée que dans les MICI, en raison de l'hétérogénéité de ce groupe de maladies mais également du lien physiopathologique qui a été montré plus récemment entre système digestif et SpA.

Si plusieurs études suggèrent une augmentation de la perméabilité intestinale dans la SpA, cette constatation a été remise en question (Gill *et al.* 2015).

Une réponse exacerbée des cellules immunitaires innées comme les macrophages, les mastocytes et les neutrophiles est responsable de la plus grande partie de l'inflammation dans les SpA. Les macrophages de patients atteints de SA produisent par exemple des niveaux anormalement élevés d'IL-23 en réponse au LPS (Zeng, Lindstrom, and Smith 2011). Ces cellules immunitaires semblent être les principales productrices à la fois des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1, IL-23, IL-17) et anti-inflammatoires (IL-10) retrouvées en excès dans la SpA (van de Sande and Baeten 2016). Des concentrations sériques augmentées en IL-23 et en IL-17 ont été retrouvées chez les patients présentant un SA (Mei *et al.* 2011). Des niveaux élevés d'IL-17 dans le liquide synovial de patients présentant une arthrite réactionnelle ou une SpA indifférenciée ont également été mesurés (Singh, Misra, and Aggarwal 2011). Ces études, mettant en évidence une participation de l'axe de IL-23/IL-17 dans la physiopathologie des SpA, suggèrent une participation forte des Th17, et sont à l'origine du développement de molécules antagonistes de l'IL-17.

L'analyse immunohistologique du tissu synovial dans les SpA révèle une infiltration de cellules immunitaires innées, particulièrement les macrophages. Le nombre de macrophages est corrélé à l'activité de la maladie et diminue en cas d'efficacité du traitement. D'autres cellules de l'immunité innée comme les polynucléraires neutrophiles et les mastocytes jouent probablement un rôle dans la physiopathologie des SpA (Ambarus *et al.* 2012). Des cellules ILC ont également été récemment identifiées dans le liquide synovial de patients atteints de SpA (Al-Mossawi *et al.* 2015; Cuthbert *et al.*, n.d.). Leur rôle exact dans la physiopathologie des SpA reste à préciser.

Des auto-anticorps anti-CD74 ont été décelés dans le sérum de patients atteints de SpA (Baerlecken *et al.* 2014, 74). CD74 est impliqué dans l'assemblage du CMH de classe II, et est impliqué dans la différenciation des cellules B. *In vitro*, la liaison des anticorps au CD74 induit la production de cytokines

pro-inflammatoires, ce qui suggère une implication de ces auto-anticorps dans la physiopathologie des SpA.

1.3.3 Maladie auto-inflammatoire ou auto-immune ?

Les SpA ne partagent pas de facteurs de risques génétiques, la prédominance féminine, la présence d'auto-anticorps spécifiques de la maladie et une réponse aux thérapies ciblant les cellules T ou B (abatacept, rituximab…) avec les maladies auto-immunes classiques que sont la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé. Une réponse augmentée des cellules innées (macrophages, mastocytes et polynucléaires neutrophiles) est responsable de l'inflammation dans la SpA. La prédominance d'anomalies des lignées myéloïdes *versus* lymphoïdes suggère une origine plutôt auto-inflammatoire qu'auto-immune, ce qui explique que les thérapies ciblant les cellules de l'immunité innée ou leurs cytokines pourraient être plus efficaces que les thérapies ciblant les cellules T ou B. De plus, le terrain génétique et l'importance des facteurs déclencheurs bactériens et mécaniques orientent vers une origine auto-inflammatoire (Ambarus *et al.* 2012).

Cependant, la découverte d'auto-anticorps anti-CD74 et de polymorphismes *PTN22*, retrouvés dans d'autres maladies auto-immunes, suggère qu'il existe une part non négligeable de mécanisme auto-immun dans la physiopathologie des SpA.

1.4 Overlap SpA/MICI

Environ 30% des patients atteints de MICI présentent des manifestations de SpA, tandis que 5 à 10% des patients atteints de SpA souffrent également d'une MICI (Shivashankar et al. 2013). Des lésions iléales ou coliques endoscopiques sont détectées chez 30 à 45% de ces patients, et des lésions histologiques chez 60% de ces patients (Ciccia, Rizzo, and Triolo 2016). En outre, une rémission clinique de la SA est toujours associé à une normalisation de l'histologie digestive, tandis que la persistance des symptômes rhumatismaux est majoritairement associée à la persistance d'une inflammation intestinale (Cypers *et al.* 2014). Ces éléments plaident en faveur d'un lien étroit entre la physiopathologie des atteintes intestinales et articulaires, qui pourrait être expliqué par le rôle crucial de la flore digestive (M.-E. Costello *et al.* 2015).

De façon intéressante, plusieurs gènes de susceptibilité sont partagés entre les SpA et les MICI, en particulier ceux appartenant à la voie de signalisation IL-23/IL-17, qui est impliquée dans la réponse envers les pathogènes, incluant les bactéries et les levures (Ellinghaus *et al.* 2016).

Une hypothèse permettant de relier le système digestif aux atteintes inflammatoires articulaires est la circulation de bactéries ou de composants bactériens à l'échelle systémique. Il a été ainsi montré que des bactéries vivantes pouvaient être retrouvées dans les articulations ou les enthèses au sein de cellules dendritiques et/ou de macrophages. Cette circulation peut également se produire directement par voie sanguine ou lymphatique, ce qui a été prouvé dans le cas de la maladie de Whipple. Cette explication est anatomiquement plausible, puisqu'il existe un reflux lymphatique au niveau des sacro-

iliaques en cas d'obstruction des vaisseaux lymphatiques mésentériques (Berthelot and Claudepierre 2016).

De façon intéressante, ces effets ne sont pas confinés au tube digestif, et à la fois le butyrate et le propionate exercent des effets sur la différenciation périphérique des Treg (Arpaia *et al.* 2013).

La SpA et les MICI sont donc des MIC proches du point de vue clinique et de leur physiopathologie éminemment complexe, faisant intervenir des mécanismes auto-inflammatoires mais aussi auto-immuns. La persistance d'un signal Danger tissulaire au niveau digestif pourrait être le *primum movens* commun de ces deux maladies. Des anomalies du contenu luminal digestif et, en particulier, du microbiote intestinal pourraient induire ce signal Danger dans un contexte génétique prédisposant. Ces deux groupes de maladies pourraient ainsi être considérés comme des expressions phénotypiques différentes d'un même substratum physiopathologique.

2 Microbiote intestinal

2.1 Description

Au XXe siècle, seulement 20% environ des bactéries du microbiote intestinale étaient cultivables, en raison de difficultés particulières liées à la complexité de l'environnement digestif.

L'essor des technologies s'affranchissant des méthodes de culture a induit la production exponentielle de données issues du microbiote.

Le microbiote correspond à l'ensemble des microorganismes hébergés par un individu. Il peut s'agir de bactéries mais aussi de virus, de champignons, d'archées ou encore d'organismes eucaryotes complexes comme les helminthes. Le microbiome est l'ensemble des gènes présents dans le microbiote.

La littérature s'intéressant au nombre de cellules dans l'organisme est très disparate. Un article récent a évalué à partir des méthodes de calcul les plus précises le nombre de cellules humaines et bactériennes dans le corps humain. Dans cette étude, le nombre total de bactéries hébergées par un adulte de 70kg était évalué à $3{,}8.10^{13}$, avec une masse estimée à 200 grammes (0,3% de la masse totale). Le nombre total de cellules humaines, dominées par les lignées hématopoïétiques, était évalué à $3{,}0.10^{13}$. Cette étude a remis en question le dogme d'une nette supériorité numérique des bactéries par rapport aux cellules humaines, en montrant que les deux types cellulaires étaient numériquement équivalents (Sender, Fuchs, and Milo 2016a).

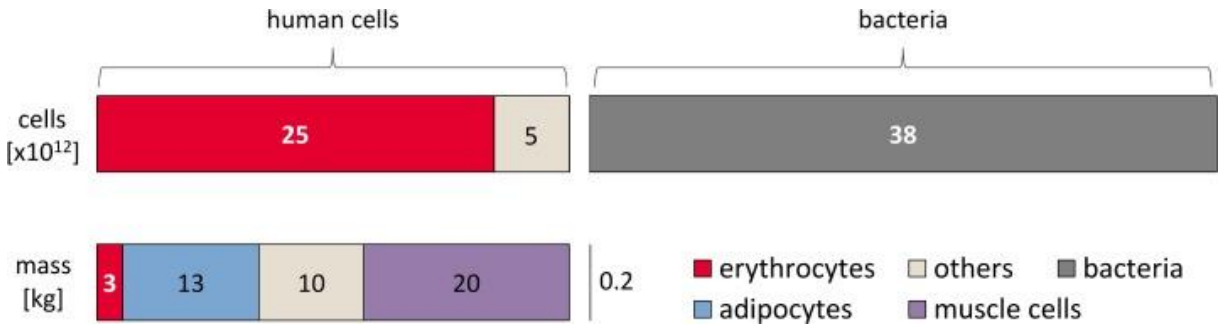


Figure 5 : Nombre de cellules et masses des différents types cellulaires dans un corps humain adulte de 70kg. La barre supérieure représente le nombre de cellules, la barre inférieure représente la contribution de chaque type cellulaire à la masse totale, en excluant environ 24kg de masse extracellulaire (Sender, Fuchs, and Milo 2016b).

Cependant, le nombre de gènes bactériens totaux contenus dans le microbiote humain est très largement supérieur aux nombre de gènes strictement humains, avec un rapport de 150/1 (plusieurs millions contre 23000 gènes humains) (Qin *et al.* 2010).

Le microbiote viral, largement méconnu, est composé d'environ 90% de bactériophages (Scarpellini *et al.* 2015). Quatre familles de l'ordre des *Caudovirales* semblent dominer, mais la majorité des espèces sont inconnues (Babickova and Gardlik 2015). La complexité de leur étude est liée à leur diversité extrême, à leurs interactions multiples avec les différents constituants du microbiote et les cellules de l'hôte *via* les transferts horizontaux de gènes et leurs interactions avec les acides nucléiques (Abeles and Pride 2014). Il est intéressant de noter que le virome semble co-varier avec l'ensemble du microbiome (Minot *et al.* 2011).

Le mycobiote est également relativement méconnu, étant minoritaire au sein de l'écosystème du microbiote digestif (Huseyin *et al.* 2017). De plus, les méthodes d'analyse du mycobiote manquent encore plus de standardisation que l'étude du microbiote bactérien. Son rôle en santé et en pathologie est cependant de plus en plus étudié (Enaud *et al.* 2018; Harry Sokol *et al.* 2016).

En ce qui concerne les archées, il n'existe à l'heure actuelle pas d'argument fort pour un rôle de leur part en pathologie humaine (Aminov 2013) et leur étude est très parcellaire.

Les techniques indépendantes de la culture ont montré que les microorganismes subsistaient au sein de communautés complexes, en interaction permanente, composés de nombreuses espèces et de plusieurs règnes.

Il est apparu que chaque habitat et chaque organisme possèdaient leur propre microbiote. Cela inclut l'holobionte humain, qui est l'entité regroupant les cellules humaines et le microbiote associé à l'échelle d'un organisme humain.

2.1.1 Notion de dysbiose

Le terme fréquemment cité de dysbiose manque de précision. Il est communément compris comme une composition de microbiote intestinal différant de la normale et associée à un état pathologique. Cependant, d'une part, il n'existe pas de définition précise de ce qu'est un microbiote normal et, d'autre part, une composition peut différer d'une autre de plusieurs façons (charge bactérienne totale, abondances absolue ou relative, présence ou absence d'espèce(s) particulière(s), α ou β diversité). Ce terme devrait être évité au profit d'une description précise des différences observées (Hooks and O'Malley 2017).

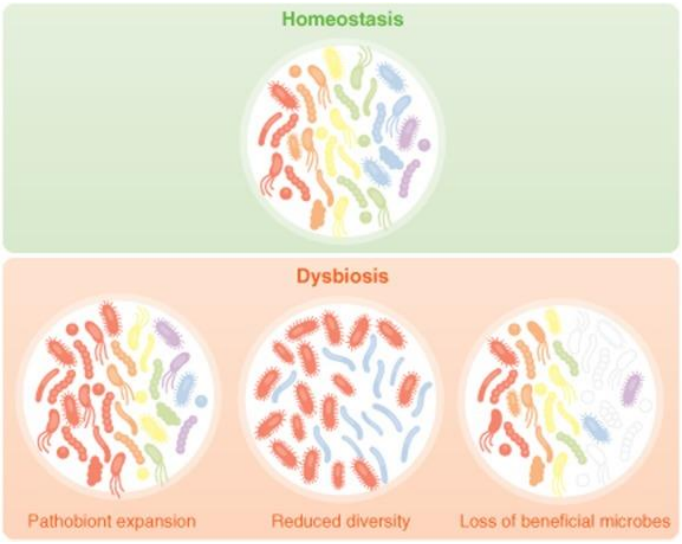


Figure 6 : Microbiote et « dysbiose ». La perte de microorganismes bénéfiques, l'expansion de pathobiontes ou la perte de diversité associées à un état pathologique sont fréquemment regroupées sous le terme de « dysbiose » (Petersen and Round 2014).

Lorsque l'organisme est en état d'homéostasie, le microbiote intestinal est composé d'organismes divers dont certains sont bénéfiques pour le développement et la santé de l'hôte. Cependant, des perturbations environnementales, comme un traitement antibiotique ou une alimentation particulière, peut entraîner un déséquilibre de la communauté microbienne. Ce déséquilibre peut conduire à la perte d'organismes bénéfiques ou au développement de commensaux ayant un potentiel délétère, les pathobiontes. La domination du microbiote par des pathobiontes peut entraîner des pathologies variées. Le fait que les effets positifs de composants du microbiote soient souvent non redondants explique que la perte complète d'un seul composant peut également rompre l'état d'équilibre.

2.1.2 Stabilité

La stabilité de la composition du microbiote intestinal est considérée comme critique pour la santé humaine en général et résulte d'un équilibre compétitif au sein des populations bactériennes, fungiques et virales. Une instabilité du microbiote intestinal a été retrouvée dans des pathologies comme les MICI et des anomalies neurodéveloppementales.

De façon contre-intuitive, la stabilité n'est pas favorisée par des réseaux de coopération entre les microorganismes (par exemple, en cas de complémentarité métabolique), mais plutôt par la compétition qui affaiblit ces réseaux de coopération. La stabilité est ainsi favorisée par une limitation des rétrocontrôles positifs et par un affaiblissement des interactions écologiques (Coyte, Schluter, and Foster 2015).

Un microbiote intestinal stable possède une capacité de résilience, c'est-à-dire que sa composition aura tendance à être restaurée après un évènement perturbateur (par exemple une antibiothérapie) (De La Cochetière *et al.* 2005). Cependant, en cas de dépassement de cette capacité de résilience, un nouvel état stable alternatif peut être atteint (Figure 7).

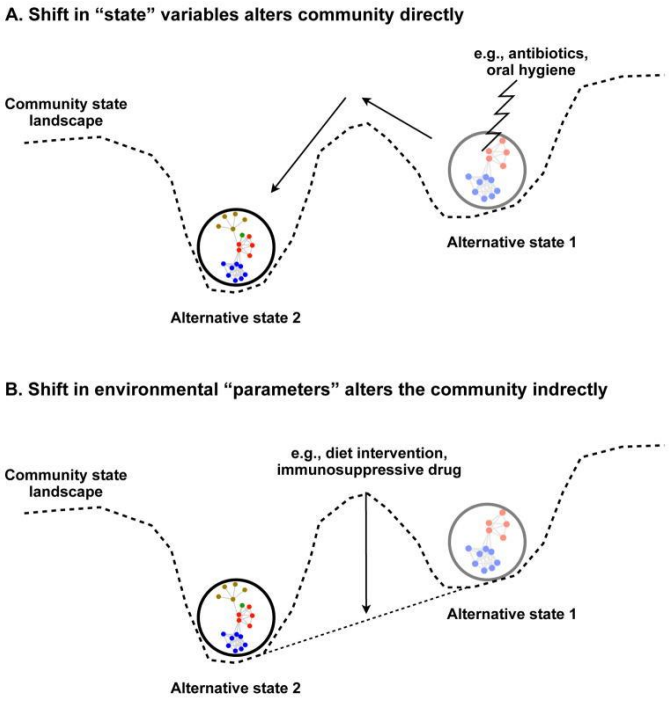


Figure 7 : Représentation schématique du "paysage de stabilité" de la composition du microbiote intestinal. La balle représente la composition du microbiote intestinal et le déplacement horizontal de la balle représente les changements de composition. La profondeur des « vallées » représente la probabilité que la composition se maintienne dans son état initial malgré des perturbations mineures et donc sa stabilité. La perturbation peut modifier la composition A. directement en modifiant la répartition des microorganismes ou leur activité B. indirectement en changeant les paramètres environnementaux. Dans les deux cas la composition peut être modifiée et atteindre un état stable différent (E. K. Costello *et al.* 2012).

2.2 Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal

La composition du microbiote intestinal est sous l'influence de facteurs endogènes et exogènes (environnementaux).

Les facteurs endogènes comprennent le terrain génétique (Goodrich *et al.* 2014), la réponse immunitaire (S. Wang *et al.* 2015) et l'âge.

Les facteurs exogènes sont très nombreux et comprennent le mode d'accouchement (Bäckhed *et al.* 2015), l'alimentation (y compris l'allaitement) (David *et al.* 2014), les xénobiotiques (y compris les antibiotiques (I. Cho et al. 2012) et d'autres médicaments) (Maurice, Haiser, and Turnbaugh 2013), les

infections (Hsiao *et al.* 2014) et expositions environnementales à des microorganismes (Fujimura *et al.* 2014), le rythme circadien (Thaiss *et al.* 2014), les pratiques sexuelles (Noguera-Julian *et al.* 2016), l'activité physique (O'Sullivan *et al.* 2015).

On note que plusieurs de ces facteurs sont également des facteurs de risque connus d'obésité et de manifestations allergiques.

L'influence relative de ces facteurs dans la composition du microbiote varie considérablement. Le sexe, l'âge, l'alimentation, la prise d'antibiotiques et la consistance des selles (Vandeputte *et al.* 2015) (qui est un facteur composite) semblent exercer une influence majeure, alors que le mode d'accouchement ne semble pas modifier significativement la composition du microbiote à l'âge adulte (Zhernakova *et al.* 2016; Falony *et al.* 2016).

2.2.1 Évolution avec l'âge

Au-delà des facteurs exogènes, la composition du microbiote intestinal n'est pas figée au cours du temps. La première étape de la colonisation du tractus digestif ne se produit pas lors de l'accouchement ; comme on le pensait encore récemment, mais *in utero* (Lynch and Pedersen 2016). Le mode d'accouchement influence la composition du microbiote post-natal. L'arrêt de l'allaitement coïncide avec une évolution rapide vers une composition proche de celle des adultes, comprenant une augmentation de la diversité et des fonctions microbiennes. Entre l'âge de 1 et 5 ans, cette composition se stabilise, puis évolue à nouveau lors de la préadolescence pour se stabiliser vers l'âge de 12 ans.

Le microbiote adulte est dominé par les phyla des Bacteroidetes et des Firmicutes, mais comprend également des Actinobacteria, des Proteobacteria et des Verrucomicrobia, ainsi que des archées méthanogéniques, des eucaryotes (principalement des levures) et de multiples phages.

A l'échelle des phyla, le microbiote intestinal adulte est stable, mais à l'échelle des espèces et des sous-espèces (souches) on observe une variabilité interindividuelle majeure. La composition du microbiote d'un individu est unique, on parle de code barre microbiotal. Cependant, du point de vue fonctionnel, il existe une relative homogénéité entre les personnes saines (Human Microbiome Project Consortium 2012). Les voies métaboliques communes impliquent le métabolisme, la fermentation, la méthanogenèse, la phosphorylation oxydative et la biosynthèse du lipopolysaccharide.

Avec l'âge, la composition du microbiote devient moins stable et moins diversifiée, ce qui coïncide avec les pathologies liées à l'âge ainsi qu'avec une baisse des capacités d'immunocompétence (Claesson *et al.* 2012).

2.3 Rôles physiologiques

Des millions d'années d'évolution ont conduit à une interdépendance entre l'hôte et son microbiote. Le microbiote intestinal joue ainsi un rôle majeur, reconnu de longue date dans deux fonctions majeures : l'immunité et le métabolisme.

Le microbiote est ainsi impliqué dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire (Shi and Mu 2017; Belkaid and Hand 2014; Sommer and Bäckhed 2013) et confère une protection envers les pathogènes non seulement localement mais également à distance (Chiu *et al.* 2017).

Article de revue : les microbiotes exercent des effets protecteurs sur l'hôte par des mécanismes variés, à l'échelle locale mais aussi à distance

A partir d'une revue de la littérature, nous avons montré que les différents microbiotes du corps humain exercent des effets immunomodulateurs protecteurs contre les infections *via* des mécanismes variés, non seulement à l'échelle locale mais également à l'échelle systémique et à distance, définissant ainsi le concept de « co-immunité ».

Le manuscrit de l'article est placé à la fin de la partie « étude bibliographique ».

Article de revue : co-immunité hôte-microbiote : une relation intime qui dépasse la fonction de défense

Dans cet article, nous avons montré que la co-immunité ne se limitait pas à la fonction de protection contre les infections, mais était impliquée dans les autres fonctions du système immunitaire que sont le développement et la réparation.

Le manuscrit de l'article est placé à la fin de la partie « étude bibliographique ».

Son rôle métabolique est bien connu : il est impliqué dans la régulation de la balance énergétique et dans l'équilibre glycémique (Vijay-Kumar *et al.* 2010; Vrieze *et al.* 2012) ; il représente une source d'énergie (environ 5 à 10% de la consommation énergétique) (Canfora, Jocken, and Blaak 2015) ; il permet la synthèse de vitamines, notamment de la vitamine K (Yatsunenko *et al.* 2012) ; il métabolise les sels biliaires (Devlin and Fischbach 2015).

Outre ces deux fonctions principales, le microbiote influence également la prolifération cellulaire (Ijssennagger *et al.* 2015) et la vascularisation (Reinhardt *et al.* 2012) ; il régule les fonctions endocrines (Neuman *et al.* 2015), la signalisation neuronale (Yano *et al.* 2015) et la densité osseuse (I. Cho et al. 2012); il permet la synthèse de neurotransmetteurs (Yano *et al.* 2015) et de multiples autres composés ; il réagit à certains médicaments et les modifie ; il élimine certaines toxines exogènes (Haiser *et al.* 2013). De multiples fonctions restent probablement à découvrir.

Etant donné la variété de ces fonctions, il n'est pas étonnant que le microbiote soit un sujet d'étude privilégié dans de nombreuses pathologies chroniques dont la physiopathologie complexe est mal comprise.

2.4 Méthodes d'étude, critique des biais

La plupart des espèces du microbiote intestinal étant difficiles ou impossibles à cultiver, la caractérisation génomique de la composition et de la fonction du microbiote, sous différentes conditions environnementales, a pris une place centrale dans la compréhension de ses rôles en santé et en pathologie. La première décennie de recherche s'est principalement focalisée sur le séquençage de l'ADN 16S et sur le séquençage de type shotgun, permettant de mieux comprendre la composition et la structure du génome microbiotal (microbiome). Les avancées dans le séquençage de l'ARN ont récemment permis de savoir quels gènes sont activement exprimés dans des communautés microbiennes complexes, permettant une évaluation des changements fonctionnels selon les contextes.

La conduite d'une étude dans le domaine du microbiote est complexe, car, comme pour toute étude, les méthodes expérimentales, les facteurs environnementaux et les méthodes d'analyse peuvent affecter les résultats. La standardisation de la collecte des données et de l'analyse est nécessaire mais n'est pas encore répandue, réduisant fortement les possibilités de méta-analyse.

Une difficulté importante de ce champ de recherche est l'arrivée continue de nouvelles méthodes d'analyse, qui ne doit pas remettre en cause les pratiques classiques indispensables pour l'obtention de résultats exploitables.

Toutes les méthodes d'étude du microbiote comportant des forces et des faiblesses, la question d'étude, les hypothèses, le type d'échantillon et les objectifs de l'analyse doivent orienter le choix de la méthode.

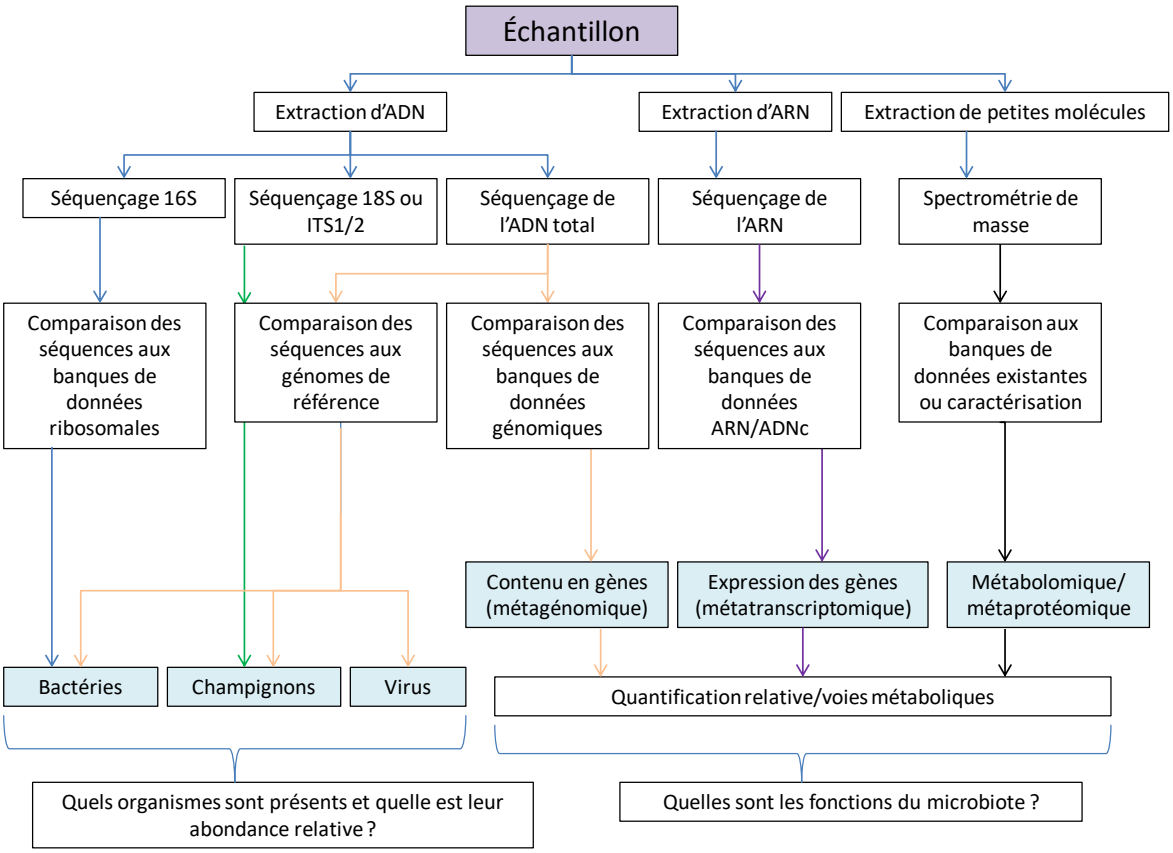


Figure 8 : Méthodes d'étude du microbiote humain

Les techniques de séquençage permettent de s'affranchir des classifications phénotypiques traditionnelles basées sur la prise de coloration de Gram, l'aspect (bacille ou coccus) etc.

Pour toutes les études, une stratification précise en fonction des facteurs confondants (âge, sexe, alimentation, style de vie) est indispensable. De même, le choix des réactifs, des amorces, des conditions de stockage, etc. doivent être réfléchis et consignés pour permettre une interprétation correcte des données, la variabilité technique étant forte entre les différentes méthodes expérimentales, de l'extraction au séquençage (Knight *et al.* 2018).

2.4.1 Séquençage de gènes d'intérêt

Le séquençage de gènes d'intérêt utilise des amorces qui ciblent une région particulière d'un gène d'intérêt afin de déterminer la composition microbienne d'un échantillon. Cette région doit contenir une région hypervariable qui peut permettre une identification précise, encadrée par des régions hautement conservées qui permettent aux amorces de PCR de se fixer.

En ce qui concerne l'étude du microbiote bactérien, le séquençage de l'ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ADN 16S) est le plus répandu car, hormis son coût actuellement inférieur aux

autres techniques, il présente plusieurs avantages. Il est en effet très conservé au sein des bactéries (sensibilité) ; le gène eucaryote homologue (18S) est distinct (spécificité particulièrement intéressante dans le cas d'échantillons complexes comme les échantillons biologiques) ; il existe des domaines propres permettant une signature des différents niveaux taxonomiques (jusqu'à la famille, le genre voire l'espèce) ; les banques de données sont très développées ; les résultats sont comparables à ceux obtenus à partir du séquençage du génome entier. L'ADN 16S est préféré à l'ADN 23S, 5S ou à d'autres gènes bactériens pour des raisons techniques liées à un compromis entre la taille du gène (1,5kb pour l'ADN 16S) et la quantité d'information disponible. Cependant, comme cette technique génère des fragments de petite taille, l'assignation taxonomique peut être relativement difficile.

L'étude du mycobiote peut utiliser les régions ITS1 ou ITS2 (internal transcribed spacers) ou l'ARNr 18S, sans qu'un gène d'intérêt ait montré sa supériorité.

Le type d'échantillon peut influer sur le succès de l'amplification des différentes régions d'intérêt (Knight *et al.* 2018).

Cette technique a plusieurs avantages : elle est rapide, simple et peu chère ; ses résultats sont similaires à ceux du contenu génomique total ; elle convient aux échantillons contenant peu de biomasse ou fortement contaminés ; les banques de données sont importantes ; elle permet une analyse semi-quantitative relative.
Cependant, elle ne permet pas la distinction entre bactéries vivantes et mortes ; elle est sensible aux biais liés à l'amplification ; le choix des amorces et des régions variables à amplifier majore les biais ; elle nécessite une connaissance *a priori* de la communauté microbienne (ce qui est le cas pour le microbiote humain) ; la résolution est rarement supérieure au genre en raison de la petite taille des fragments amplifiés ; elle nécessite des contrôles négatifs ; les informations fonctionnelles sont limitées ; il n'est pas possible de réaliser une quantification bactérienne précise, car les gènes codant l'ARNr peuvent exister en plusieurs copies, le nombre de copies variant en fonction de la taille du génome et de la vitesse de croissance de la bactérie.

En résumé, le séquençage de l'ADN 16S permet une vision globale de la composition de la communauté bactérienne, avec une résolution basse.

Pour quantifier, d'autres gènes sont utilisés, présents en même nombre de copies chez toutes les bactéries (une copie généralement). D'autres gènes sont utilisés pour différencier des espèces bactériennes proches, pour lesquelles l'ADN 16S n'est pas discriminant, par exemple MLSA pour *Neisseria meningitidis.*

La plupart des études cliniques sont basées sur le séquençage de l'ADN 16S qui, bien qu'économique, est limité en termes d'assignation taxonomique. Cependant, la méthode PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States), un algorithme qui utilise les séquences d'ARNr 16S pour prédire les fonctions bactériennes, permet une analyse métagénomique bactérienne *in silico* en identifiant des familles fonctionnelles de gènes à partir des banques de données disponibles (Langille *et al.* 2013).

2.4.2 Séquençage de l'ADN total ("shotgun métagénomique")

Par rapport au séquençage de l'ADN 16S, le séquençage de l'ADN total peut évaluer directement l'abondance relative des gènes fonctionnels ; l'assignation taxonomique est réalisable au rang de l'espèce ou de la souche si elles sont connues ; il est exempt des biais de la phase PCR d'amplification ; il permet l'estimation *in situ* de la croissance d'organismes cibles ; il permet l'assemblage de génomes bactériens.

Il est cependant cher ; la préparation de l'échantillon et l'analyse des données sont complexes ; la contamination par l'ADN de l'hôte et des organelles peut masquer les signatures microbiennes ; les virus et les plasmides ne sont pas correctement annotés sans pipelines d'analyse personnalisés ; il n'existe pas de distinction entre organismes vivants et morts.

Plusieurs études ont combiné les méthodes à haut débit de séquençage ADN avec les nouveaux catalogues de gènes disponibles, permettant une résolution fine au niveau des espèces et des souches ainsi qu'une annotation fonctionnelle des communautés microbiennes (Lynch and Pedersen 2016). De telles approches ont facilité l'utilisation d'algorithmes de type « machine-learning » dans le but d'identifier des gènes microbiens (ou des signatures taxonomiques) comme des biomarqueurs de maladies.

2.4.3 Analyse du métatranscriptome

Le séquençage de l'ARN présente plusieurs avantages : il peut permettre d'évaluer quels microorganismes dans une communauté présentent une activité transcriptionnelle lorsqu'il est couplé à un séquençage de gènes d'intérêt ; il permet de distinguer *per se* les microorganismes vivants actifs des microorganismes morts ou dormants ou de l'ADN extracellulaire ; il permet d'évaluer fonctionnellement les variations intra-individuelles (qui pourraient passer inaperçues en utilisant les techniques de séquençage d'ADN) ; il permet d'évaluer directement l'activité microbienne, y compris la réponse à une intervention ou à un événement.

Cependant, la préparation des échantillons et l'analyse sont très coûteuses et complexes ; les ARNm de l'hôte et les ARNr doivent être éliminés ; la collection des échantillons et leur conservation doivent être optimales (« snap-frozen ») ; les données sont biaisées en faveur des organismes présentant des taux de transcription élevés en l'absence de séquençage ADN concomitant.

2.4.4 Métaprotéomique, métabolomique

La métaprotéomique analyse l'expression protéique dans un échantillon, par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. Il est cependant impossible de distinguer les protéines dérivées de l'hôte des protéines dérivées du microbiote.

La métabolomique analyse la production de métabolites, par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à une spectrométrie de masse ou par spectroscopie à résonance magnétique. Cette technique est semi-quantitative et l'analyse peut être ciblée ou non ciblée. Comme pour la métaprotéomique, il est impossible de distinguer les métabolites issus de l'hôte ou de l'alimentation. La détection des métabolites est de plus dépendante de la plateforme d'analyse et des bases de données.

2.4.5 Diversité

Les données issues du séquençage sont représentées par des milliers de lignes correspondant aux différents taxons, avec beaucoup de valeurs nulles ; leur analyse requiert un traitement statistique adéquat comprenant notamment une correction pour tests multiples.

Les diversités α et bêta permettent une approche générale des données de séquençage.

L'α diversité correspond à la diversité au sein d'un échantillon (le nombre d'espèces) ; elle peut être comparée entre deux groupes. Cette donnée est purement quantitative ; deux compositions de microbiote très différentes peuvent se traduire par une α diversité égale. Les mesures de la richesse en espèce (par exemple l'index Chao1) sont sensibles au nombre de séquences par échantillons, alors que les mesures qui combinent richesse et l'uniformité (par exemple l'index de Shannon) le sont beaucoup moins. Ces méthodes n'ont été validées que pour l'analyse de l'ARNr 16S.

La bêta diversité compare la similitude entre chaque paire d'échantillons, et génère une distance matricielle entre ces paires. Les mesures quantitatives (Bray-Curtis, Canberra et UniFrac pondéré) prennent en compte l'abondance relative des taxa dans leurs calculs, alors que les mesures qualitatives (Jaccard binaire et UniFrac non pondéré) ne considèrent que la présence ou l'absence des taxa.

Afin de visualiser les données de beta diversité, des techniques d'ordination telles que l'analyse de coordonnées principales (PCoA) ou l'analyse en composant principal (PCA) sont couramment utilisées. Ces méthodes permettent de représenter graphiquement des distances matricielles complexes, en deux ou en trois dimensions. Les points correspondant à chaque échantillon peuvent ensuite être colorés en fonction des métadonnées afin de visualiser des regroupements de points (« clusters »).

2.4.6 Intégration des données « omics »

L'analyse de la composition de la communauté microbienne n'est plus un but de recherche suffisant. La fonction de cette communauté est cruciale. L'intégration des différents types de données (incluant le séquençage de gènes d'intérêt, la métagénomique, la métatranscriptomique, la métaprotéomique et la métabolomique) est nécessaire à une meilleure compréhension du fonctionnement biologique. Cette intégration des différents « omics » est appelée analyse multi-omique. Le champ de recherche est extrêmement vaste et le peu de méthodes proposées ne sont pas validées. De plus, chaque « omic » présentant individuellement un grand nombre de biais et étant confronté à un manque de standardisation, une analyse multi-omique efficace ne pourra être possible qu'après avoir résolu ces problèmes.

Par ailleurs, intégrer plusieurs types de données omiques est difficile. Par exemple, l'expression génique et la production de métabolites ne sont pas simultanées. De plus, les outils statistiques disponibles comme les coefficients de corrélation de Pearson et Spearman ne sont pas adaptés au traitement de données de grande échelle et leur utilisation peut créer de nombreux faux positifs (Knight *et al.* 2018). Le développement de méthodes d'analyse spécifiques est donc indispensable.

La correction pour tests multiples est cruciale lors des analyses multi-omiques. Les données contenant des milliers de microorganismes différents, des corrélations statistiquement significatives seulement liées au hasard sont attendues. Des corrections de la significativité pour comparaisons multiples doivent être appliquées ; elles comprennent, par exemple, la correction de Benjamini-Hochberg (« false discovery rate ») ou la correction de Bonferroni (« family-wise error »), plus *conservative*.

De plus, la découverte de simples corrélations parmi les données n'est que la première étape. La recherche de corrélation et de causalité entre les différents omics est la seconde étape.

Par exemple, l'identification d'un métabolite associé à un état pathologique particulier devrait conduire à rechercher l'origine de ce métabolite au sein du microbiote intestinal. La recherche de la production de ce métabolite par une mono ou co-culture de microorganismes isolés ou l'obtention de souris gnotobiotiques (à microbiote contrôlé) pourraient permettre d'identifier cette origine.

2.5 Microbiote et système immunitaire

Le microbiote intestinal est essentiel au développement et à la maturation du système immunitaire. Les MAMPs, incluant les PAMPs, sont reconnus par des récepteurs de l'immunité innée, comme les TLRs et les NLRs, un processus essentiel à l'homéostasie intestinale (Medzhitov 2007). Le maintien de cette homéostasie est sous le contrôle de deux partenaires : l'hôte et le microbiote. Le microbiote est contrôlé par les produits des cellules épithéliales et immunes, comme le mucus, les défensines, les Ig1 et RegIII gamma. L'immunité muqueuse est, quant à elle, contrôlée par le microbiote, certains microorganismes favorisant la croissance de sous-types de cellules T.

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense contre les pathogènes. Elle est non spécifique et n'induit pas de mémoire immunitaire. Les cellules immunitaires innées, comme les cellules dendritiques (CD) et les macrophages, mais aussi les cellules épithéliales intestinales et les myofibroblastes, ont la capacité de réagir au microbiote en reconnaissant les motifs structuraux conservés des microorganismes (MAMPs). Les CD font le lien entre immunité innée et acquise en présentant les antigènes et en activant les cellules T.

2.5.1 Fonction barrière de l'épithélium et peptides antimicrobiens

La première barrière physique que les microorganismes digestifs et le contenu luminal rencontrent est la couche de mucus qui recouvre l'épithélium intestinal, sécrété par les cellules caliciformes.

L'importance du mucus dans la prévention de l'invasion bactérienne est soulignée par les études sur les souris MUC2$^{-/-}$ qui développent une colite et présentent un risque accru de cancer colorectal. Dans ces souris, les bactéries digestives sont en contact direct avec l'épithélium intestinal.

L'épithélium intestinal forme la deuxième ligne de défense. Elle est maintenue par les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes qui forment le complexe de jonction apicale intercellulaire.

En plus de former une barrière physique contre l'invasion des microorganismes, l'épithélium digestif sécrète de nombreux agents bactéricides incluant les défensines. Certains agents sont produits de façon constitutive, mais d'autres sont induits par la reconnaissance des composants bactériens par les PRRs exprimés à la fois dans les compartiments extra et intracellulaires.

2.5.2 Récepteurs du système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense envers les pathogènes, permettant une réponse immédiate aux infections. Il est fortement conservé au cours de l'évolution. Chez les vertébrés, il amorce la réponse adaptative.

Le système immunitaire inné est confronté à deux défis principaux. Premièrement il est en contact constant avec une myriade de microorganismes. Deuxièmement, il doit précisément et rapidement faire la distinction entre le soi non-infectieux et les pathogènes.

Pour relever ces défis, il se base sur un nombre relativement restreint de PRRs (pattern-recognition receptors) qui reconnaissent des caractéristiques communes à plusieurs pathogènes, appelés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Les PAMPs sont critiques pour la survie des pathogènes et ne peuvent donc pas varier pour éviter la détection, c'est pourquoi ils ne varient que rarement au sein de groupes entiers de pathogènes (Janeway and Medzhitov 2002).

Les PRRs sont des récepteurs exprimés soit à la surface des cellules, soit dans les compartiments intracellulaires comme le cytosol et les endosomes. Ils peuvent également être sécrétés dans le milieu extra-cellulaire. Les PRRs sont classés selon leur fonction, leur localisation et leur spécificité de ligands. Deux classes principales de PRRs ont été décrites chez les mammifères : les récepteurs liés à la membrane, incluant les récepteurs toll-like (TLRs) et les récepteurs à la lectine de type C (CLRs), et les récepteurs cytoplasmiques, incluant les récepteurs NOD-like (nucleotide-binding oligomerization domain-like), les récepteurs RIG-I-like (RLRs), les récepteurs AIM2-like et plus récemment la synthase de la GMP-AMP cyclique (Corridoni *et al.* 2018).

Les PRRs agissent souvent en synergie, favorisant une amplification rapide de la réponse immunitaire. Les localisations variées des PRRs permettent la détection de pathogènes envahissant différents types de compartiments cellulaires. De multiples PRRs sont capables de reconnaître un seul microorganisme, qui peut présenter un large éventail de ligands antigéniques, permettant une réponse immunitaire robuste. Les PRRs reconnaissent également des ligands dérivés de l'hôte appelés DAMPs pour danger-associated molecular patterns (*Cf.* partie théorie Danger).

2.5.2.1 TLR

Les TLRs sont les PRRs les mieux caractérisés. Onze TLRs présentant une structure commune ont été jusqu'à présent identifiés chez l'être humain. Les TLRs sont impliqués dans la physiopathologie des MICI. TLR2 est essentiel à la fonction des jonctions serrées dans l'intestin. Le microbiote intestinal commensal module l'inflammation *via* TLR2. Le polysaccharide A (PSA) produit par le commensal *Bacteroides fragilis* agit *via* TLR2 sur les CPA pour moduler la balance Th1/Th2 (Q. Wang *et al.* 2006) et *via* les cellules dentritiques plasmacytoïdes pour induire la différenciation lymphocytaire T régulatrice (Dasgupta *et al.* 2014). La prise orale de PSA améliore la colite induite par le TNBS dans un modèle murin, en augmentant la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Mazmanian, Round, and Kasper 2008a).

2.5.2.2 NLR

La famille des protéines NLR regroupe des PRRs cytosoliques qui se lient à diverses structures microbiennes comme le peptidoglycane et la flagelline, ainsi qu'à des signaux Danger endogènes, pour déclencher l'activation de l'immunité innée.

Au niveau fonctionnel, la famille des NLR peut être divisée en sous-groupes liés à l'assemblage de l'inflammasome, l'autophagie, la présentation antigénique, la transduction du signal et l'activation de la transcription.

Le domaine NOD, qui a une activité ATPase, est requis pour l'auto-oligomérisation des NLRs qui suit la liaison au ligand. La grande diversité structurale des NLR permet une interaction avec une grande variété de ligands et l'activation d'un large panel de voies de signalisation. Cette variété de fonctions est illustrée par la grande variété des pathologies humaines qui sont associées à des polymorphismes des gènes codants pour les NLR (Zhong, Kinio, and Saleh 2013).

Deux membres de la famille des NLR, NOD1 et NOD2, jouent un rôle central dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée à plusieurs infections bactériennes. A la fois NOD1 et NOD2 se lient à différents motifs dérivés du peptidoglycane bactérien intracellulaire. NOD2 reconnait le muramyl dipeptide (MDP), présent chez toutes les bactéries Gram-négatives et Gram-positives.

L'association entre NOD2 et maladie de Crohn a été découverte en 2001, et reste un des facteurs de risque génétique majeur (Hugot *et al.* 2001).

NOD2 est exprimé dans les cellules du tractus digestif, plus spécifiquement dans les cellules de Paneth, les cellules épithéliales intestinales, les cellules souches et les cellules stromales. Il est également exprimé dans le compartiment hématopoïétique dans les cellules dérivées des monocytes incluant les cellules dendritiques et les macrophages.

Le mécanisme précis par lequel le MDP entre dans les cellules et active NOD2 demeure incertain. Il pourrait s'agir 1) d'une phagocytose de la bactérie suivie d'une dégradation en fragments incluant le MDP, 2) de la perte de peptidoglycane par des bactéries invasives 3) de la capture de fragments du peptidoglycane à partir de vésicules extracellulaires dérivées des bactéries 4) de l'endocytose et 5) du transport à travers les membranes de l'hôte par un système de sécrétion bactérien ou des canaux

(Corridoni *et al.* 2018). L'importance relative de ces mécanismes diffère probablement selon le type cellulaire. En résumé, ces mécanismes suggèrent que NOD2 est capable de percevoir les bactéries extracellulaires, ce qui va considérablement au-delà de son rôle classiquement décrit de perception des bactéries invasives intracellulaires. Cela est illustré par le fait que le MDP soluble est capable de stimuler NOD2 *in vitro* (Caruso *et al.* 2014). Il a par ailleurs été montré que NOD2 était capable de répondre aux PAMPs autres que le MDP, et en particulier aux ssRNA viraux (Sabbah *et al.* 2009).

Il existe des interactions entre les différents PRRs, permettant une régulation croisée de l'immunité innée et qui peuvent à la fois amplifier ou supprimer la réponse immunitaire. La synergie entre NOD2 et TLR2 est actuellement celle qui est le mieux caractérisée (Cao 2016). Outre une action pro-inflammatoire, NOD2 et TL2 collaborent dans leurs liens avec l'immunité adaptative, et coopèrent pour réguler la maturation fonctionnelle des cellules dendritiques (Ghorpade *et al.* 2011).

2.5.2.3 Les PRRs influencent la réponse adaptative

L'activation de l'immunité innée par les PRRs permet une détection immédiate de la présence et de la viabilité microbienne, ce qui est nécessaire pour permettre une activation des cellules T naïves et générer une réponse effectrice appropriée. L'activation des PRRs modifie significativement le phénotype des CPA, avec une expression majorée des molécules de co-stimulation et une sécrétion augmentée de cytokines pro-inflammatoires (Reis e Sousa 2006). De plus, les signaux dérivés des PRRs dans les CD déterminent si la machine de présentation antigénique va conduire à une activation ou à une tolérance croisée des cellules T, en fonction de l'exposition ou non des CD aux ligands des PRRs et de la durée de l'exposition. Cela contribue, en situation physiologique, à minimiser le risque de générer des réponses pro-inflammatoires aux antigènes du soi, à maximiser l'activation des cellules T envers les antigènes microbiens pendant la phase initiale de maturation des CD, à contrôler temporairement la présentation antigénique par le CMH I et II et à éviter une activation excessive lors d'un portage chronique de pathogène. La dérégulation de ces mécanismes pourrait donc être particulièrement impliquée dans la physiopathologie des MICI.

A contrario de la réponse immunitaire innée, la réponse adaptative est hautement spécifique et confère une mémoire immunitaire. Les cellules T sont les acteurs clés de la réponse adaptative. A l'état homéostatique, les composants de la réponse adaptative coopèrent entre elles et avec les cellules du système immunitaire inné pour permettre une réponse immunitaire adaptée, capable d'éliminer des pathogènes en causant le minimum de dégâts aux tissus.

2.5.3 Contrôle des populations de cellules T par le microbiote

Il est clairement établi que le microbiote intestinal peut influence l'équilibre Th17/Treg, comme attesté par les modèles germ-free ou les modèles murins traités par antibiotiques (A. Luo *et al.* 2017). Le tube digestif est un site majeur de régulation de l'équilibre Th17/Treg. Même si les mécanismes impliqués ne sont pas encore clairs, des composants et des métabolites dérivés de la communauté microbienne jouent probablement un rôle majeur. *Bacteroides fragilis* est ainsi capable d'induire la différenciation

Treg (Round and Mazmanian 2010), *via* son polysaccharide A (Telesford *et al.* 2015). Cet effet anti-inflammatoire est médié par une diminution de la production d'IL-17 et par la promotion de la différenciation des cellules T CD4+ vers des cellules productrices d'IL-10 et de Treg Foxp3^{+} (Round and Mazmanian 2010). Les métabolites produits par les microorganismes du microbiote, en particulier les acides gras à courte chaîne (SCFA), jouent un rôle critique dans les effets du microbiote sur l'induction des Treg dans l'intestin et le colon. Les niveaux de SCFA ont été corrélés au nombre de Treg, et le butyrate en particulier favorise la différenciation Treg à la fois *in vitro* et *in vivo* (Furusawa *et al.* 2013). Le butyrate produit par *Faecalibacterium prausnitzii* régule également l'équilibre Th17/Treg, par modifications épigénétiques (L. Zhou *et al.* 2018). De façon intéressante, ces effets ne sont pas confinés au tube digestif : le butyrate et le propionate influencent également la différenciation périphérique des Treg, cette induction étant liée à la promotion de la différenciation extrathymique des iTreg (Arpaia *et al.* 2013).

Il a été montré que les bactéries segmentées filamenteuses (SFB) étaient capables d'induire une réponse de type Th17 (Ivanov *et al.* 2009), par un mécanisme dépendant de la présentation des antigènes des SFB par le CMH II. Cette spécificité pourrait être liée à la capacité de cette bactérie de rentrer au contact direct des cellules épithéliales, au contraire des autres bactéries commensales. Des pathogènes ont également la capacité d'induire une réponse de type Th17, comme *Salmonella typhi* (McGeachy and McSorley 2012). Cette régulation de l'équilibre Th17/Treg par le microbiote est causée au moins en partie par des modifications épigénétiques (A. Luo *et al.* 2017).

De plus, une étude récente a montré qu'un microbiote normal pouvait induire une réponse Treg et inhiber la réponse Th1 *via* l'action de CPA exprimant le récepteur CX3CR1. Une pertubation du microbiote conduisait à une augmentation de la réponse Th1. Cet effet était corrigé par l'ajout de bactéries adhérant à l'épithélium, ce qui montre que l'interaction microbiote/épithélium peut également induire des mécanismes régulateurs (Kim et al. 2018).

Ces études montrent qu'un seul microorganisme peut influencer la physiologie de l'hôte par divers mécanismes, et soulignent la complexité des relations hôte/microbiote, dont la dysrégulation peut avoir des conséquences importantes dans la lutte contre les pathogènes ou dans les mécanismes auto-immuns et inflammatoires.

2.5.4 Microbiote et auto-immunité/auto-inflammation

Le microbiote intestinal est donc susceptible de modifier l'équilibre entre les populations de lymphocytes T régulateurs et Th17 circulants (ratio Th17/Treg). Une rupture de cet équilibre a été clairement associée au développement et à la progression de pathologies inflammatoires, non seulement du tractus digestif mais également à l'échelle systémique (A. Luo et al. 2017), et pourrait représenter le chaînon manquant entre modifications du microbiote intestinal et maladies inflammatoires rhumatismales (Xueyi *et al.* 2013).

Une étude récente a montré qu'une bactérie du tube digestif, *Enterococcus gallinarum*, était capable d'induire la production d'anticorps associés à l'auto-immunité dans un modèle murin de lupus, *via* sa translocation hépatique (Manfredo Vieira *et al.* 2018).

Le microbiote peut donc potentiellement intervenir dans une grande variété de mécanismes associés à l'auto-inflammation ou à l'auto-immunité et, dans le cadre de la théorie Danger, induire la persistance de signaux Danger.

2.6 Associations pathologiques

Des modifications de la compostion du microbiote intestinal ont été associées à une grande variété de pathologies, comprenant des maladies localisées du système digestif mais aussi des maladies neurologiques, respiratoires, métaboliques, hépatiques, cardiovasculaires etc.
De nombreuses revues de la littérature détaillent ces associations (Lynch and Pedersen 2016). Il faut noter que les liens de causalité entre les modifications du microbiote et le développement des pathologies sont actuellement très peu étayés. De nombreux facteurs de confusion existent et ne sont pas toujours contrôlés, en premier lieu l'alimentation. De plus, d'autres facteurs de confusion restent certainement à découvrir.

La plupart des études s'efforcent actuellement d'explorer de possibles liens de causalité et à identifier les mécanismes pathologiques impliqués, avec l'idée qu'une meilleure compréhension permettra le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives.

2.6.1 Composition du microbiote intestinal comme biomarqueur en pathologie

La diversité et la présence ou l'absence de taxons spécifiques pourraient être utilisés comme des biomarqueurs de pathologies ou de réponse au traitement (Bazin *et al.* 2018). Par exemple, la composition du microbiote intestinal a été proposée comme un facteur pronostic dans le cancer colorectal. En effet, dans les stades avancés, une augmentation d'*E. coli* productrice de cyclomoduline, de *Bacteroides fragilis* entérotoxinogène et de *Fusobacterium nucleatum* a été retrouvée. De plus, il a été suggéré que la toxicité des chimiothérapies pouvait dépendre de la composition du microbiote intestinal. En effet, les bêta-glucuronidases d'origine bactérienne modulent la toxicité digestive de l'irinotécan. Dans le cas des tumeurs digestives, une composition diverse est nécessaire à l'obtention d'une réponse optimale à l'oxaliplatine. En effet, le microbiote, en agissant en synergie avec le système immunitaire, module le microenvironnement oxydatif tumoral. Dans le mélanome, la composition du microbiote peut prédire la résistance à la colite induite par l'immunothérapie, et des espèces particulières de microbiote peuvent conditionner ou potentialiser les effets de la thérapie CTLA4 ou PD-L1 (Vétizou *et al.* 2015; Routy *et al.* 2018). Une autre étude récente chez des patients atteints de RCH traités par anti-TNF α a révélé des indices de dysbiose plus faibles et une plus grande abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* chez les répondeurs que chez les non-répondeurs au départ. De plus, les auteurs ont montré que les répondeurs et les non-répondeurs présentaient des profils d'expression distincts des peptides antimicrobiens de la muqueuse (Magnusson *et al.* 2016). De plus, une étude récente a montré que de faibles concentrations de *F. prausnitzii* sont corrélées à une récurrence précoce de la maladie de Crohn après l'interruption du traitement par anti-TNFα (Rajca *et al.* 2014). *F.*

prausnitzii est également associé dans la MC à un risque augmenté de récidive post-opératoire après résection iléo-caecale (Harry Sokol *et al.* 2008). Une méta-analyse récente a identifié l'ordre des *Clostridiales* comme étant prédictif de la réponse à l'infliximab (Y. Zhou *et al.* 2018). De plus, une étude récente a suggéré que la composition du microbiote intestinal pourrait prédire la réponse clinique à l'ustékinumab chez des patients atteints de MC. Dans cette étude, la diversité était plus importante avant traitement chez les futurs répondeurs, et augmentait avec le traitement chez les répondeurs mais pas chez les non répondeurs (Doherty *et al.* 2018), Dans le domaine de la rhumatologie, des études ont montré que les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde présentent des compositions de microbiote intestinal modifiées, qui sont partiellement normalisées après un traitement par DMARDs et qui pourraient prédire la réponse au traitement (Phillips 2015).

2.6.2 Microbiote et MICI

De plus en plus d'arguments dérivés de la génétique, des observations microbiologiques et immunologiques suggèrent fortement que le microbiote intestinal joue un rôle central dans la physiopathologie des MICI. Cliniquement, les rechutes de MC après chirurgie surviennent durant l'exposition post-opératoire de la muqueuse au contenu luminal (D'Haens *et al.* 1998). Microbiologiquement on retrouve des modifications à la fois quantitatives et qualitatives de la composition du microbiote intestinal dans les MICI (H Sokol *et al.* 2009; Duboc *et al.* 2013). Ces modifications, particulièrement étudiées dans la MC, sont caractérisées par une perte de la diversité et un déficit en certaines espèces du phylum des Firmicutes, en particulier *Faecalibacterium prausnitzii* de la famille des *Clostridiaceae*, qui possède des propriétés anti-inflammatoires, et une augmentation du phylum des Bacteroidetes et des Proteobacteria, en particulier de la famille des *Enterobacteriaceae*, dont *Escherichia coli,* y compris *E. coli* adhérente invasive, qui possède une action pro-inflammatoire (Nguyen *et al.* 2014). L'action anti-inflammatoire de *F. prausnitzii* est médiée par le butyrate qu'il produit, qui maintient l'équilibre Th17/Treg par un mécanisme épigénétique (L. Zhou *et al.* 2018). Une méta-analyse récente combinant des populations occidentales et chinoises a retrouvé une corrélation entre une augmentation de l'abondance relative des phyla des Actinobacteria et Proteobacteria, une diminution de l'abondance du phylum des Firmicutes et la sévérité des MICI (Y. Zhou *et al.* 2018). De plus, outre la dysbiose bactérienne, une étude récente a montré qu'il existait chez des patients atteints de MC une dysbiose fungique caractérisée par des altérations en termes de biodiversité et de composition, suggérant un rôle du microbiote fungique dans la physiopathologie de la MC (Harry Sokol *et al.* 2016).
Les données concernant la RCH sont parcellaires et ont été obtenues à partir de cohortes plus réduites. Une étude en PCR quantitative a retrouvé une plus faible abondance de *Roseburia hominis* et de *Faecalibacterium prausnitzii* chez des patients atteints de RCH comparés à des sujets contrôles (Machiels *et al.* 2014).

En résumé, le microbiote intestinal pourrait apporter des biomarqueurs universels pour le diagnostic, l'évaluation de l'activité de la maladie et la prédiction de la réponse aux traitements dans les MICI.

Il doit être noté que le terrain génétique associé aux MICI pourrait modifier par lui-même la composition du microbiote intestinal. Les SNPs (single-nucleotide polymorphisms) retrouvés chez les patients atteints de MICI sont associés à un enrichissement en taxons bactériens particuliers. Chez la

souris, la déficience en NOD2 induit une composition particulière du microbiote digestif ; la transplantation de ce microbiote chez des souris sauvages induit une colite, ce qui a donné naissance à la notion de « microbiote colitogène » (Couturier-Maillard *et al.* 2013). Cependant, des facteurs non génétiques comme l'usage d'antibiotiques, d'immunomodulateurs ainsi que le site des biopsies intestinales, semblent exercer un effet plus important sur la composition du microbiote, soulignant la nécessité de contrôler ces variables (Knights *et al.* 2014).

La perte de la régulation de l'immunité innée intestinale conduisant à une réponse immunitaire aberrante est impliquée dans la physiopathologie des MICI. Le rôle précis des PRRs dans l'inflammation digestive n'est pas bien compris, mais en considérant leur rôle de senseurs bactériens et leur association génétique avec les MICI, ils contribuent probablement à la réponse immunitaire dysrégulée au microbiote intestinal (Corridoni *et al.* 2018).

Malgré le fait que certains modèles animaux suggèrent la possibilité d'une dysbiose précédant l'inflammation chronique, en faveur donc d'un rôle causal (Keubler *et al.* 2015), la preuve de ce concept reste à être apportée chez l'humain.

Une question primordiale est de savoir si les modifications du microbiote intestinal dans les MICI est un phénomène primaire ou secondaire. Le terrain génétique, mais aussi d'innombrables facteurs extérieurs ainsi que l'inflammation elle-même peuvent modifier la composition du microbiote ; de plus, les études longitudinales de populations permettant d'identifier des stades pré-cliniques de MICI et de les associer à une composition particulière de microbiote manquent. Une autre question encore plus fondamentale est de savoir si les modifications de composition sont suffisantes pour induire une MICI, ou si ces modifications ne deviennent délétères qu'en cas de terrain génétique et environnemental particulier.

2.6.3 Microbiote et SpA

Dans la physiopathologie de la SpA, l'implication du microbiote intestinal, qui joue un rôle majeur dans l'éducation du système immunitaire, est fortement suggérée par plusieurs études chez les animaux. Des rats transgéniques pour HLA-B27 développent un large spectre de symptômes auto-immuns comme une arthrite périphérique et axiale, et une colite. Lorsque ces mêmes rats sont élevés dans un environnement stérile (animaux axéniques), ils ne développent ni arthrite ni colite (Taurog *et al.* 1994). Fait intéressant, un phénotype inflammatoire est restauré par la réintroduction des bactéries commensales dans l'alimentation de ces animaux axéniques, en particulier avec un cocktail contenant des *Bacteroides* et *Lactobacillus* (Rath *et al.* 1996).

Seules quelques études ont exploré le microbiote intestinal dans la SA. Une prévalence plus grande de bactéries réduisant les sulfates a été retrouvée dans les selles de patients présentant une SA (Stebbings *et al.* 2002). Une étude récente a montré que le microbiote de l'iléon terminal chez les patients atteints de SA différait significativement de celui des sujets sains, avec une augmentation de cinq familles bactériennes (*Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Rikenellaceae, Porphyromonadaceae* et *Bacteroidaceae*) et une diminution de deux familles (*Veillonellaceae* et *Prevotellaceae*) (M.-E. Costello *et al.* 2014).

Cinq études de séquençage ADN de nouvelle génération (NGS) ont comparé le microbiote intestinal de patients atteints de SpA à celui de témoins sains. Stoll *et al.* ont examiné le microbiote intestinal de 25 patients pédiatriques atteints d'arthrite enthésitique et de 13 témoins sains (Stoll *et al.et al.* 2014). Ils ont montré que ces patients présentaient une réduction significative de *Faecalibacterium prausnitzii*, comme observé dans la maladie de Crohn. Costello *et al.* ont étudié les biopsies iléales terminales obtenues par coloscopie chez neuf patients atteints de SA et neuf témoins. Ils ont observé une augmentation des *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, *Prophyromonadaceae* et *Bacteroidaceae* et une diminution des *Ruminococcaceae* et des *Rikenellaceae* chez les patients comparativement aux sujets témoins sains (M.-E. Costello *et al.* 2014). Toujours dans la SA, Wen *et al.* ont réalisé une étude métagénomique quantitative sur 97 patients atteints de SA et 114 témoins en bonne santé. Ils ont constaté chez les patients atteints de SA une augmentation de l'abondance de *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella copri* et *Prevotella* sp. C561 et du genre *Bifidobacterium*, et une diminution de *Bacteroides* spp. (C. Wen *et al.* 2017).

Concernant la SpA, Tito *et al.* ont étudié la composition bactérienne à partir de biopsies iléales et coliques de 27 patients atteints (Tito *et al.* 2016). Ils ont mis en évidence différents profils microbiens associés à l'inflammation tissulaire et observé une corrélation positive entre l'abondance de *Dialister* sp. et le score d'activité de la spondylarthrite ankylosante (ASDAS). Plus récemment, Breban *et al.* ont comparé la composition du microbiote de 87 patients atteints de SpA à celle de 69 contrôles. La diversité microbienne était plus faible chez les patients atteints de SpA, avec une augmentation marquée de *Ruminococcus gnavus* (Breban *et al.* 2017).

Contrairement aux MICI, ces études limitées ne dégagent pas de consensus quant à une signature microbiotale associée aux SpA. Le rôle du HLA-B27 est probablement confondant car il influe sur la composition du microbiote intestinal (Brewerton *et al.* 1973; Asquith *et al.* 2016), et ce rôle devra être précisé dans le futur. On pourrait imaginer que le HLA-B27 formate un microbiote digestif favorable à l'émergence d'une SpA, la pathologie résultant d'une modification secondaire de ce microbiote par l'introduction d'un pathogène, par exemple, comme observé au cours des arthrites réactionnelles.

2.7 Difficultés de l'étude du microbiote

L'étude taxonomique donne finalement peu de résultats concordants, mais ces résultats pourraient permettre l'élaboration de traitements innovants ; l'analyse fonctionnelle permettra sans doute une meilleure compréhension des mécanismes impliqués (Heintz-Buschart and Wilmes 2017).

Bien que de nombreuses perspectives aient été ouvertes par le corpus d'études sur le sujet, l'étude du microbiote intestinal en santé humaine est confrontée à plusieurs défis.

Ceux-ci incluent une variabilité intra-individuelle majeure en fonction du style de vie, des problèmes de reproductibilité, de la faiblesse statistique de certaines études. De plus, certaines études incluent des cas et des témoins hétérogènes en termes de phénotype, d'étiologie et d'écologie microbienne. Ces problèmes sont aggravés par un manque de stratification sur les traitements, ce qui crée des facteurs de confusion, et sur un manque d'études longitudinales et interventionnelles robustes

statistiquement impliquant des participants présentant des pathologies ou des états pré-cliniques rigoureusement définis dans le but de mettre en évidence des liens de causalité.

Par ailleurs, la plupart des études sont basées sur l'analyse d'échantillons de selles, qui ne sont pas représentatives de la diversité de compositions rencontrées dans l'ensemble du tube digestif (Hong *et al.* 2011).

De plus, les banques de données génétiques étant incomplètes, la majorité des gènes identifiés ne peuvent être assignés fonctionnellement. Ce problème est exacerbé par notre manque de connaissance de la dynamique transcriptionnelle du microbiote et des effets biologiques de ses innombrables compositions.

Enfin, la plupart des études s'intéressent principalement aux bactéries plutôt qu'aux relations croisées entre les différents membres du microbiote.

Il existe peu de démonstrations de la causalité entre des anomalies de composition du microbiote intestinal et une pathologie. Ces rares études combinent l'observation d'une association clinique entre un microbiote particulier et un état pathologique et des études mécanistiques ou interventionnelles. Un lien de causalité est ainsi fortement suggéré dans l'obésité humaine (Ridaura *et al.* 2013), le syndrome de kwashiorkor (S. Subramanian et al. 2014), l'asthme pédiatrique (Fujimura *et al.* 2016), la perte de poids après chirurgie bariatrique (Tremaroli *et al.* 2015) et la résistance à l'insuline pendant le troisième trimestre de grossesse (Koren *et al.* 2012). La transplantation fécale à partir de donneurs sains à des patients obèses est de plus associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les receveurs (Vrieze *et al.* 2012).

Une hypothèse consensuelle physiopathologique (Lynch and Pedersen 2016) pourrait être la suivante : 1) des facteurs endogènes ou exogènes, ou une combinaison de facteurs, pourraient déclencher une inflammation muqueuse ou une augmentation de la perméabilité intestinale (« leaky gut ») soit directement soit *via* une pression sélective exercée sur le microbiote digestif, 2) chez des individus génétiquement prédisposés, ces anomalies infra-cliniques pourraient favoriser une modification de la composition ou des propriétés du microbiote intestinal, 3) ces modifications pourraient elles-mêmes entraîner des conséquences pathologiques.

Si cette hypothèse est vérifiée, une fois que le microbiote associé à la maladie est établi, il peut être transféré à un receveur génétiquement susceptible (par exemple un modèle murin), causant ainsi la maladie, ce qui reproduirait un des classiques critères de Koch pour démontrer la causalité d'un agent infectieux dans le déclenchement d'une maladie.

3 Traitements

3.1 MICI

La compréhension de la physiopathologie des MICI étant actuellement très incomplète, les traitements disponibles sont loin d'être optimaux (de Souza and Fiocchi 2016). Cependant, la découverte des médiateurs cellulaires et moléculaires de l'inflammation a permis le développement de nouveaux traitements à l'efficacité remarquable.

Le traitement médical des MICI, non curatif, est actuellement articulé autour de deux axes (Van Assche *et al.* 2010):

- un traitement des poussées qui suit en général une stratégie de riposte graduée (« step-up ») en fonction de la sévérité des signes cliniques, biologiques et des lésions endoscopiques
- un traitement d'entretien destiné à maintenir une rémission si possible profonde, durable et sans corticoïdes. L'obtention d'une rémission non seulement des signes cliniques mais aussi des signes biologiques inflammatoires et des lésions endoscopiques est de meilleur pronostic (et donc un objectif du traitement).

Les traitements actuellement disponibles sont les dérivés aminosalycilés, les corticoïdes (topiques et généraux), les immunosuppresseurs (analogues des purines, méthotrexate, ciclosporine) et les biothérapies, représentées par les anti-TNFα et le védolizumab (anticorps monoclonal anti-intégrine α-4-bêta-7). Des traitements nutritionnels comme la nutrition entérale exclusive sont utilisés en pédiatrie et les antibiotiques sont indiqués dans des situations cliniques particulières.

Les interventions chirurgicales sont indiquées en cas de complication mécanique de la maladie (perforation, sténose ou fistule symptomatique).

Actuellement les traitements actifs dans la MC agissent tous sur la cascade inflammatoire à différents niveaux. L'approche la plus efficace pour maintenir la rémission serait de prévenir les épisodes de poussée en modifiant et en traitant des déclencheurs potentiels.

3.2 SpA

Le traitement des SpA a été longtemps limité aux AINS et à la kinésithérapie, avec une utilisation limitée des corticoïdes en raison des fortes doses souvent nécessaires pour contrôler les douleurs axiales, et des molécules conventionnelles modifiant la maladie (cDMARDs, conventional disease-modifying antirheumatic drugs) comme la sulfasalazine, le méthotrexate, en raison de leur inefficacité sur les manifestations axiales de la maladie.

Les anti-TNFα, déjà utilisés dans la polyarthrite rhumatoïde, ont démontré leur efficacité dans les SpA et ont révolutionné leur prise en charge. D'autres biothérapies modifiant la maladie (bDMARDs, biological disease-modifying antirheumatic drugs) efficaces dans la polyarthrite rhumatoïde, comme

les anti-IL-6 et les agents modulateurs des cellules T, ne sont cependant pas efficaces dans les SpA. La découverte de l'importance de l'axe IL17/23 dans ces maladies a permis le développement d'antagonistes spécifiques de l'IL17 avec une très bonne efficacité clinique. Le seul anti-IL12/23 disponible, l'ustékinumab, est efficace dans l'arthrite psoriasique et indiqué seulement dans cette situation.

Les bDMARDs sont indiqués d'emblée en cas de SpA sévère, ou après échec des autres lignes thérapeutiques, même si leur recours devient de plus en plus fréquent en deuxième ligne en cas d'échec des AINS. Actuellement, le choix entre les anti-TNFα et les anti-IL17 n'est pas guidé par des facteurs prédictifs de réponse ou de non réponse à ces molécules ; il est en pratique laissé à l'appréciation du clinicien (Vollenhoven n.d.).

3.3 Anti-TNFα

Les biothérapies ont révolutionné la prise en charge des MICI dans les années 2000, changeant drastiquement l'évolution de ces pathologies tout en présentant un excellent profil de sécurité (Sedger and McDermott 2014). La première biothérapie autorisée a été l'anti-TNFα infliximab. Il existe de plus en plus d'arguments en faveur d'un traitement précoce plus agressif des MICI (« top-down) dans le but de limiter les complications. En effet, les anti-TNFα permettent de modifier l'histoire naturelle de la maladie, ce que ne permettent pas les traitements conventionnels. Par exemple, les anti-TNFα induisent une cicatrisation muqueuse, qui est associée à une rémission prolongée. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de recommandations préconisant l'approche top-down en raison du manque de données portant sur des cohortes de grande envergure (Nuij *et al.* 2015). De plus il a été montré qu'après une résection iléo-colique, si l'infliximab diminue la récidive endoscopique, il ne diminue pas la récidive clinique (Regueiro *et al.* 2016).

Les différentes molécules anti-TNFα approuvées dans les MICI en France sont l'infliximab, l'adalimumab et le golimumab. L'inflixamab, l'etanercept, l'adalimumab et le golimumab sont utilisés dans les SpA.

3.3.1.1 TNF α

3.3.1.1.1 Action sur les cellules immunitaires classiques

Le mécanisme d'action des anti-TNFα demeure imparfaitement compris. L'hypothèse la plus consensuelle est que, par leur action sur les cellules immunitaires de l'hôte, ils freinent la cascade inflammatoire menant aux symptômes cliniques (Byng-Maddick and Ehrenstein 2015).

Le TNFα a été isolé en 1975 par Carswel *et al.*, qui avaient observé une nécrose tumorale en réponse à un facteur soluble libéré par les cellules de l'hôte (Carswell *et al.* 1975). Le TNFα est impliqué dans les phases aiguës et chroniques de l'inflammation. Le TNFα est initialement synthétisé sous la forme d'une protéine transmembranaire de 26kDa. Son clivage par la metalloprotéinase TNFα converting

enzyme crée la forme soluble de 17kDa. Le TNFα est produit par plusieurs types cellulaires, mais principalement par les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T (Slevin and Egan 2015).

Le TNFα existe donc sous deux formes : une forme soluble et une forme membranaire. Ces deux formes sont actives mais présentent des affinités différentes pour les récepteurs membranaires au TNF (TNFR-1 et TNFR-2). Il existe également des récepteurs solubles, ou circulants, qui ont un rôle de leurre (*decoy)*, entrant en compétition avec les récepteurs membranaires et réduisant ainsi l'activité biologique du TNFα.

Bien qu'agissant comme un ligand, le TNFα membranaire pourrait également exercer des fonctions de récepteur, par un mécanisme de type « reverse-signaling », encore peu étudié. Il faut noter que les anti-TNFα se lient au TNFα membranaire, ce qui pourrait, par ce mécanisme de « reverse-signaling », étendre les actions des anti-TNFα au-delà de la simple neutralisation du TNFα soluble (Slevin and Egan 2015).

La forme soluble et la forme membranaire s'agrègent en homotrimères et exercent leurs fonctions à travers les deux types de récepteurs, qui sont exprimés de façon différentielle dans plusieurs types cellulaires dans les tissus sains et pathologiques. Une fois activés, ils produisent des effets distincts grâce à des voies de transduction indépendantes.

TNFR1 est exprimé de façon ubiquitaire sur les cellules lymphoïdes et sur de nombreuses autres cellules non immunitaires. L'activation du TNFR1 entraîne l'activation d'un signal de transduction intracellulaire qui exerce des effets critiques sur la physiologie et la survie cellulaires. L'activation du facteur nucléaire NFkB, proinflammatoire et antiapoptotique, est nécessaire aux effets biologiques du TNFα. Les hétérodimères de NFkB sont libérés après stimulation du TNFR1, migrent vers le noyau cellulaire et stimulent l'expression de gènes, dont beaucoup favorisent l'immunité innée tel que ceux codants pour l'IL-8, l'IL-1, l'IL-6, COX2 et le TNFα. D'autres, tels que Bcl-XL et c-IAP2, favorisent la survie cellulaire en inhibant l'apoptose. Le TNFα peut cependant induire l'apoptose *via* l'activation du TNFR1 conduisant à l'activation de la caspase-8, mais lorsque le NFkB est activé, les effets anti-apoptotiques deviennent majoritaires (Lawrence 2009).

On retrouve le TNFR2 principalement à la surface des cellules immunitaires, nerveuses et endothéliales. Contrairement au TNFR1, le TNFR2 ne peut être activé que par le TNFα membranaire. Il module la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et l'IL-6, et stimule la migration des leucocytes par augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales.

La fixation du TNFα sur ses récepteurs membranaires peut aboutir à au moins trois évènements : activation de la voie NF-κB (inhibition de l'apoptose) (Challa and Chan 2010) ; induction de l'apoptose ; induction d'une nécrose programmée. Les effets de cette cytokine peuvent donc être à la fois pro-inflammatoires et immuno-régulateurs.

3.3.1.1.2 Action sur les cellules épithéliales

En plus de ses effets sur les cellules immunitaires, le TNFα exerce également des effets sur les cellules de l'épithélium intestinal. En effet, l'activation du TNFR1 augmente la sécrétion de mucus par les

cellules caliciformes, et l'activation du TNFR2 majore l'expression et la synthèse de la mucine (Xue *et al.* 2014). Etant donné le rôle majeur du mucus dans la protection contre les microorganismes luminaux, ce mécanisme pourrait jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie hôte/microbiote.

3.3.1.2 Anti-TNF α

3.3.1.2.1 structure

Les structures des différentes molécules anti-TNFα utilisées dans les MICI et dans les SpA sont décrites dans la figure 9.

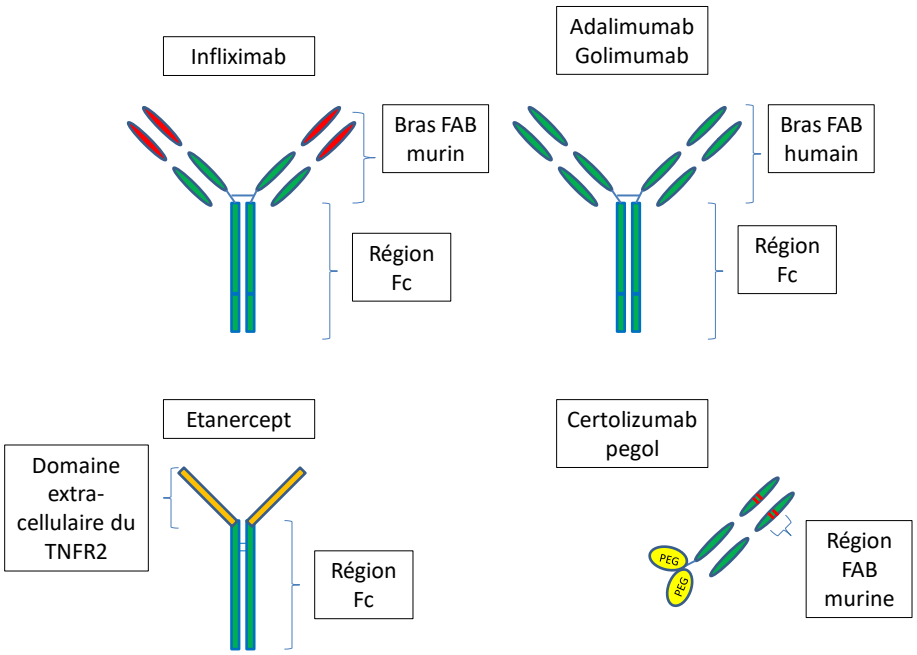


Figure 9 : Structure des molécules anti-TNFα utilisées dans le traitement des MICI et des SpA.
L'infliximab est un anticorps monoclonal chimérique humain-souris d'isotype IgG1. L'adalimumab et le golimumab sont des anticorps monoclonaux complètement humanisés IgG1. L'étanercept est une protéine de fusion du domaine extracellulaire du TNFR2 et de la région Fc de l'IgG1. Le certolizumab pegol est un fragment Fab d'anticorps monoclonal humanisé pégylé (Horiuchi *et al.* 2010).

Seul l'étanercept n'est pas un anticorps monoclonal mais une protéine de fusion. L'infliximab, l'adalimumab et le golimumab sont des anticorps monoclonaux entiers alors que le certolizumab pegol est un fragment d'anticorps monoclonal associé au polyéthylène glycol.

Toutes ces molécules se lient au TNFα soluble et membranaire. Seuls l'infliximab, l'adalimumab et le golimumab possèdent un fragment Fc.

3.3.1.2.2 Mécanisme d'action

Les anti-TNFα sont des inhibiteurs puissants du TNFα, mais leur action dépasse la simple neutralisation de cette cytokine. Les effets cliniques des biothérapies anti-TNFα semblent en effet plutôt liées à l'action sur le TNFα membranaire (tmTNFα), décrits dans (Horiuchi *et al.* 2010), et impliquent des interactions complexes avec d'autres molécules et cellules.

Les différences d'efficacité des différentes molécules s'expliquent en partie par leurs différences en termes de liaison au tmTNFα.

3.3.1.2.2.1 Effets cellulaires et moléculaires des anti-TNF α via la TNF α transmembranaire

Il existe de plus de nombreux arguments *in vitro* et *in vivo* qui montrent que la liaison au TNFα membranaire des monocytes, macrophages et lymphocytes entraîne la production de cytokines et également leur destruction par apoptose ou nécrose.

Il existe au moins trois mécanismes induits par la liaison des anticorps anti-TNFα au TNFα membranaire.

3.3.1.2.2.1.1 Cytotoxicité dépendant des anticorps (ADCC)

La liaison du fragment Fc de l'infliximab, adalimumab et golimumab aux récepteurs Fc à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales entraîne la dégranulation, le relargage de cytokines, la phagocytose et l'ADCC. Le certolizumab pegol ne comportant pas de fragment Fc ne produit pas d'ADCC (Slevin and Egan 2015).

3.3.1.2.2.1.2 Cytotoxicité dépendant du complément (CDC)

La CDC peut se produire par la voie classique *via* la liaison du C1q au domaine CH2 de la région Fc des anticorps. Cela initie la cascade du complément et entraîne la formation de complexes d'attaque membranaire, de pores et finalement la lyse cellulaire. Le certolizumab pegol n'induit donc pas non plus de CDC.

3.3.1.2.2.1.3 Reverse signaling

Le reverse signaling est l'ensemble des effets intracellulaires induits par la fixation d'anticorps anti-TNFα au TNFα membranaire. Cette fixation entraîne la phosphorylation de résidus sérine sur la queue cytoplasmique du TNFα membranaire. Les effets du reverse signaling sont l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires (Nesbitt *et al.* 2007) et l'induction de l'apoptose. Il a ainsi été montré que l'infliximab induisait l'apoptose des monocytes et des lymphocytes T de la lamina propria de patients atteints de MC en se liant au TNFα membranaire ; cet effet n'était pas retrouvé avec l'étanercept (Van den Brande *et al.* 2003; ten Hove *et al.* 2002). L'adalimumab exerce également une action pro-apoptotique sur les monocytes, contrairement à l'étanercept (Shen *et al.* 2005). Ces résultats ont cependant été remis en question, suggérant une action *in vivo* difficile à extrapoler à partir des résultats obtenus *in vitro* (Slevin and Egan 2015).

3.3.1.2.3 Observations chez les patients atteints de MICI

Quelques études ont évalué les différences de réponse cellulaire et moléculaire aux anti-TNFα entre les répondeurs et les non-répondeurs. A l'échelle moléculaire, il est clair que les anti-TNFα inhibent la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires et stimulent la production de médiateurs anti-inflammatoires ou immunorégulateurs (Slevin and Egan 2015). Cela illustre les conséquences d'aval importantes malgré la haute spécificité des anti-TNFα.

3.3.1.2.4 Problème de non-réponse

Il existe cependant des patients qui ne répondent pas cliniquement à ces molécules, sans qu'aucune prédiction de la réponse ou de la non-réponse ne soit possible avant le début du traitement.

Ainsi, dans les MICI, une résistance primaire à un traitement anti-TNFα est observée chez 10 à 40 % des malades, et près de 40 % des patients ayant obtenu une réponse initiale perdent la réponse au cours de la première année de traitement (Allez *et al.* 2010). Des facteurs cliniques comme l'absence d'inflammation active ou la présence de complications comme des sténoses ou des fistules explique certains cas de non-réponse primaire, mais la majorité reste imprévisible. Dans les SpA, la non-réponse aux anti-TNFα est moins bien documentée ; la réponse n'était que de 31% (critère ASAS 40) dans une cohorte nationale (Moltó *et al.* 2014), et de 50% au maximum à partir de la banque de données Cochrane dans les SA (Maxwell *et al.* 2015).

Même si des facteurs liés à la pharmacocinétique expliquent certains des cas de réponse partielle ou incomplète, il existe des résistances au mécanisme d'action lui-même, imposant une meilleure connaissance des effets biologiques de ces molécules (Slevin and Egan 2015).

3.3.1.3 TNF α et microbiote

Des souris double knock-out pour le TNFα présentent une réduction de la diversité α et bêta de leur microbiote intestinal, et une inflammation réduite en réponse à une colite induite par le TNBS, si on les compare aux souris sauvages (Jones-Hall, Kozik, and Nakatsu 2015).

Les anti-TNFα pourraient modifier la composition du microbiote intestinal par des effets directs ou indirects. Ces traitements permettant une cicatrisation muqueuse et diminuant fortement l'inflammation muqueuse, les fonctions de contrôle et de tolérance de la muqueuse digestive envers le microbiote pourraient de ce fait être restaurées, changeant ainsi indirectement la composition du microbiote intestinal (Baert *et al.* 1999).

Plus précisément, l'étanercept exerçant une action spécifique sur l'hôte avec une action non seulement sur le TNFα mais également sur le TNF-bêta, il pourrait diminuer la sécrétion de IgA au niveau de la lamina propria et ainsi moduler la composition du microbiote intestinal d'une manière différente des autres molécules anti-TNFα (Kruglov *et al.* 2013).

Une action directe sur les bactéries du microbiote intestinal est également probable et sera traitée dans le prochain chapitre.

Une étude dans la MC a montré des changements de composition du microbiote après traitement par un anti-TNFα (l'adalimumab), avec une augmentation de nœuds taxonomiques (Firmicutes, Bacteroides et Actinobacteria) et une diminution des *E. coli* après traitement (Busquets *et al.* 2015). Dans la RCH, la réponse clinique à trois mois était corrélée dans une étude récente à une concentration supérieure en *Faecalibacterium prausnitzii* avant l'instauration du traitement. De plus, dans cette même étude, l'abondance en *F. prausnitzii* augmentait pendant le traitement chez les répondeurs (Magnusson *et al.* 2016). Dans une étude pédiatrique, le traitement de MICI par anti-TNFα augmentait à 6 semaines la diversité chez les répondeurs ; de plus, les patients répondeurs présentaient avant l'instauration du traitement une plus grande abondance en bactéries des genres *Bifidobacterium*, *Clostridium colinum*, *Eubacterium rectale*, Clostridiales incultivables et *Vibrio*, ainsi qu'une plus faible abondance en *Streptococcus mitis* (Kolho *et al.* 2015).

3.3.1.4 Autres molécules

Le problème de réponse partielle aux anti-TNFα a conduit au développement de molécules ciblant d'autres voies inflammatoires, incluant celles des systèmes immunitaires innés et adaptatifs (Holleran *et al.* 2017).

En 2014 une nouvelle biothérapie agissant sur une voie très différente de celle du blocage du TNFα a obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour la MC et la RCH en échec de deux lignes d'anti-TNFα. Cette molécule, le védolizumab, est un anticorps monoclonal anti-intégrine α-4-bêta-7 qui empêche spécifiquement les lymphocytes de gagner le système digestif. D'autres anti-intégrines sont en développement. Par ailleurs, depuis fin 2016, une nouvelle classe de biothérapie, l'ustekinumab (anti-IL-12/IL-23), déjà utilisée dans le psoriasis et le rhumatisme psoriasique, fait l'objet d'une

recommandation temporaire d'utilisation dans la maladie de Crohn en échec des anti-TNFα. Il s'agit d'un anticorps monoclonal visant à inhiber la sous-unité p40 commune aux interleukines 12 et 23. Il semble aussi que le blocage sélectif de l'IL-23 (risankizumab) soit efficace dans la maladie de Crohn. De petites molécules (orales) sont également en cours de développement avec des résultats très prometteurs. Les trois principales familles probablement prochainement disponibles sont représentées par les inhibiteurs de Janus kinase (les anti-JAK de type tofacitinib et filgotinib), les modulateurs des récepteurs des sphingosines-1-phosphates (S1P) (ozanimod) ainsi que le mongersen, un anti-SMAD7 augmentant la production de TGF-bêta (Serrero, Grimaud, and Peyrin-Biroulet 2017).

Concernant les SpA, le secukinumab (anti-IL-17) et l'apremilast (anti-PDE4) sont les médicaments dont le développement est le plus avancé, suivis de molécules ciblant la voie des JAK kinases (tofacitinib, baricitinib…) ('Spondyloarthrites' n.d.).

4 Dialogue hôte/microbiote

Dans l'écosystème complexe de l'holobionte, la communication est un facteur régulateur clé. Le dialogue hôte/microorganismes est indispensable à la cohabitation et à la survie des deux espèces, que ce soit en ce qui concerne la tolérance vis-à-vis de la flore commensale, de la réponse de l'hôte au pathogène ou du pathogène à l'hôte pour moduler ses facteurs de virulence. Ce dialogue est donc nécessaire à l'équilibre mutualiste ou, au contraire, à la rupture de l'équilibre qui va profiter seulement à l'un des deux interlocuteurs.

Les bactéries communiquent entre elles *via* des molécules de quorum sensing. Même en situation d'homéostasie entre microorganismes et cellules eucaryotes, l'hôte produit de multiples molécules messagères. De plus, les deux acteurs produisent une myriade de molécules nécessaires à leur fonctionnement. En conséquence les deux types cellulaires sont exposés en permanence à des signaux multiples provenant des différents règnes. Ces signaux peuvent être perçus, intégrés, et éventuellement déclencher une réaction.

Les interactions hôte/microorganismes ont été particulièrement étudiées dans le contexte infectieux. L'étude des mécanismes par lesquels le stress eucaryote influence la pathogenèse des maladies infectieuses a conduit à l'émergence d'un nouveau domaine d'étude transdisciplinaire nommé « endocrinologie microbienne » (Mark Lyte 2004; Neuman *et al.* 2015).

4.1 Réaction de l'hôte aux microorganismes

La plupart des études se sont concentrées sur le point de vue de l'hôte, et il est admis depuis de nombreuses années que l'organisme humain est capable de réagir spécifiquement à des signaux d'origine bactérienne.

La défense de l'hôte envers les bactéries dépend d'une reconnaissance immune innée ou acquise, grâce aux récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (pattern recognition receptors ou PRRs), ciblant soit les composés de surface (LPS, peptidoglycane, flagelline, porines, etc.) ou internes (ADN, enzymes, toxines, etc.). Dans la plupart des types cellulaires, l'identification des molécules bactériennes est permise par les récepteurs de type Toll (Toll-like receptors ou TLRs) et les protéines cytoplasmiques de type NOD (nucleotide oligomerization domain). Le sous-type TLR4 qui se lie au LPS, l'endotoxine des bactéries Gram négatives, est le principal récepteur impliqué dans la détection de ces microorganismes. La stimulation du TLR4 initie la production de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines qui recrutent et activent les leucocytes, qui à leur tour activent toute la cascade inflammatoire. Il a, par exemple, été montré que le LPS bactérien était capable de déclencher le relargage de cathécholamines par les phagocytes (Flierl *et al.* 2009, 2007). Le LPS n'est cependant pas une structure invariante. Une seule espèce bactérienne exprime de multiples formes de LPS qu'elle peut rapidement modifier en réponse à une pression environnementale. Par exemple, *Salmonella* déacétyle et palmitoylate le lipide A du LPS en réponse au micro-environnement de l'hôte (phagosome, milieu limité en magnésium, peptides antimicrobiens), ce qui permet à la bactérie d'échapper à la détection TLR-4 dépendante (Kawasaki, Ernst, and Miller 2004).

Les molécules de quorum sensing possèdent un effet immunomodulateur qui peut faciliter l'invasion par les pathogènes (Skindersoe *et al.* 2009). Les molécules auto-inductrices du QS semblent exercer des activités immuno-modulatrices sur l'hôte et moduler le relargage d'hormones neuro-endocrines (cross-talk) (Gupta, Gupta, and Harjai 2013; Sperandio *et al.* 2003; Glucksam-Galnoy *et al.* 2013).

Les bactéries peuvent également synthétiser des protéines exerçant des effets analogues aux cytokines humaines. Par exemple, certaines bactéries Gram négatives produisent une protéine qui présente une activité analogue à celle de l'IL-1 (Johns *et al.* 1988).

Les pathogènes peuvent moduler la réponse inflammatoire à leur infection pour améliorer leurs capacités de colonisation. *E. coli* O157:H7 et *E. coli* entérohémorragique diminuent l'activation de la voie de signalisation NF-κB basale et induite par le TNFα (Xue *et al.* 2014).

Salmonella Typhimurium inhibe l'anorexie induite par l'infection, en diminuant l'activation de l'inflammasome *via* son effecteur SlrP, ce qui prévient l'anorexie causée par le signal envoyé par les fibres afférentes du nerf vague vers l'hypothalamus en réponse à la stimulation par l'IL-1 bêta (Rao *et al.* 2017). Cette manipulation du système inflammatoire bénéficie à la fois à l'hôte, en augmentant sa survie, et au pathogène, en améliorant sa transmission.

4.2 Réaction des microorganismes aux signaux de l'hôte

De la même façon que les cellules eucaryotes sont capables de reconnaître les microorganismes pathogènes et d'activer en réponse leur système immunitaire, les bactéries elles-mêmes possèdent des récepteurs qui leur permettent de reconnaître l'activation immunitaire et d'y répondre.

Les bactéries évaluent en permanence le rapport bénéfices/coûts de l'expression de facteurs de virulence. Dans un environnement rempli de nombreux signaux chimiques dérivés de l'hôte, les bactéries ont développé un système décisionnel coopératif afin d'éviter les défenses de l'hôte et de prolonger leur survie. Les pathogènes ont ainsi développé des outils de communication qui impliquent la production et la reconnaissance de concentrations critiques en molécules auto-inductrices dans un processus appelé le quorum sensing (QS) (Hartmann and Schikora 2012). A partir d'une certaine concentration de ces auto-inducteurs, les bactéries coordonnent leur expression génique pour aboutir à une réponse multi-cellulaire. Depuis la découverte du QS, on sait que la virulence est fortement régulée par la phase de croissance ; l'expression des facteurs de virulence est minimale en phase initiale, et son pic est déclenché à partir d'un certain seuil de croissance. Il est maintenant par ailleurs bien montré que la modulation de la virulence dépend en partie du relargage dans le micro-environnement de messagers eucaryotes.

Le principal mécanisme par lequel les bactéries détectent les variations environnementales et y répondent est le système de transduction à deux composantes (détection/transduction), mais d'autres mécanismes sont exprimés par les bactéries. En effet, des études bioinformatiques ont identifié dans le génome des procaryotes des séquences montrant une homologie avec toutes les grandes familles de récepteurs eucaryotes (récepteur à activité tyrosine kinase, récepteur couplé aux protéines G, récepteur ionotrope, etc.), suggérant que les bactéries peuvent exprimer des récepteurs sensibles à

une multitude de signaux eucaryotes incluant les cytokines, les neurotransmetteurs et les hormones (Lesouhaitier *et al.* 2009).

4.2.1 Interaction bactéries/molécules autres que cytokines

Les hormones sont des composés régulateurs de natures variées, produits par tous les organismes multicellulaires dans les structures glandulaires. Les hormones peuvent être de nature protéique, de la famille des stéroïdes, des dérivés des acides aminés ou des acides gras. Elles peuvent moduler l'homéostasie, la reproduction, le développement et/ou le comportement.

Avant 1992, les effets délétères de l'administration d'adrénaline dans les cas de sepsis étaient attribués aux effets immunomodulateurs de cette neuro-hormone. Lyte et Ernst ont pour la première fois montré à cette date un effet direct des catécholamines sur la croissance de bactéries Gram négatif (M. Lyte and Ernst 1992).

Chez les *E.coli* entéro-hémorragiques, les effets des molécules auto-inductrices de classe AI3 du QS peuvent être mimés par les cathécholamines eucaryotes (Sperandio *et al.* 2003), avec un effet inhibiteur des antagonistes spécifiques des catécholamines. Cela suppose la présence de récepteurs adrénergiques bactériens (BARs) (Karavolos *et al.* 2013). D'autres mécanismes semblent indépendants des BARs, car non sensibles aux antagonistes spécifiques, suggérant la présence d'un sensing indirect.

Les hormones de stress neuro-endocrines peuvent moduler la croissance de staphylocoques (Neal *et al.* 2001) et l'expression de facteurs de virulence de plusieurs bactéries pathogènes (Karavolos and Khan 2014). Le neurotransmetteur GABA module également la transcription de facteurs de virulence de plusieurs bactéries (Lesouhaitier *et al.* 2009).

Certaines bactéries reconnaissent également des hormones autres que les hormones neuroendocrines comme l'insuline, la somatostatine ou les peptides natriurétiques (Lesouhaitier *et al.* 2009).

Les bactéries sont également capables de réagir à d'autres molécules que les hormones. La dynorphine, appartenant à la famille des opioïdes, majore la virulence de *P. aeruginosa*, *via* des mécanismes dépendant du quorum sensing (Zaborina *et al.* 2007). Par ailleurs, plusieurs bactéries possèdent des récepteurs pour les protéines plasmatiques et pour différentes protéines de la matrice extracellulaire. La liaison bactérienne au collagène, à la fibronectine et à la laminine a été proposée comme un mécanisme important dans l'adhérence bactérienne aux tissus cibles. Cette adhérence est souvent, voire systématiquement, associée à des changements métaboliques du microorganisme (Liu *et al.* 2018).

4.2.2 Interaction cytokines eucaryotes/bactéries

Les cytokines diffèrent des hormones par leur mode de synthèse, leurs types et leurs fonctions. Ce sont une vaste catégorie de petites protéines d'environ 5-20kDa, qui sont synthétisées et sécrétées par les cellules immunitaires classiques et certaines autres cellules comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules stromales etc. Elles médient une multitude de réponses physiologiques aux

infections et, en particulier, l'inflammation. Leur action est relayée par une cascade d'événements biologiques qui conduisent à la propagation de la réponse inflammatoire et de la défense de l'hôte contre les pathogènes. Le rôle naturel de ces molécules, quand elles sont présentes à des concentrations adaptées, est bénéfique pour l'hôte dans la mesure où elles permettent un recrutement et une activation des cellules immunitaires, et ainsi d'éradiquer les germes à l'origine du processus infectieux. En plus de ce rôle bien connu des cytokines, une autre action parallèle pendant le processus infectieux a été suspectée dans les années 1990. En effet, il a été montré qu'un stress d'origine non infectieuse pouvait favoriser une translocation massive de bactéries intestinales et/ou de toxines dans le compartiment systémique (Caso, Leza, and Menchén 2008). *Pseudomonas aeruginosa* est un des meilleurs exemples d'organismes conservant des génomes étendus qui contiennent un arsenal de mécanismes génétiques lui permettant de s'adapter à des environnements variés, des agents antimicrobiens et des substrats dont certains tissus eucaryotes qui contiennent une grande quantité de molécules messagères (Stover *et al.* 2000).

Ces observations ont été à l'origine de l'étude des effets directs des cytokines sur les bactéries (Tableau 2).

Ces effets ont été étudiés *in vitro*. Il a été montré que l'interleukin-1, l'interleukin-2, le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, l'interleukin-6, l'interferon-γ et le TNFα (G. Luo et al. 1993) stimulent la croissance bactérienne à partir d'une certaine concentration. Par exemple *Pseudomonas aeruginosa* peut lier des éléments du système immunitaire de l'hôte comme l'interferon-γ et la dynorphine (peptide endogène agoniste des récepteurs morphiniques) et ensuite *via* le circuit du QS augmenter sa virulence (Lesouhaitier *et al.* 2009). Seule l'IL-4 était sans effet sur la croissance bactérienne. Il semble donc que les cytokines ont un effet à double tranchant sur l'inflammation et l'infection : les cytokines pro-inflammatoires agissent comme des stimulateurs de la croissance bactérienne lorsqu'elles atteignent une concentration suffisante.

Porat *et al.* ont montré que l'IL-1beta, mais pas le TNFα ou l'IL-4, stimule la croissance de souches virulentes d'*E. coli*, mais pas de souches non virulentes. Cette stimulation était bloquée par l'IL-1ra (IL-1 receptor antagonist), ce qui suggère la présence d'un structure analogue à un récepteur à la surface des souches virulentes (Porat *et al.* 1991). On note que ces effets étaient observés pendant la phase de croissance exponentielle, avant d'atteindre la phase stationnaire. La protéine huissier Caf1A de *Yersinia pestis* possède une haute affinité pour l'IL-1beta (Zav'yalov *et al.* 1995), ce qui fait de cette protéine un bon candidat au rôle de récepteur à cette cytokine.

L'IL-2 and le GM-CSF stimulent la croissance d'une souche virulente *d'E. coli* (isolée d'une infection cutanée), mais pas d'une souche non virulente (Denis, Campbell, and Gregg 1991).

Meduri *et al.* ont montré *in vitro* que des isolats cliniques de *S. aureus*, *Acinetobacter* sp. et *P. aeruginosa* utilisaient les cytokines TNFα, IL-1 ou IL-6 comme des facteurs de croissance, avec une action concentration-dépendante (Meduri *et al.* 1999). De façon intéressante, ces effets n'étaient visibles qu'en utilisant des isolats frais, et disparaissaient lors du passage *in vitro* dans un milieu non enrichi en cytokines.

Kanangat *et al.* ont montré que la croissance de *Staphylococcus aureus* était significativement augmentée en présence l'IL-1 beta, de manière concentration-dépendante, et diminuée par la présence d'IL-1ra, suggérant une action de l'IL-1 beta médiée par un récepteur (Kanangat *et al.* 2001).

Le TNFα augmente *in vitro* la croissance *d'Escherichia coli* mais pas de *Pseudomonas aeruginosa*, de façon concentration-dépendante. Cet effet est atténué par les anticorps anti-TNFα (J.-H. Lee *et al.* 2003).

Luo *et al.* ont montré que le TNFα pouvait se lier à plusieurs bactéries Gram négatives et positives *via* un récepteur membranaire de nature protéique. Le TNFα était capable chez *Shigella flexneri* d'augmenter l'invasion de cellules HeLa ainsi que la capture par des macrophages humains et murins, suggérant une interaction entre le complexe TNFα/bactérie et les récepteurs eucaryotes (G. Luo *et al.* 1993). Cependant, le récepteur spécifique qui médie la réponse n'a pas encore été identifié. De plus, les mécanismes de signalisation spécifiques et les facteurs de virulence impliqués dans les effets du TNFα sur *Shigella flexneri* demeurent inconnus.

L'interféron-gamma – ce qui n'est le cas ni de l'IL-2 ni de l'IL-1 beta - augmente la croissance d'*E. coli* et de *Klebsiella pneumoniae* (Hogan *et al.* 1993).

Wu *et al.* ont montré que l'IFN-γ pouvait se lier à une protéine membranaire de *P. aeruginosa,* OprF, et induire l'expression d'un déterminant de la virulence dépendant du quorum sensing (Wu *et al.* 2005). Cet effet n'était pas présent avec le TNFα, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10 ou l'IL-12. Aucune de ces cytokines, y compris l'IFN-γ, ne modifiait la croissance bactérienne.

Plus récemment, il a été montré que la capture de cytokines pro-inflammatoires de l'hôte, TNFα et IL-8, entraînait une modification transcriptionnelle des gènes de virulence chez *N. meningitidis*. Cette capture est médiée par des pili de type IV (Mahdavi *et al.* 2013).

Tableau 2 : Effets connus des cytokines eucaryotes sur des bactéries pathogènes Gram-négatives.

Cytokine	Espèce bactérienne	Effet observé	Récepteur	Référence
IL-1β	*Escherischia coli*	↗croissance	protéine Caf1A ?	Porat 1991
	Acinetobacter spp, *Staphylococcus aureus*	↗croissance	?	Meduri 1999
TNF-α	*Shigella flexneri*	↗invasion	protéine membranaire, non précisée	Luo 1993
	Staphylococcus aureus	↗croissance	?	Meduri 1999
	Escherischia coli	↗croissance	?	Lee 2003
	Salmonella Typhimurium	↗invasion	?	Ma 2010
	Neisseria meningitidis	↗virulence	pilus de type IV	Mahdavi 2013
IL-2	*Escherischia coli*	↗croissance	?	Denis 1991
GM-CSF	*Escherischia coli*	↗croissance	?	Denis 1991
IL-6	*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*	↗croissance	?	Meduri 1999
IFN-γ	*Klebsiella pneumoniae*	↗croissance	?	Hogan 1993
	Escherischia coli	↗croissance	?	Hogan 1993
	Pseudomonas aeruginosa	↗QS/virulence	protéine membranaire OprF	Wu 2005

QS: quorum sensing, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor

Les récepteurs procaryotes ont ainsi un double rôle : la perception de signaux dans un milieu éminemment complexe et la transduction du signal (Lesouhaitier *et al.* 2009) pour initier des changements dans la physiologie bactérienne. Comme les molécules messagères sont en général incapables de traverser passivement la membrane bactérienne, leur reconnaissance implique soit la présence de récepteurs membranaires, soit la présence de mécanismes actifs de transport intra-cytoplasmique permettant une reconnaissance interne.

De façon notable, on retrouve du TNFα en abondance dans le sang et les selles de patients atteints de MC et dans la muqueuse des patients atteints de RCH (Rutgeerts, Van Assche, and Vermeire 2006), ce qui pourrait modifier *per se* la composition du microbiote intestinal.

4.2.3 Conséquences en pratique clinique

4.2.3.1 Modèles infectieux

In vivo, les conséquences d'une infection résultent du bilan entre les effets protecteurs du relargage des cytokines sur les cellules eucaryotes et les effets directs sur les bactéries. Cela est valable dans le cas d'animaux immuno-compétents, où la capacité du TNFα à recruter les polynucléaires neutrophiles phagocytiques l'emporte clairement sur un quelconque effet promoteur de croissance qui pourrait survenir.

Cependant, la croissance bactérienne intracellulaire de *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* sp. est diminuée dans des cellules humaines monocytaires issues de lignées ou obtenues à partir de volontaires sains exposées à de faibles concentrations en cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1 beta, IL-6 à 10 à 250pg) ou en LPS, alors qu'elle est augmentée lorsque les concentrations en cytokines ou en LPS sont plus fortes (1 à 10ng pour les cytokines) (Kanangat *et al.* 1999). Cela souligne que la balance bénéfice/risque est très dépendante du contexte, et qu'une suractivation inflammatoire peut être délétère pour l'hôte.

Netea *et al.* ont montré une augmentation de la mortalité lors d'une infection à *Candida albicans* chez des souris double knock-out pour le TNFα et la lymphotoxine α (Netea *et al.* 1999). Lee *et al.* ont étudié la croissance bactérienne chez des souris vivantes. Les souris déficientes pour le TNFα (TNFα -/-) montraient une mortalité supérieure à celle de souris wild-type après l'inoculation de bactéries par voie nasale. Une clairance bactérienne diminuée chez les souris TNFα -/- était associée à des concentrations sériques diminuées en chemokine macrophage inflammatory protein-2, un recrutement pulmonaire en neutrophiles altéré et une diminution de l'expression des neutrophiles CD11b et CD16/CD32 (J.-H. Lee et al. 2003). Cela montre que, lorsque les neutrophiles sont disponibles, le rôle du TNFα de coordination de la réponse inflammatoire est plus important que la stimulation de la croissance bactérienne.

Des souris neutropéniques wild-type présentaient des concentrations en *E. coli* 100 fois supérieures dans leurs poumons à celles de souris TNFα -/- non neutropéniques, mais la survie était similaire dans les deux groupes. L'effet de modulation de la croissance observé *in vitro* ne se retrouvait donc *in vivo* que chez des animaux neutropéniques. Bien que le TNFα ait des effets indépendants le l'activation leucocytaire comme l'angiogenèse et la cachexie, ces résultats soulignent le rôle critique des neutrophiles pour une clairance bactérienne, et posent la question de l'extrapolation de ces résultats chez des patients immunodéprimés.

Un traitement par anti-TNFα augmente la mortalité dans un modèle murin d'infection pulmonaire pneumococcique (van der Poll *et al.* 1997) et ces traitements sont clairement associés à une majoration du risque infectieux chez l'homme.

L'efficacité de certains antibiotiques étant meilleure lorsque les bactéries se multiplient rapidement, la stimulation de la croissance bactérienne par les cytokines pourrait agir en synergie avec ces traitements.

Le rôle principal du TNFα semble être l'orchestration des neutrophiles par la stimulation de toutes les étapes pertinentes de leur recrutement et activation (Roach *et al.* 2002), c'est-à-dire l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et les neutrophiles, la stimulation de la production de chemokines et l'activation des neutrophiles eux-mêmes (J.-H. Lee et al. 2003).

Elucider les mécanismes par lesquels certaines bactéries réagissent au TNFα, impliquant probablement des récepteurs membranaires spécifiques, pourrait permettre d'identifier des cibles thérapeutiques nouvelles. Bloquer sélectivement la réponse bactérienne au TNFα pourrait permettre de limiter la croissance bactérienne en contexte pro-inflammatoire, tout en maintenant la réponse inflammatoire de l'hôte, ce qui pourrait être particulièrement pertinent chez des patients immunodéprimés (Mizgerd

2003), particulièrement s'ils sont traités pour augmenter la production de TNFα dans le cadre de thérapies immuno-adjuvantes (Moore and Standiford 2001).

4.2.3.1.1 Interactions hôte/microbiote

L'hypothèse la plus répandue est que les infections létales causées par des pathogènes opportunistes se développent de façon permissive, par l'invasion d'un hôte qui est à la fois physiologiquement stressé et immunologiquement affaibli. Cependant, une hypothèse alternative pourrait être que les pathogènes opportunistes perçoivent activement les altérations des fonctions immunes de l'hôte et répondent à ces altérations en majorant leurs phénotypes de virulence (Wu *et al.* 2005; Mahdavi *et al.* 2013)

Le microbiote digestif est généralement considéré comme constitué de microorganismes commensaux, c'est-à-dire non pathogènes. Cependant, la catégorisation des microorganismes en symbiotiques/commensaux/pathobiontes/pathogènes est probablement très imparfaite, car elle ne prend en compte ni les caractéristiques génétiques de l'hôte ni les conditions environnementales. Un même microorganisme peut ainsi faire partie d'un microbiote digestif permettant l'homéostasie chez un individu à un instant t, tout en participant au maintien d'un déséquilibre inflammatoire chez un autre individu ou chez le même individu dans d'autres conditions.

De plus, il n'est pas exclu que dans l'interaction fine hôte/microbiote, l'effet bactérien des cytokines soit relativement plus important que dans les modèles infectieux. Ainsi, en modulant finement certaines propriétés de microorganismes commensaux comme l'adhésion ou les capacités mucinolytiques, sans exercer au niveau de la barrière épithéliale d'effet significatif réprimant la croissance de ces microorganismes, une augmentation de la concentration de ces cytokines pourrait modifier l'état d'homéostasie et entraîner une rupture de tolérance auto-entretenant le phénomène.

Les MIC étant fréquemment déclenchées par un stress infectieux, associé à un déséquilibre inflammatoire, une modification fonctionnelle du microbiote digestif préexistant induit par le changement transitoire des concentrations locales en cytokines eucaryotes pourrait déclencher une boucle pro-inflammatoire auto-entretenue (Figure 10).

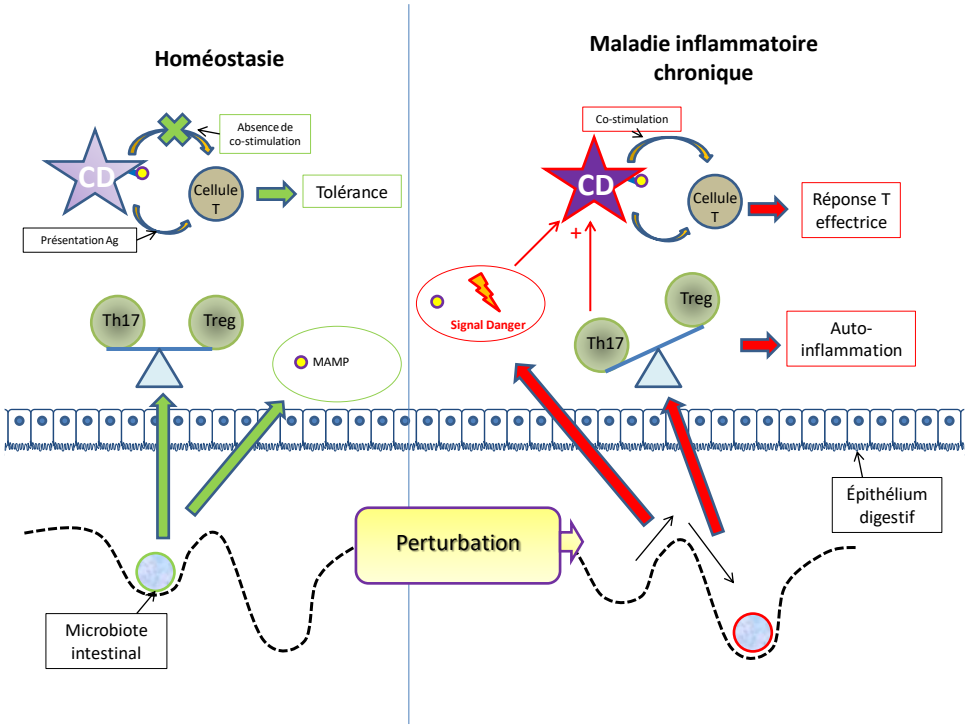


Figure 10 : Microbiote intestinal et maladies inflammatoires chroniques. A la faveur d'une perturbation, la composition du microbiote digestif est modifiée vers un nouvel état stable. Cette nouvelle composition va modifier l'équilibre Th17/Treg, et induire ou pérenniser la libération de signaux Danger au niveau de l'épithélium digestif, qui vont activer les cellules dendritiques et induire une réponse cellulaire T effectrice. La perturbation peut être d'origine variée : infection, inflammation, xénobiotique, alimentation. MAMP : microbial associated molecular pattern ; CD : cellule dendritique

En présence d'un stress, de nombreux facteurs eucaryotes sont relargués et détectés par les bactéries Gram négatif, qui en retour adaptent rapidement leur physiologie. Les médiateurs eucaryotes (hormones, cytokines, neuro-médiateurs…) pourraient donc être perçus par les bactéries comme des signaux environnementaux.

Toutes ces études se concentrent principalement sur des pathogènes stricts ou des pathogènes potentiels ; cependant, le microbiote intestinal commensal produit très probablement également des molécules de QS (Swearingen, Sabag-Daigle, and Ahmer 2013), ce qui est suggéré par des études de métagénomique ayant identifié dans le microbiote digestif des gènes codants pour des enzymes impliquées dans la production d'auto-inducteurs (I. Cho and Blaser 2012). Les bactéries commensales pourraient moduler la motilité du tube digestif et/ou les fonctions immunitaires *via* la production d'hormones NE pour permettre l'homéostasie. De même, les signaux eucaryotes sont susceptibles de moduler l'activité des commensaux.

4.3 Commensaux, symbiontes, pathobiontes, pathogènes : un continuum dynamique

Classiquement, les microorganismes commensaux sont définis comme non bénéfiques mais non délétères, les symbiontes comme non délétères et bénéfiques pour l'hôte, les pathobiontes comme causant occasionnellement une infection et les pathogènes comme causant systématiquement une infection.

Mais ces distinctions n'ont de sens que du point de vue de l'hôte. Du point de vue du microorganisme, la sélection naturelle favorise les individus qui passent toutes les étapes aboutissant à leur succès reproductif, consistant à entrer en contact avec l'hôte, croître en utilisant les nutriments disponibles, échapper aux défenses de l'hôte, persister et se répliquer, et finalement sortir de l'hôte et envahir de nouveaux hôtes. Toutes ces étapes sont communes à tous les microorganismes et ne préjugent en rien du caractère pathogène ; leur perfectionnement résulte majoritairement des acquisitions horizontales et des pertes de gènes, et minoritairement de mutations (Ochman and Moran 2001). L'acquisition de phénotypes de virulence est le plus souvent permise par le transfert d'îlots de pathogénicité ; l'existence « d'ilots de symbiose » a été également mise en évidence (Ochman and Moran 2001).

Par exemple, *E. coli* peut se comporter comme un commensal et est toujours présente dans le microbiote digestif des individus sains, mais l'acquisition d'un seul îlot de pathogénicité peut lui conférer un phénotype pathogène, alors que cinq sont nécessaires dans le cas de *Salmonella enterica*.

Mais, au total, seulement 5% du génome de *Salmonella enterica* est impliqué dans la virulence, alors que la plupart de ses gènes sont ancestraux et présents également chez les commensaux, comme des gènes impliqués dans la lutte contre les défenses de l'hôte ou le développement de voies de synthèse permettant de compenser les carences en nutriments spécifiques à l'hôte. L'acquisition d'un pouvoir de virulence par transfert de gènes est en fait la plupart du temps limitée aux microorganismes ayant été en contact avec les eucaryotes depuis un temps long.

Une proportion importante de symbiontes et de pathogènes a connu une perte génétique massive. Tous les plus petits génomes appartiennent à des symbiontes ou des pathogènes obligatoires, ce qui témoigne de l'inutilité de conserver certains gènes chez ces microorganismes, l'hôte fournissant un environnement constant satisfaisant leurs besoins fonctionnels.

De façon intéressante, la perte de gènes peut également être impliquée dans l'acquisition d'un phénotype pathogène. Par exemple, les souches pathogènes du genre *Shigella* (responsables d'un syndrome dysentérique) ont perdu *ompT*, un gène que l'on retrouve dans les souches d'*Escherichia coli* très proches. L'introduction de *ompT*, qui code pour une protéase de surface, supprime la virulence de *Shigella* en bloquant son invasion (Nakata et al. 1993). Une hypothèse pourrait être que la diminution de compétition au sein des communautés microbiennes du microbiote digestif liée au mode de vie occidental, en diminuant la pression de sélection qui s'exerce sur les microorganismes initialement non pathogènes, favorise la diversification génétique soit par gain soit par perte de gènes, avec le risque de modifier les relations hôte/microorganismes.

En résumé, la majorité des interactions hôte/microorganismes sont neutres ou bénéfiques pour les deux parties (Ochman and Moran 2001).
Cependant, cette catégorisation n'est pas figée et est hautement dépendante des conditions environnementales et de la temporalité. Les pathogènes et les symbiontes dépendent de mécanismes d'interaction similaires avec l'hôte.

Il n'est pas exclu qu'à la faveur d'une infection aiguë une transmission d'îlots de pathogénicité entre le pathogène et les microorganismes déjà présents dans l'hôte se produise, modifiant durablement l'homéostasie entre l'hôte et le microbiote dans le cas où ce transfert conférerait un avantage sélectif.

frontiers in Immunology

REVIEW
published: 07 December 2017
doi: 10.3389/fimmu.2017.01678

Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity

*Lynn Chiu[1†], Thomas Bazin[2,3†], Marie-Elise Truchetet[4], Thierry Schaeverbeke[2,4], Laurence Delhaes[5,6] and Thomas Pradeu[1]**

[1] University of Bordeaux, CNRS, ImmunoConcept, UMR 5164, Bordeaux, France, [2] University of Bordeaux, INRA, Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, EA 3671, Bordeaux, France, [3] Department of Hepato-Gastroenterology, Bordeaux Hospital University Center, Pessac, France, [4] Department of Rheumatology, Bordeaux Hospital University Center, Bordeaux, France, [5] Department of Parasitology and Mycology, Bordeaux Hospital University Center, Bordeaux, France, [6] University of Bordeaux, INSERM, Cardio-Thoracic Research Centre of Bordeaux, U1045, Bordeaux, France

Resident microbiota do not just shape host immunity, they can also contribute to host protection against pathogens and infectious diseases. Previous reviews of the protective roles of the microbiota have focused exclusively on colonization resistance localized within a microenvironment. This review shows that the protection against pathogens also involves the mitigation of pathogenic impact without eliminating the pathogens (i.e., "disease tolerance") and the containment of microorganisms to prevent pathogenic spread. Protective microorganisms can have an impact beyond their niche, interfering with the entry, establishment, growth, and spread of pathogenic microorganisms. More fundamentally, we propose a series of conceptual clarifications in support of the idea of a "co-immunity," where an organism is protected by both its own immune system and components of its microbiota.

Keywords: host–microbiota symbiosis, colonization resistance, microbial ecology, disease tolerance, pathogens, containment, infectious diseases

OPEN ACCESS

Edited by:
Mats Bemark, University of Gothenburg, Sweden

Reviewed by:
Siegfried Hapfelmeier, University of Bern, Switzerland
Wim Van Den Broeck, Ghent University, Belgium

****Correspondence:***
Thomas Pradeu
thomas.pradeu@u-bordeaux.fr

[†]Co-first authors.

Specialty section:
This article was submitted to Mucosal Immunity, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: *13 July 2017*
Accepted: *15 November 2017*
Published: *07 December 2017*

Citation:
Chiu L, Bazin T, Truchetet M-E, Schaeverbeke T, Delhaes L and Pradeu T (2017) Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. Front. Immunol. 8:1678. doi: 10.3389/fimmu.2017.01678

INTRODUCTION

The immune system is never at rest, nor is it ever isolated from its environment. It is in constant interactions with myriads of microbes, which can be pathogenic, commensal, or mutualistic (1–4). Recent work has shed light on the impact of commensal and mutualistic microbes on the development, induction, training, and functioning of the immune system [reviewed in Ref. (5–7)]. It is becoming increasingly clear that the microbiota, i.e., the microorganisms living persistently on and in a host, play a decisive role in shaping an effective host immune system and, *vice versa*.

Resident microorganisms do not just induce host immunity but can also directly inhibit pathogens (8–14). This phenomenon has been documented across many species—vertebrates, invertebrates, and plants (15, 16). The ability of commensals and mutualists to interfere with pathogen colonization and growth is known as "colonization resistance" (17–19). While the concept of colonization resistance is not new (**Box 1**), its underlying mechanisms are just being understood. Two main modes of protection have been proposed: resident microorganisms can protect the host either through *direct* microbe–microbe competition, which involves niche competition or direct antagonism, or by the *indirect* induction or priming of host metabolism or immunity, thanks to which the host is better protected against pathogen infections.

BOX 1 | History of colonization resistance.

Since the beginning of the antibiotics era in the 1950s, it became increasingly clear that indigenous microbial flora—generally assumed as the anaerobic autochthonous symbionts—can be a source of resistance against pathogens. Resistance conferred by the indigenous population explains the side effects of antibiotics (e.g., microbial overgrowth and superinfections) as well as the effectiveness of using antibiotics to prepare animal models for pathogen infection (20–22). The main mechanisms were thought to be competition between microbes, either over substrates or through bactericide molecule production (23, 24). When van der Waaij and colleagues (25) coined the term "colonization resistance," they cited as possible mechanisms an indirect stimulation of gut movement in addition to direct antagonism between microbes, but rejected the involvement of the immune system. Yet, with the discovery of immunoglobulins (Ig) in the gut lumen and mucosa (26, 27), evidence for indirect, host-mediated mechanisms began to emerge: microbes were thought to assist the immune system by preventing Ig degradation or by significantly lowering pathogen load for Ig effectiveness (28, 29). In the meantime, proposals of direct mechanisms expanded (including competition over substrates and adhesion sites, release of antibacterial substances, prevention of translocation, and alteration of microenvironments to favor growth) (30–33). The 1980s and 1990s saw an explosion of research on colonization resistance and gut immune responses against pathogens, as well as the impact of bacterial flora on immune development (34). But only after the 2000s did breakthrough studies decisively demonstrate microbe-induced innate and adaptive immune responses, e.g., defensins (35), IgA specific to the mucosa (36), angiogenins (37), lectins (38), and modulated T-cell populations (39).

Colonization resistance constitutes an expanded sense of traditional protective immunity, as these mechanisms can in fact be considered part of the host's defensive repertoire. Of course, the protective effects of microbiota components are context-dependent: some microbes can help protect the host in certain circumstances, but are detrimental in others. In light of recent studies, our main claim is that microorganisms, broadly construed, can exert a protective role, and that a key challenge is now to characterize the different ways this protection can occur.

There are two important gaps in the current literature on colonization resistance. First, current understanding of microbe-induced protection is generally limited to colonization resistance against pathogen establishment and growth. Yet the protection against pathogens also involves the mitigation of pathogenic impact without eliminating the pathogens, also called "disease tolerance" (40), and the containment of microorganisms to prevent pathogenic spread.

Second, the protective effects reviewed under colonization resistance are localized to the immediate vicinity of the protective microbes. Of date, little is known about the protective effects of microorganisms against pathogens in distal organs and tissue sites, even though it is established that microorganisms in one organ (mainly the gut) can influence immune responses in other organs (41). The relative lack of research on long-reaching microbiota-mediated protection in part arises from the assumption that microorganisms, once established within their niches, do not spread or move. Another reason could be the assumption that protective long-reaching effects are too weak to be clinically relevant, and thus, not significant enough for therapeutic purposes. Both assumptions, however, are questionable.

In this review, we fill in the two gaps presented above with a systematic classification of protective mechanisms that include a broader range of defensive strategies differing in range (local, systemic, and long-reaching), mode (direct microbe-to-microbe and indirect host mediated), and effect (resistance, containment, and disease tolerance) (**Figure 1**). Addressing the first gap, we expand the effects of protection beyond colonization resistance to include containment of microorganisms and suppression of pathogenic impacts. We address the second gap by organizing existing evidence of the long-reaching of protective microbes.

Taking into account space constrains, our examples will focus only on vertebrates, with most of our examples coming from mammalian studies, especially humans and murine models [for example, in invertebrates, see Ref. (15)]. Because many of the terms used in this review have often been employed loosely in the literature and/or have been understood differently by different authors, here we explain in which sense we use them (**Box 2**). Finally, we offer important conceptual clarifications about the different ways components of the microbiota can exert protective effects on their host, and propose the concept of "*co-immunity*[1]" to describe the fact that host protection is in general the emergent and dynamic product of two influences, that of the host and that of some microorganisms (see Concluding Remarks and Perspectives).

LOCALIZED PROTECTION

In recent years, a general consensus on the mechanisms of colonization resistance has emerged (6, 9, 10, 18, 19, 43–46). Resident microorganisms can inhibit pathogenic viability and growth by antagonizing pathogens or "starving" them of limited resources, two well-recognized mechanisms of microbial ecological competition (47–49). In this section, we review expanded evidence that microorganisms confer local protection directly through microbe-to-microbe interactions (see Direct, Host-Independent Protection) and indirectly through the host immune system (see Indirect, Host-Mediated Protection) through colonization resistance, containment, and disease tolerance.

Direct, Host-Independent Protection

Colonization Resistance: Beyond Niche Competition and Antagonism

Recent reviews have focused on a few aspects of colonization resistance. Protective microorganisms can antagonize pathogens through contact-dependent inhibition or the release of antimicrobial molecules. They can also outcompete pathogens for limited resources such as trace metals, nutrients, receptor donors, or adhesion sites, or construct environments hostile to pathogens, for instance, by lowering environmental pH (see summary of recent findings in **Table 1**). A recent finding, for instance, is that bacteria of the Clostridiales order outcompete *Listeria monocytogenes* for nutrition in the small intestine and likely antagonize the pathogen in other ways in the large intestine, providing the host a first line of defense from systemic infection (50).

The concept of the ecological niche is central to colonization resistance. Protective microorganisms are thought to "defend" their nutritional niche by killing incoming pathogens

[1]Derek Skillings helped dubbed the term, noting its similarity to "community."

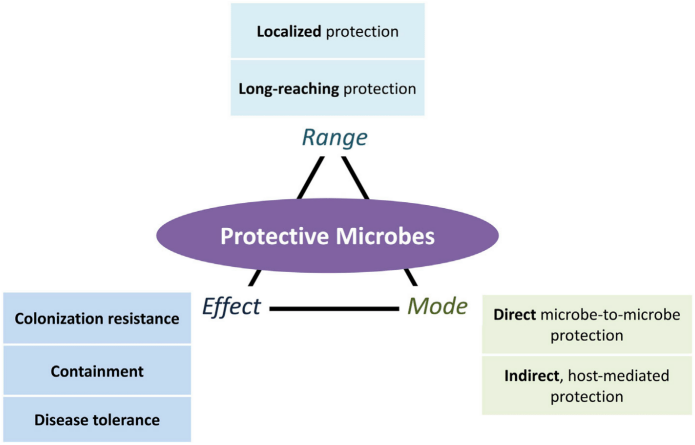


FIGURE 1 | An expanded view of microbe-conferred protection. Microorganisms can protect the host in different ways, depending on the mode of protection (direct ecological and indirect host-mediated), the effects of protection (colonization resistance against pathogenic establishment and growth, containment of pathogens and their effects, and disease tolerance of pathogens while suppressing their negative effects), and the range of protection (localized or long-reaching, with the latter further divided into protection that is systemic or from one locale to another locale). All three aspects of protection can occur in combination. Long-reaching protection, for instance, involves both direct (ecological) and indirect (host-mediated) modes of protection that result in colonization resistance, containment, or disease tolerance effects.

BOX 2 | Definitions.

- *Immune protection against pathogens*: although immune responses can be very diverse, ranging from protection to development and repair (42), our focus in this article is on protection against pathogens. Consequently, our analysis excludes protection against immune diseases such as allergies, diabetes, and susceptibility to xenobiotics. We distinguish between direct, host-independent protection and indirect, host-mediated protection.
- *Microbiota*: when talking about the "microbiota," we broadly consider all the resident microorganisms (microbes, but also "macrobes" such as helminthes) living in or on a host, regardless of the nature of their ecological interaction (parasitic, commensal, and mutualistic), size or taxonomy (parasites such as helminthes, fungi, bacteria, phages, or viruses). We also consider the synergistic and context-dependent effects of microorganisms.
- *Co-immunity*: a form of immune defense associating components of several organisms.
- *Colonization resistance*: host-dependent or independent resistance to pathogens that is induced by the microbiota. Current examples only concern the local inhibition of pathogen viability, establishment, or growth, but here we expand this concept to include long-reaching effects as well.
- *Containment*: controlled localization of microbes within a particular location inside the host body.
- *Disease tolerance*: limitation of host's tissue damages induced by pathogens, without direct pathogen elimination.

or outcompeting them (74). Pathogens, on the other hand, are thought to overcome colonization resistance by creating or exploiting new spatial-temporal niches (19). However, a niche is not just a nutritional environment, but any environmental feature relevant for colony survival and growth. Protective microbes can also inhibit pathogenic establishment and growth by disrupting pathogenic biofilms, bacterial collectives that undergo regular developmental "life cycles" and protected by synthesized extracellular polysaccharides matrices. Proteases released by *Staphylococcus epidermidis* can degrade the matrices of pathogenic *Staphylococcus aureus* biofilms (75, 76). Lactic acid bacteria can disrupt matrix synthesis by interfering with pathogen virulence genes, for instance, by decreasing the expression of *Streptococcus mutans* genes involved in matrix glucan production (77) or modulating *S. aureus* gene expressions related to the production of intercellular adhesion polysaccharides (78).

Protective microorganisms can also influence quorum sensing, the cell-to-cell communication system that allows bacteria to perceive information about bacterial population density and to regulate collectively virulence factor production and biofilm development (79, 80). Soluble molecules released by probiotics can interfere with the *S. aureus* accessory gene regulator (*agr*) quorum sensing system, which regulates the switch between biofilm and free-floating lifestyles (81). Subtilosin, a protein secreted by *Bacillus subtilis*, also interferes with the quorum sensing of *Gardnerella vaginalis*, preventing biofilm formation (82). Biosurfactants are well-known anti-adhesion, anti-biofilm agents that can also disrupt cell-to-cell signaling (83, 84). Cell-bound biosurfactants of lactic acid bacteria disrupt the biofilms of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *S. aureus* (85) as well as *Serratia marcescens* strains (86).

Beyond Colonization Resistance: Containment and Disease Tolerance

Colonization resistance is not the only way microorganisms can protect the host from pathogens, as not all types of protection act

TABLE 1 | Types of colonization resistance.

Types	Species	Effects	Reference
Nutrition niche competition	*Bacteroides thetaiotaomicron* against *C. rodentium*	Competition for carbohydrates	(10)
	Escherichia coli Nissle 1917 against *Salmonella* Typhimurium	Competition for iron	(51)
	Escherichia coli HS and *E. coli* Nissle 1917 against EHEC O157:H7	Competition for carbohydrates	(52)
Antagonistic inhibition	*E. coli* Nissle 1917 against commensal and pathogenic *E. coli* and *S.* Typhimurium	Production of microcin	(53)
	E. coli against EHEC O157:H7	Production of colicin	(54)
	Nasal *Staphylococcus lugdunensis* against *Staphylococcus aureus*	Production of lugdunin	(55)
	Enterococcus faecalis strain against *Enterococcus*	Production of bacteriocin (pPD1)	(56)
	B. thuringiensis against *Clostridia* species	Production of bacteriocin (thuricin CD)	(57, 58)
	Bacillus amyloliquefaciens against vaginosis-associated human pathogen *Gardnerella vaginalis*	Production of bacteriocin (subtilosin)	(59)
	Staphylococcus epidermidis peptides selectively reduce survival of *Streptococcus pyogenes* and *S. aureus*	Production of phenol-soluble modulins (PSM-γ and PSM-δ)	(60, 61)
	Four bacterial consortium (*R. gnavus* E1, *B. thetaiotaomicron* LEMF4, *Clostridium hathewayi* LEMC7, and *Clostridium orbiscindens* LEMH9) against *Clostridium perfringens*	Collective production of consortium-dependent antibacterial substance	(62)
	Against EHEC O157:H7	Production of short chain fatty acids (acetic, propionic, and butyric acids)	(63)
	Against *Clostridium difficile*	Production of secondary bile acids	(44, 64–66)
	Bacteroides fragilis against *Bacteroidales* strains in gut	Type IV system delivered toxins	(67, 68)
	Lactic acid bacteria against a range of pathogens	Lactic and acetic acid, metabolites (hydrogen peroxide and carbon dioxide), diacetyl, and bacteriocins	(69, 70)
Niche construction of disadvantageous environments	Lactic acid bacteria in vagina against bacteria and viruses	Lower environmental pH with lactic acid	(71)
	Propionibacterium acnes suppresses the growth of *S. aureus*	Lower environmental pH with fermentative products	(72)
	Anaerobic commensals against *Enterobacteriaceae*	Low oxidation–reduction potential	(73)

by inhibiting pathogenic colonies establishment and growth. The role of resident microorganisms in barring entry and dispersal of alien populations is oftentimes ignored (87). Furthermore, inhibition of quorum sensing can affect pathogenicity, the effects of pathogens, without inhibiting bacterial viability, which, as a therapeutic option can avoid the selection of drug-resistant bacteria (88). We thus propose looking beyond colonization resistance to adopt a community ecology point of view that better understands the multiple ways resident communities can prevent or disrupt pathogen invasion.

In invasion ecology, residents can disrupt alien invasion by intervening with alien entry and diversification, by inhibiting its establishment or growth, by mitigating its negative impacts on local communities, or by preventing alien dispersal into other vulnerable environments (89–91) (see summary of stages of invasion in **Table 2**). A more comprehensive picture of resistance against pathogens must take into consideration the multiple stages of invasion and go beyond competition as the only way residents can fight against invaders.

We thus distinguish three major microbial obstacles against invading pathogens (**Table 2**; **Figure 2**): *colonization resistance* exclusively refers to the prevention of pathogen establishment of a persistent colony and population growth, *containment* is the prevention of pathogen spread into another body site, sometimes leading to systemic infection, and finally, *disease tolerance* is the limitation of pathogenic impact on host tissues without killing the pathogens.

Containment is the controlled localization of microbes and their effects within a particular location inside the host body. One example is the intestinal lumen. The epithelium barrier and gut mucosal immune system prevents the translocation of microorganisms from the lumen into the host. Mucosal-associated microorganisms have long been postulated as reinforcers of gut barriers, both directly and indirectly through the host (94–97). For instance, in various organisms, bacteriophages that adhere to mucus glycoproteins can prevent translocation of bacteria, thus providing a host-independent protection of mucosal surfaces against bacterial infections (98). *Saccharomyces boulardii* also prevents *Salmonella* liver translocation by directly binding to the pathogens (99).

Secreted factors can interfere with the translocation of gut pathogens into and beyond the epithelia. Supernatants of *Enterococcus mundtii* and *Lactobacillus plantarum* inhibit the invasion of *L. monocytogenes* into epithelial cells (100). A secreted, non-bacteriocin component from *Escherichia coli* Nissle 1917 also reduces the efficiency of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium epithelial invasion and blocks invasion by many pathogens without eliminating them (101). Pathogen translocation can also be prevented by interference with pathogen adhesion to the epithelium (102, 103). It is well known that resident commensals, especially lactic acid bacteria, compete with pathogens for adhesion sites, for instance, the competition between *Lactobacillus reuteri* and enteropathogenic *E. coli* (104). Short chain fatty acids are products of anaerobic

TABLE 2 | Stages of ecological invasion.

Four stages of ecological invasion	Entry		Establishment and growth			Negative effects	Spread
Seven sub-stages	**1. Transportation: dispersal of microorganisms to a new sit**	**2. Introduction: entry into a new site**	**3. Establishment: survival and self-sustaining population**	**4. Growth: expansion**	**5. Diversification: mutation, lateral gene transfer, or adaptive evolution**	**6. Impact: negative effects on local communities**	**7. Spread: dispersal beyond the site of introduction**
Macroecology, synthesis of plant, and animal ecology (92)	Transportation	Introduction	Colonization and naturalization			Impact	Spread
Macroecology, synthesis of plant, and animal ecology (93)	Transportation	Introduction	Establishment				Spread
Microbial ecology, based on plant ecology (90)	Introduction (passive or active dispersal beyond abiotic barriers)	Establishment (resource competition against biotic barriers)	Growth and spread (access to local resources and niche construction, adaptive evolution, and horizontal gene transfer)			Impact (following displacement or alteration of community function)	
Microbial ecology, based on community ecology principles (87)		Entry	Establishment		Diversification		
Microbiome ecology, based on plant ecology (89)	Dispersal	Colonization	Establishment	Spread			Spread

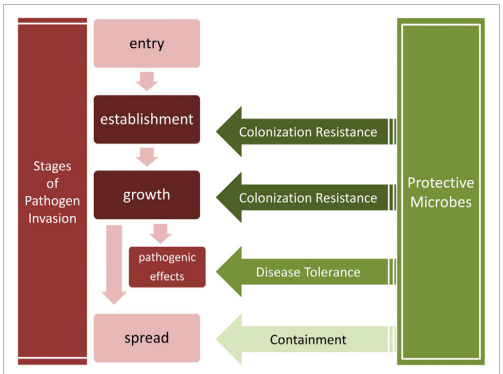


FIGURE 2 | Stages of pathogen invasion and the obstacles presented by resident communities. Colonization resistance, containment, and disease tolerance present obstacles to different stages of the invasion process. Colonization resistance disrupts the establishment and growth of pathogens, the containment of pathogens prevents their spread into other tissues, and disease tolerance suppresses the negative effects of pathogens without decreasing their load.

intestinal microbiota fermentation of dietary fibers. Butyrate inhibits the virulence genes that enable intestinal *S. enterica* subspecies to enter the epithelium, specifically pathogenicity island 1 (105). Acetate from *Bifidobacteria* can enhance epithelial cellular defense functions, inhibiting the translocation of Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) shiga toxin into the bloodstream (106).

Disease tolerance, on the other hand, is the limitation of pathogen-induced damage of host tissues without elimination of the pathogen. Various types of processes are associated with disease tolerance: the neutralization or inhibition of pathogenic toxins, the healing process of the host, and the regulation of destructive inflammation and maintenance of metabolic homeostasis (see **Box 3**). While the latter two are mediated through the host, the first can be host-independent.

An example of host-independent disease tolerance is the ability of resident microbiota to inhibit gene expressions of toxins. Soluble molecules from *Bacteroides thetaiotaomicron* and the bacteria-produced short chain fatty acid butyrate, for instance, can inhibit EHEC shiga toxin gene expressions and pathways (111, 112). The quorum sensing molecule AI-2 of *Ruminococcus obeum* also downregulates the *Vibrio cholera* toxin operon (113). Secreted organic acids can mitigate pathogen toxicity in various ways: lactic acid from *Streptococcus thermophilus* inhibits *Clostridium difficile* toxin A gene expression (114) while acetic acid secreted by a Bifidobacteria strain inhibits EHEC shiga toxin production in part by lowering environmental pH (115). Remarkably, the growth of shiga-producing *E. coli* was not inhibited by the *B. breve* strain even though toxin production was halted.

The damaging effects of pathogens can also be diminished by the degradation of released toxins. Proteases secreted by a

BOX 3 | The concept of disease tolerance.

Disease tolerance should be distinguished from "tolerance" or "immune tolerance," a low or regulated immune reaction toward an antigen (40). It is instead the limitation of pathogenic damage to host tissues. The concept of disease tolerance has long been recognized by plant ecologists as an alternative mode of protection from pathogens or pests besides resistance mechanisms, yet only relatively recently applied to animals (107–110). Even though disease tolerance is currently seen as an indirect process mediated by the immune system to control tissue damage (40), it could be directly regulated by microbes as well. The toleration of pathogens could be a cost-effective alternative when preservation of pathogen fitness does not strongly decrease host fitness (e.g., when pathogen virulence is low), especially since the side effects of pro-inflammatory immune responses are sometimes more damaging to the host than the infections themselves.

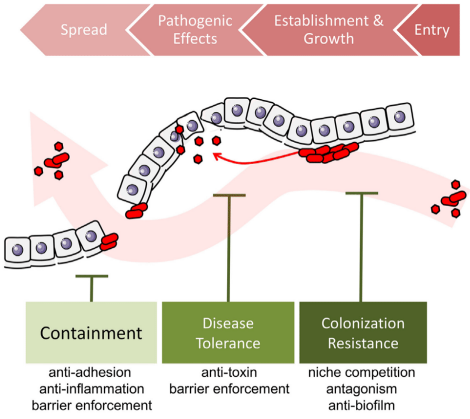


FIGURE 3 | Localized microbe-conferred protection against pathogen invasion. Alien pathogens invade the host by entering a host site, establishing a growing colony, exerting negative effects on the host. When conditions are ripe, they can spread to a different host site, in this case, through the epithelium or endothelium barrier. Protective microorganisms can challenge pathogen invasion at any of the four stages, by disrupting entry, preventing or destroying colony establishment and growth, by suppressing pathogenic effects, or by preventing spread into other tissues.

probiotic *Bacillus clausii* strain acts against toxins from *C. difficile* and *Bacillus cereus* (116). Another example is a *Saccharomyces boulardii* protease that inhibits *C. difficile* toxin A and B (117). Bifidobacteria and Lactobacilli strains mitigate *C. difficile* cytotoxic effects by inactivating their secreted toxins (118, 119).

In sum, colonization resistance, containment, and disease tolerance are diverse effects of protective microbes against the spread, establishment and growth, and impact of pathogen invasion. Broadening the concept of protection to include the effects of disease tolerance and containment allows us to consider pathogenicity in a wider context, taking into account the overall ecological process of pathogen invasion (**Figure 3**). The detailed mechanisms underlying these three types of effects—colonization resistance, containment, and disease tolerance—may overlap. For instance, competition over adherence sites prevents the growth of biofilms that enable the establishment, growth, and spread of many pathogens (**Figure 4**).

The examples reviewed so far are direct microbe-to-microbe effects. We now turn to indirect forms of protection that involve host systems.

Indirect, Host-Mediated Protection

Local microbiota-induced protection of the host can also be indirect, that is, mediated by host immunity and metabolism. We will focus on protection that involves the host immune system. Microorganisms induce proper development of crucial components of the host immune system, such as mucosa-associated lymphoid tissues (120–122). Here, we will more precisely focus on microbe-induced host immunity that specifically acts against pathogens (4, 123), guarding against both harmful (pathogens) and potentially harmful ("pathobionts") microorganisms.

Colonization Resistance

Examples of host-mediated protection, especially colonization resistance, by gut microbiota have already been extensively reviewed (see **Box 1**). Indirect colonization resistance occurs when resident microorganisms induce host reactions that act against pathogens.

Resident microbiota sampled by pattern recognition receptors can activate downstream secretion of antimicrobial peptides that protect the host by killing or inactivating bacteria, fungi, and viruses, primarily by destroying cellular membranes (124, 125). These include C-type lectin Reg3-γ (38), α and β defensins (35, 126), and the ribonuclease angiogenin (127). The effects are often pathogen- and host-specific (128–130).

Gut microbes induce the development of lymphoid tissues that sample and secrete Ig A into the gut lumen as well as regulate secretory IgA (SIgA) secretion levels (131). SIgA can help trap and exclude pathogens ("immune exclusion"), but when bound to certain microorganisms, can also selectively promote commensal biofilms that confer colonization resistance against pathogens ("immune inclusion") (132–136). Specificity to microorganisms could be enhanced through a positive feedback loop mediated by SIgA retrotransportation (137–139).

Microbes can also induce protective pro- or anti-inflammatory immune activities by altering the balance between host T-cell subsets (2, 140–142). By tilting the balance toward pro-inflammatory pathways, commensals help generate host-mediated attacks against pathogens. Segmented filamentous bacteria, for example, induce inflammatory Th17 immunity (143), leading to a generally protective, although context-dependent immune state (144). Protozoan *Tritrichomonas musculis* protects from gut *S.* Typhimurium infection through promotion of inflammatory Th1 and Th17 type immunity (145).

In the skin, microbiota could be considered an "endogenous adjuvant" of the skin immune system, exerting its influence *via* the release of products (such as antimicrobial peptides or metabolites) and/or *via* the modulation of innate and adaptive immunity without invoking inflammatory responses (146–148).

In the respiratory tract, local manipulation of the microorganism composition may have profound consequences on the

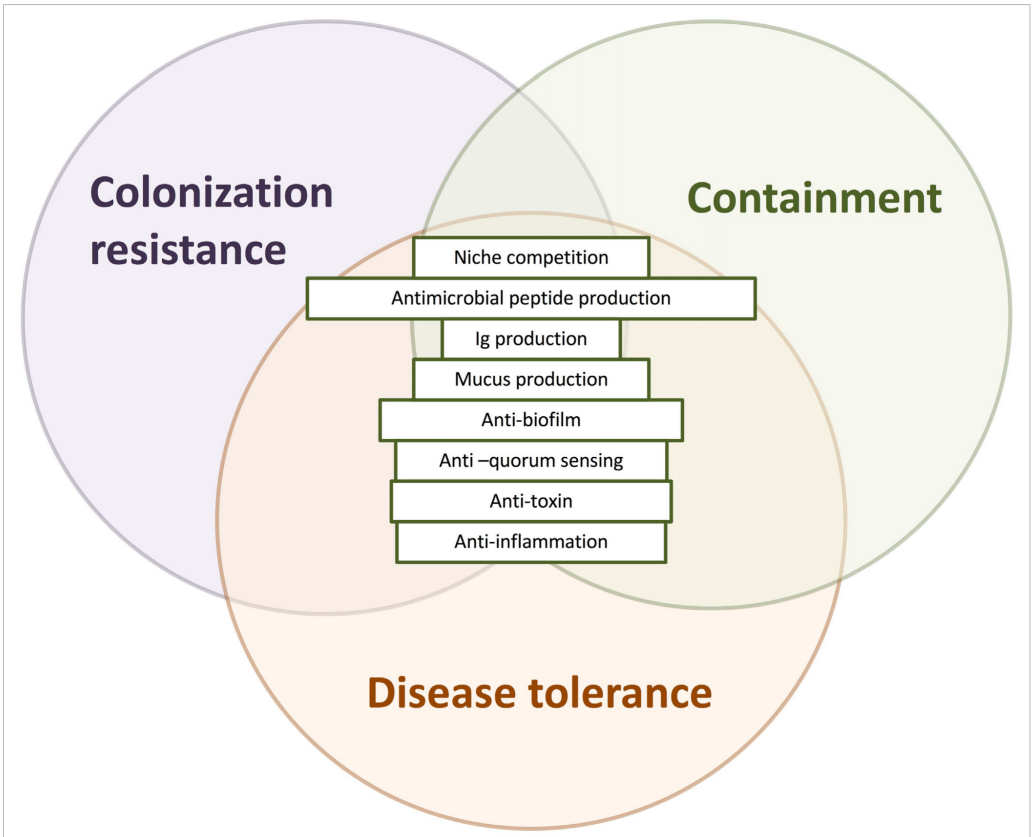


FIGURE 4 | The overlapping mechanisms of colonization resistance, containment, and disease tolerance. Colonization resistance, containment, and disease tolerance are distinct effects on invading pathogens, disrupting their growth and establishment, their spread, and their negative effects, respectively. Nevertheless, the mechanisms underlying these effects can overlap, deployed at different times and stages with different outcomes. Antimicrobial peptides, for instance, prevent the translocation of microorganisms as part of the mucus barrier and disrupt the establishment and growth of pathogens. Another example is the disruption of a pathogenic biofilm, which may destroy the establishment of the colony as well as prevent it from adhering and translocating gut lumen.

capacity of the host to mount protective responses (149). For instance, intranasal inoculation of mice with live or heat-inactivated *Lactobacillus* spp. and non-pathogenic *Listeria* spp. protects against secondary lethal infection with the virulent pneumonia virus by suppressing virus-induced pro-inflammatory cytokines and viral load (150).

Beyond Colonization Resistance: Containment and Disease Tolerance

Microbes can also indirectly protect the host by containing pathogens within the gut and lung lumen, as breaching of the epithelial layer triggers systemic inflammation. New developments shed light on the intimate relation between microorganisms and barrier functions. The gut epithelium barrier is fortified by maternal microorganisms before birth (151). After exposure to environmental microbes, microorganisms strengthen and protect the barrier (152). *In vitro* treatment of *Saccharomyces boulardii*, for instance, prevents *Bacillus anthracis* toxins from destroying the integrity of epithelium cells and the tight junctions between them (153). In antibiotics-treated mice, translocation of bacteria and an increase in inflammatory responses can be observed (154, 155).

The separation of host and microorganism with a mucus layer is in part regulated by resident microorganisms. The mucus layer effectively separates luminal components, especially microorganisms, from the epithelium. The constant outgrowth of mucus pushes microorganisms out and provides a medium that concentrates antimicrobial elements such as antimicrobial

peptides and SIgA. In the small intestine, Muc2 mucin, the backbone of mucus in mice, requires bacterial cleavage of a proteolytic enzyme to detach mucin from secreting goblet cells; in the colon, "sentinel" goblet cells activated by bacterial components quickly respond by extruding and releasing an explosion of Muc2 (156, 157). Helminthes such as *Trichuris muris* can restore the Nod2-deficient abnormal goblet cells of mice through T_H2-mediated immunity, thereby inhibiting the colonization of pro-inflammatory *Bacteroides* species (158).

Localized protection is also achieved by disease tolerance. In the gut, *Bacteroides fragilis* affects systemic T-cell responses through the action of the bacterium-derived polysaccharide A, which protects against pathobiont *H. hepaticus* colitis *via* the production of anti-inflammatory IL-10 by CD4+ T cells and the promotion of regulatory T cells (159). Moreover, this protection has no effect on pathogen fitness or on population load in the intestine. SIgA can neutralize intracellular toxins and viruses, as well as directly suppress bacterial virulence mechanisms (133, 135).

In sum, resident microbiota can protect the host by locally inhibiting the establishment and growth of pathogens, mitigating pathogen-induced damage to the host, and preventing the spread of microbes to other sites. Local protection is ensured by mechanisms that are directly targeted against microorganisms or indirectly through the host immune system.

LONG-REACHING PROTECTION

We now turn to protective microbes that help the host from a distance, by either inducing systemic protection (that is, a protection realized in the entire organism) or protection at a particular remote site. In host-microbiota symbiosis, the habitat of the microbial communities is a changing and responsive living being. Since host microbial communities are connected by metacommunity dispersal and through the internal sensors and networks of the host, protective microbes can have potentially far-reaching and integrated consequences. A more comprehensive picture of protective microbes requires a global understanding of the ecological and physiological—e.g., metabolic, immune, and neuroendocrine—interactions.

However, our understanding of long-reaching protection is at its infancy. Whereas pathogens can migrate through the blood from one organ to another or travel across microenvironments within an organ system (160–162), there is little evidence that commensals can do the same. Here we review examples of long-reaching protection (see **Figure 5**).

Systemic Protection

The direct, host-independent systemic effects of microorganisms are poorly illustrated in the literature, and as far as we know, there are no mammalian examples where microorganisms

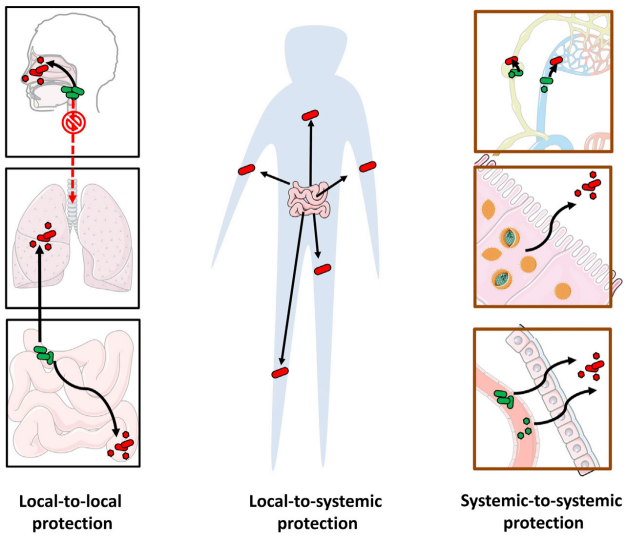


FIGURE 5 | Long-reaching microbe-conferred protection against pathogens. The multiple pathways of long-reaching protection include: local-to-local protection against pathogens at a distal site by protective microorganisms at another site (e.g., gut to lung, upper respiratory tract to lower respiratory tract, and small intestine to large intestine) (left), local-to-systemic protection from one site to pathogens across the body (e.g., systemic protection from gut microbiota) (center) and systemic-to-systemic protection by microorganisms that are distributed systemically (e.g., protective viruses or bacteria that circulate through the blood stream or the lymphatic system, or reside in multiple locations) (right).

can confer direct systemic protection across microhabitats. Nevertheless, the killing capacities of some microorganisms present promising therapeutic options as "live antibiotics." For example, the predatory proteobacteria *Bdellovibrio bacteriovorus*, when injected in a zebrafish model infected with *S. flexneri*, preys and eliminates the human pathogen in the whole animal (163).

Indirectly, however, the evidence is much more promising as microorganisms have far-reaching immunomodulatory effects on mucosal and systemic immunity (164, 165). Microbiota modulation of myeloid cells preconditions neutrophils induces macrophage killing capacities and calibrates macrophages and dendritic cell responsiveness to infections (166). Microbial-regulated hematopoiesis can fight against systemic infections such as *L. monocytogenes* (167). In a mice model, injection of chitin from the fungal commensal *S. cerevisiae* increases resistance to systemic infection with *C. albicans* by inducing monocyte activity *via* a fine modulation of TNF-α and IL-6 (168). Without the microbiota, mononuclear phagocytes fail to prime NK cells that normally trigger systemic antiviral immune responses in non-mucosal lymphoid organs (169). Recent studies show that maternal microbes shape offspring immunity before birth. Bacterial products in mothers induce genetic expression of antimicrobial peptides in offspring epithelium and shape the components of their innate immune systems (170) while dampening their adaptive immune responses (171). In fact, the success of vaccination (the injection of microbe-derived products in one site that protect against infections in another site) shows that long-distance immune protection is possible. For instance, the intranasal administration of a vaccine against HSV-1 induces production of specific antibodies in the genital tract (172).

While current evidence is still not clear-cut, it is nevertheless important to conceptually distinguish between various *origins* of systemic protection. In local-to-systemic protection, microorganisms at a single location, such as the gut microbiota, can confer protection through systemic immune responses or leave the local site and disseminate to other regions. In systemic-to-systemic protection, the protective microorganisms are already distributed systemically, exerting system-wide localized effects. In particular, we discuss how microbiota, their fragments, or by-products can reach distal sites through the host circulatory systems.

Local to Systemic Protection

Microbiota at one location can induce systemic colonization resistance in the host. Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria, where a fecal transplant from resistant mice transfers the resistance to germ-free mice by elevating humoral immune responses. The resistant gut microbiota are characterized by an increased abundance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* (173). In humans, gut microbe *E. coli* O86:B7 induces antibodies that target plasmodium sporozoites, conferring a protective cross-response against malaria transmission (174).

Systemic innate and adaptive immune responses to *Toxoplasma gondii* infection in humans rely on the indirect stimulation of dendritic cells by normal gut microflora (175). Several studies have shown that gut microbiota also have the potential to reduce systemic viral infection and disease (176). A clinical trial observed a positive effect of a *Lactobacillus* strain as an immune adjuvant for live-attenuated H3N2 influenza vaccine in healthy adults, with higher seroconversion rates in patients treated by probiotics (177), suggesting a non-specific immune response activation. In HIV infection, higher abundance of the gut Lactobacillales order in patients is positively associated with CD4+ T cell count and negatively associated with viral load, indicating that bacteria from Lactobacillales could in some direct or indirect way modulate the infectivity or pathology of HIV infection (178).

Finally, as a basal stimulant, bacteria can prime activation threshold of antiviral innate immunity against systemic viruses (179). Antibiotic-treated mice before lymphocytic choriomeningitis (LCMV) infection elicited an impaired innate and adaptive immune response to LCMV infection, and an increased mortality after influenza infection (179).

Systemic to Systemic Protection

Microbiota or its components that are normally distributed across the host system can also induce system-wide colonization resistance in the host. Recently, the idea that viruses can be mutualistic, and in particular can offer protection against pathogens, has gained popularity (180–182). A healthy human is infected by more than 10 permanent chronic systemic viruses, and this number may in fact be far higher (182). Two cases show that viruses induce in their hosts a higher basal immunity that explains normal immunity as well as responses to novel microbes. First, baseline activities can be upregulated and maintained by viruses in latent states, conferring protection against subsequent infections (176, 183). In mice, gammaherpesvirus 68 or murine cytomegalovirus (CMV) (which are models for the human pathogens Epstein–Barr virus and CMV, respectively) in dormancy confers symbiotic protection against bacterial infection to *L. monocytogenes* and *Y. pestis* in an antigen-independent way, involving interferon production and macrophages systemic activation (184, 185).

In a clinical study, HIV patients co-infected with non-pathogen GB flavivirus showed reduced mortality rate, suggesting the possibility of an inhibition of HIV replication due to this flavivirus (186). HIV replication was reproducibly inhibited in cultures of peripheral-blood mononuclear cells by GBV-C coinfection (187). Patients with GBV-C infection present an increased proportion of naive T cells and a reduction in T-cell activation and proliferation that could increase disease tolerance and finally the survival among HIV infected individuals co-infected with GBV-C (188).

Circulations and Protective Effects

It is generally assumed that microorganisms are pathogenic when spread throughout the system while non-pathogens are contained within the gut and lung lumens and outside of skin surfaces. Indeed, bacteremia and endotoxemia, i.e., the spreading of bacteria or bacterial structural components through blood circulation, respectively, are usually pathological. For instance, intra-uterine infection during pregnancy in mice can be caused

by pathogens that do not belong to vaginal microflora, but to oral microorganisms *via* hematogenous transmission (189).

However, non-pathological, physiological blood circulation of microorganisms or microbial fragments occurs in healthy subjects (190–192). Substantial numbers of live gut species have also recently been found living in the mesenteric lymph nodes and systemic lymphoid organs under normal situations (164). In this section, we thus consider the possibility that circulation of bacteria or their metabolic compounds can constitute a long-reaching route of protection. Even though a long-reaching seeding through the bloodstream and lymphatic systems has never been demonstrated, it is a possible route protective microbes could take.

The involvement of circulating long-reaching mechanisms in host protection is only a hypothesis at this stage, but investigating this potential long-reaching influence undoubtedly constitutes a very promising avenue for future research, paving the way to targeted experiments.

Bacteremia and Endotoxemia

Bacteremia is the dissemination of bacteria into the circulatory system. Under normal conditions, Gram-negative bacteria in the gut can disseminate systemically, inducing system-wide production of IgG that provide cross-protection against Gram-negative bacteria infections such as *E. coli* and *Salmonella* (193).

Recent data suggest a long-distance disease tolerance by challenge-induced translocation of gut microbiota to multiple distal sites. In mice, infection with the respiratory pathogen *B. thailandensis* (intranasally) or with the pathogen *S.* Typhimurium (orally) leads to skeletal muscle wasting. Gut commensal *E. coli* O21:H+ antagonizes muscle wasting during these infections, with no changes in inflammation profile but sustained insulin-like growth factor 1 signaling in skeletal muscle. This protection was associated with the translocation of *E. coli* O21:H+ from the intestine to white adipose tissue and occurred without a negative impact on *B. thailandensis* or *S.* Typhimurium fitness. This beneficial effect promoted both the health of the host and fitness of *E. coli* O21:H+ (194).

Endotoxemia occurs when bacterial by-products circulate into the bloodstream. It has long been known that circulating lipopolysaccharides, a membrane component of Gram-negative bacteria, has potentially beneficial immunomodulatory effects (195). Lipopolysaccharides endotoxemia is increased by nutritional factors (196) and modulated by changes in gut microbiota (197). The mechanisms of host-mediated modulation of bacteremia and endotoxemia (primarily of lipopolysaccharides) are currently being explored under the context of high-fat intake or obesity, which weaken gut integrity leading to increased penetration of gut microbes or their products into the circulation. The uptake and transportation of lipopolysaccharides is active, reaching from the gut to distant tissues like adipose tissue. After lipoprotein binding and transportation to the lymph and across endothelial barriers, they interact with macrophages and trigger the secretion of pro-inflammatory cytokines (198).

Microbiota-derived peptidoglycan translocated from the gut to neutrophils in the bone marrow systemically primes the innate immune system, enhancing the elimination of two major pathogens, *S. pneumoniae* and *S. aureus via* the pattern recognition receptor nucleotide-binding, oligomerization domain-containing protein-1 (199).

Finally, another active long-reaching route is the gut–liver axis, where influx of microbial molecules derived from genetic inflammasome deficiency-associated dysbiosis, passing in portal circulation, can trigger liver inflammation through TLR4 and TLR9 activation. In the case of preexisting lipid accumulation in hepatocytes, this mechanism could lead to non-alcoholic steatohepatitis (200).

Metabolic Compounds

Naïve mass spectrometry-based metabolomics studies comparing blood metabolic profiles between germ-free mice and conventional animals show a drastically different blood metabolic profile, with a drug-like metabolic response of the host to metabolites (i.e., degradation of xenobiotic molecules by host's enzymes) generated by the microbiome (201).

Gut microbiota produce and regulate multiple compounds that can reach distant organs *via* systemic circulation, and influence host physiology (202). More precisely, metabolic compounds produced or transformed by gut microbiota may modulate host immunity in distant sites. In particular, short chain fatty acids, especially butyrate, seem to exert broad anti-inflammatory activities by affecting immune cell migration, adhesion, cytokine expression, as well as cellular proliferation, activation, and apoptosis through the activation of signaling pathways (NF-κB) and inhibition of histone deacetylase (203). Moreover, epithelial permeability can be modulated by the microbiota: blood-brain barrier permeability is increased in germ-free mice and reintroduction of a healthy microbiota, of short chain fatty acids producing bacteria or direct short chain fatty acids administration can reverse this effect, up-regulating tight junction proteins expression (204). This mechanism could be involved at the host-environment interface, modulating pathogen susceptibility.

Fungi could also play a crucial role in long-reaching immune modulation. Digestive *Candida*-produced prostaglandin E2, an active lipid compound with hormone-like effects, can reach the lungs through the bloodstream, act on lung macrophages and promote allergic inflammation, thus suggesting a hypothetical long-reaching route that could be protective (205).

Local to Local Protection

Some studies suggest that local microbiota could modulate distant local conditions, which may confer long-term protection to the host. On the one hand, few studies have highlighted a long-reaching protective role of specific local microbiota to specific local sites, and with poor mechanistic understanding. On the other hand, many papers have brought out various mechanisms that could involve distant modulations of immune conditions, but without a protective effect. Time has perhaps come to combine these approaches, to determine how the microbiota located in a given organ could have a protective effect on another organ (i.e., a local-to-local protection, but without a demonstrated systemic effect). Even though in some cases, later evidence might show that a local-to-local effect is actually a local-to-systemic effect, the conceptual distinction between a highly targeted mechanism

versus a system-wide mechanism can guide research questions about the underlying mechanisms and the scope of protective effects. We explore two possible routes of long-reaching protection: the host-mediated gut–lung axis and direct interactions down the respiratory and gastrointestinal tracts.

Indirect, Immune-Mediated Protection along the Gut–Lung Axis

To the best of our knowledge, the only explicit long-reaching protective effects from one local site to another described in the literature are the immune-mediated relation between the gut microbiota and lung infections (203, 206). *Klebsiella pneumoniae* lung infection has been extensively studied as a model of pulmonary infection. Germ-free mice infected with *K. pneumoniae* are drastically susceptible to bacterial infection in an IL-10-dependent manner, with an increase of bacterial growth and dissemination. Interestingly, activating microbial pattern recognition receptors helps fight against *K. pneumoniae* infection in the lungs (207, 208). Another example is tuberculosis. *Helicobacter pylori* infection is suspected to modify the clinical outcomes of *M. tuberculosis* infection, with the presence of *H. pylori* associated with a lower rate of tuberculosis infection (209), but increased tuberculosis severity (210). In this case, a microbe at one location (*H. pylori* in the stomach) could modulate long-distance immunity at yet another location (in the lungs) in response to infection.

Antibiotic-treated mice exhibit impaired innate and adaptive mucosal immune responses to influenza infection, with increased damages and host mortality (179). A decrease in the number of gut commensals *via* treatment with a broad-spectrum antibiotic resulted in blunted T-cell and B-cell responses to an intranasal infection with the A/PR8 strain of influenza (211). Activation of Toll-like receptors restored the immune response in antibiotic-treated mice through inflammasome-mediated induction of interleukins such as IL-1β and IL-18. The authors suggest that either the microbial products can diffuse systemically, or activation of the inflammasome does not need to occur at the site of infection.

In an *E. coli* pneumonia model, antibiotic depletion of commensals in mice also causes a drastic bacterial burden both in lungs and blood, with a significant increase of mortality. Lipopolysaccharides supplementation during antibiotherapy reversed these effects, suggesting a distal action of commensal microbes through toll-like receptors (212). Deleterious effects of antibiotic depletion have been shown in a mouse model of *Streptococcus pneumoniae* infection, reversed by fecal microbiota transplantations that enhance macrophage functions in the primary alveolar (213).

Gut microbiota also play a role in expanding and maintaining viral-specific memory T-cell populations in the lungs. In a mouse model of MCMV-associated lung disease, the frequency of virus-specific $CD8^+$ T cells in the MCMV-infected lungs of germ-free mice was restored by fecal bacteria from specific pathogen-free mice, likely through cross-activity between gut microbiota peptides and epitopes of MCMV-specific memory T cells (214).

Furthermore, mice challenged with pulmonary staphylococcal infection but lacking segmented filamentous bacteria in their gut microbiota showed more severe infection with higher bacterial load and mortality, associated with diminished lung concentration of Th17 immune effector cells. Reintroduction of segmented filamentous bacteria was sufficient to restore protective effect (215). Antibiotics also significantly decreased lung Th17 cell numbers during pulmonary acute fungal infection, restored by segmented filamentous bacteria colonization (216).

Direct, Ecological Protection through Digestive Flows and Air Circulations

Even though direct and host-mediated causes of microbial protection are oftentimes difficult to distinguish and intertwined at a local scale, the direct versus indirect distinction can help identify ecological versus physiological routes of influence at a global scale. Current evidence indicates that long-distance protection is mostly mediated by the host, but ecological routes are also available when we consider the way fluids and air flow through the host. Many organs are interconnected through airways and liquid channels. We hypothesize microbe-induced protection of downstream conditions in the respiratory tract and the gastrointestinal tract.

The respiratory tract ecosystem consists of the upper and lower respiratory tracts, with the latter further divided into trachea, bronchi, and bronchioles. The gastrointestinal tract ecosystem is divided into the stomach, small intestine, and large intestine, with secretions that come from associated organs such as the gall bladder, liver, and pancreas. It is possible that microbial communities in one patch of the lung and gut meta-communities can protect the host by influencing the entry and growth of pathogens in a downstream patch.

Bronchoalveolar lavage fluid samples of the lungs reveal a substantial microbiota community with multi-kingdom interactions due to air-borne fungi (217). The oral microbiota are the physiological source of lower respiratory tract microorganisms, predominately acquired through microaspiration and especially during sleep (218). It is also the source of disease-inducing pathogens in the lungs, especially pneumonia and cystic fibrosis. The sampled microorganisms of a healthy lung consist primarily of transitory populations determined by a steady balance of incoming migration and outgoing expulsion through physiological clearance or immune responses. In disease states, such as cystic fibrosis, regional growth conditions support the settled colonization and expansion of microbial communities (219, 220). The respiratory tract ecosystem is thus an excellent example of dominance in dispersal processes over processes of establishment and growth, similar to the metacommunity principles governing islands (220–224).

Microbial communities in the upper respiratory tract (e.g., oral cavity) are likely to confer resistance against the colonization and growth of pathogens in the lower respiratory tract. There is an association between oral dysbiosis and lower respiratory tract infections such as pneumonia. The absence of normal residents in the upper respiratory tract may thus contribute to the overwhelming migration of residential or opportunistic pathogens to the lower respiratory tract (225). Pathogen "blooms" in the lower respiratory tract generally occur under two conditions: when there is a positive influx of microorganisms over those eliminated

or when altered local conditions favor pathogenic growth [see adapted island biogeography model in Ref. (223), and review in Ref. (224)]. We thus suspect that a loss of colonization resistance of upper respiratory tract residential microbiota may be the reason for lower respiratory tract microbial establishment and growth, resulting in disease.

Another possible downstream protective effect is in the gastrointestinal tract. The habitat of the gastrointestinal tract is similar to a river ecosystem (226). The intestine receives inputs from the source (nutrients and acids from the stomach) and associated organs (liver, gall bladder, and pancreas) and the flow slows down at the colon, which is dominated by greater bacterial loads and the accumulated nutrients and metabolites from upstream.

Secondary bile acids inhibit the germination and growth of *C. difficile* in the colon. Bile acids are released and mostly reabsorbed upstream in the small intestine, decreasing greatly in concentration further downstream (227, 228). However, small intestinal microbiota can inhibit re-absorption by deconjugating bile acids, thus promoting their excretion down and out of the large intestine (229). Downstream secondary bile acids in the colon can thus depend on upstream commensals. Indeed, antibiotic treatment that decreases colonization resistance against *C. difficile* also decreases bile acid amounts in fecal matter (64), which are both restored by fecal matter transfer (65). Upstream commensals can thus possibly protect the host from downstream pathogenic growth by releasing metabolite inhibitors.

Microbes can protect the host by regulating the migration flows between the lung "island" communities and by influencing "downstream" communities in the gut. The analogy between lung and gut ecosystems to island and river ecosystems, respectively, point to new perspectives. These are clearly local-to-local effects, although not necessarily organ-to-organ effects (they concern "subparts" of organs rather than organs *per se*). Yet they point to the possibility of organ-to-organ protective effects, and offer insights about how these effects could be investigated in the future. It is worth investigating whether migrations between other sites, for instance, the upper respiratory tract and the stomach (218), or direct dispersal between oral and vaginal microbiota *via* sexual behavior, also exhibit upstream-to-downstream colonization resistance against infections.

CONCLUDING REMARKS AND PERSPECTIVES

Previous studies have focused on the local colonization resistance conferred by microorganisms at various sites within the host. Here we examined protective effects beyond colonization resistance through both direct and indirect modes of protection. We highlighted how common types of ecological interactions give rise to the resistance and tolerance against harmful microorganisms as well as the containment of microorganisms, and how the innate and adaptive immune systems are activated by protective microbes, leading to resistance, tolerance, or containment toward pathobionts and pathogens. A better understanding of the range, mode, and effects of microbiota-mediated protection is crucial for therapeutic designs (**Box 4**). Although evidence for long-reaching microbe-conferred protection is scarce, we examined possible ways protective microbes can reach beyond their local sites, in part by investigating how pathogens spread their influence across the host.

Why is there so little evidence for long-reaching microbial protection? First, evidence for long-reaching protection is limited in part because microbiome research is still in its infancy. Therefore, despite growing interest in "protective microbes," only very few detailed studies are available. Second, many protective mechanisms are localized actions. Classical dose-dependent toxicological effects (for instance, bacteriocin production) are unlikely to be involved in long-reaching mechanisms, as dilution volume is considerably higher in comparison with the production of local compounds. Third, technical limitations likely result in the underestimation of long-reaching protective microbes. Long-reaching effects rely probably more on low or even very low concentration mechanisms, with threshold effects (i.e., quorum-sensing molecules) that are extremely difficult to identify with classical shotgun metabolomics studies, thus requiring targeted studies. Another difficulty is the transitory release of long-reaching microbes and signals. For instance, bacteremia or fungaemia are brief events that are difficult to detect. Last, there are very few within-host ecological analyses in animal models. Yet the processes that regulate lung microbiota, for instance, show that we cannot understand respiratory disease without a dynamic ecological point of view.

We suggest a form of "co-immunity" between the host and microbiota. The host is protected against pathogens both by its own immune system and by the direct or indirect action of microorganisms, not only at a local scale but also between local communities and systemically.

It is generally assumed that immunity is the immunity of *one* organism, and that this immunity is bounded by the conventional frontiers of that organism (e.g., its skin). Yet it is now well-established that several immune phenomena transcend the boundaries of organisms (234). We suggest considering all these phenomena as instances of a more general process that we dub "co-immunity" (see also **Box 2**). We define co-immunity as a form of immune defense associating components of several organisms (it is, therefore, a "multi-organism" or "cross-organism" immunity). Co-immunity can include the protection of the young

BOX 4 | Clinical perspectives about microbiota-mediated immunity.

Clinical trials can be designed in two ways to test for the therapeutic effects of protective microorganisms: either look for yet unknown properties of well-known *in vivo* probiotics, or test the clinical effects of candidate microorganisms found in *in vitro* or animal models. Such trials are already underway. Based on *in vitro* studies of isolated oral commensals (230), a trial is designed to test the efficacy of oral probiotics to prevent ventilator-associated pneumonia (231). A pilot study has been conducted to test the tolerance of a nasal probiotic spray against upper respiratory tract infections (232). Microbe-conferred protection is important for host health and, as we have reviewed, can vary in range, mode, and effects. However, such protection may come at a cost for the host. Careful screening of not just protective effects but also of potentially harmful properties and long-term side effects are crucial, as well-known probiotics can exhibit genotoxicity (233) as well as inflammatory diseases and tumors (145).

by maternal antibodies (235), microbiota-mediated immunity (as detailed in the present review), but also population-level phenomena such as social immunity in insects (236), and "herd immunity" (in particular through vaccination) (237, 238) in humans and cattle.

Rohwer and colleagues use the term "non-host derived immunity" to describe bacteriophage-mediated immunity (98). But this term also applies to immunity mediated by other components of the microbiota (not just bacteriophages) and, even more importantly, all these correspond to subcases of the wider category of what we call here "co-immunity." This broad perspective helps us realize that the idea that immunity can transcend traditional boundaries of organisms is not as surprising as it might seem at first sight and is in fact certainly a widespread phenomenon in nature.

At the same time, the concept of co-immunity opens up many fascinating questions. One key question is to determine in which circumstances conflicts may arise between different components, and whether these conflicts are regulated. A microorganism that was protective at one moment can become detrimental to the host at another moment, for instance, in immunocompromised states (239). Similarly, maternal antibodies are generally protective for the infant, but they can inhibit the infant's response to vaccination (240). Overall, a crucial advantage of the concept of co-immunity is that it reminds us that immunity should always be understood as a multi-actor and dynamic phenomenon.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LC and TB contributed equally to this paper. LC, TB, MT, LD, TS, and TP constituted all together the bibliography. LC, TB, and TP wrote the paper, which was substantially revised by MT, LD, and TS. LC was the primary author of the figures in this paper, with input and discussion from the other authors, especially TB and TP. TB was the main contributor to the clinical aspects. TP designed the project and managed the group.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Samuel Alizon, Silvia Bulgheresi, Nadine Cerf-Bensussan, Gérard Eberl, lvo Gomperts Boneca, Akiko Iwasaki, Bruno Lemaitre, Sarkis Mazmanian, Carmen Lía Murall, Philippe Sansonetti, Tz-Ching Yeh, and the ImmunoConcept lab for comments and suggestions. Parts of the figures were adapted with changes from Servier Medical Art (http://smart.servier.com/), licensed under Creative Commons Attribution 3.0 Unported.

FUNDING

TP and LC have received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme—grant agreement no. 637647—IDEM.

REFERENCES

1. Eberl G. Immunity by equilibrium. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:524–32. doi:10.1038/nri.2016.75
2. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* (2009) 9:313–23. doi:10.1038/nri2515
3. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* (2001) 292:1115–8. doi:10.1126/science.1058709
4. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* (2012) 336:1268–73. doi:10.1126/science.1223490
5. Shi Y, Mu L. An expanding stage for commensal microbes in host immune regulation. *Cell Mol Immunol* (2017) 14:339–48. doi:10.1038/cmi.2016.64
6. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* (2014) 157:121–41. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011
7. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* (2013) 11:227–38. doi:10.1038/nrmicro2974
8. Abt MC, Pamer EG. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. *Curr Opin Immunol* (2014) 29:16–22. doi:10.1016/j.coi.2014.03.003
9. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* (2013) 13:790–801. doi:10.1038/nri3535
10. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* (2013) 14:685–90. doi:10.1038/ni.2608
11. McKenney PT, Pamer EG. From hype to hope: the gut microbiota in enteric infectious disease. *Cell* (2015) 163:1326–32. doi:10.1016/j.cell.2015.11.032
12. Sassone-Corsi M, Raffatellu M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol* (2015) 194:4081–7. doi:10.4049/jimmunol.1403169
13. Ubeda C, Djukovic A, Isaac S. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clin Transl Immunology* (2017) 6:e128. doi:10.1038/cti.2017.2
14. Brandl K, Plitas G, Mihu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature* (2008) 455:804–7. doi:10.1038/nature07250
15. Masson F, Lemaitre B. Symbiosis: protection from within. *Elife* (2017) 6:e24111. doi:10.7554/eLife.24111
16. Oldroyd GED. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* (2013) 11:252–63. doi:10.1038/nrmicro2990
17. Pamer EG. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science* (2016) 352:535–8. doi:10.1126/science.aad9382
18. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology* (2013) 138:1–11. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03616.x
19. Stecher B, Berry D, Loy A. Colonization resistance and microbial ecophysiology: using gnotobiotic mouse models and single-cell technology to explore the intestinal jungle. *FEMS Microbiol Rev* (2013) 37:793–829. doi:10.1111/1574-6976.12024
20. Ashburner FM, Mushin R. Experimental intestinal coliform infections in mice. *J Hyg (Lond)* (1962) 60:175–81. doi:10.1017/S0022172400039449
21. Bohnhoff M, Drake BL, Miller CP. Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. *Proc Soc Exp Biol Med* (1954) 86:132–7. doi:10.3181/00379727-86-21030
22. Freter R. The fatal enteric cholera infection in the guinea pig, achieved by inhibition of normal enteric flora. *J Infect Dis* (1955) 97:57–65. doi:10.1093/infdis/97.1.57
23. Freter R. Experimental enteric *Shigella* and *Vibrio* infections in mice and guinea pigs. *J Exp Med* (1956) 104:411–8. doi:10.1084/jem.104.3.411
24. Mushin R, Dubos R. Colonization of the mouse intestine with *Escherichia coli*. *J Exp Med* (1965) 122:745–57. doi:10.1084/jem.122.4.745

25. van der Waaij D, Vries JMB, der Wees JECL. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)* (1971) 69:405–11. doi:10.1017/S0022172400021653
26. Benveniste J, Lespinats G, Adam C, Salomon J-C. Immunoglobulins in intact, immunized, and contaminated axenic mice: study of serum IgA. *J Immunol* (1971) 107:1647–55.
27. Fubara ES, Freter R. Availability of locally synthesized and systemic antibodies in the intestine. *Infect Immun* (1972) 6:965–81.
28. Freter R. Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* (1974) 27:1409–16.
29. Rolfe RD. Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host. *Rev Infect Dis* (1984) 6:S73–9. doi:10.1093/clinids/6.Supplement_1.S73
30. Berg RD, Owens WE. Inhibition of translocation of viable *Escherichia coli* from the gastrointestinal tract of mice by bacterial antagonism. *Infect Immun* (1979) 25:820–7.
31. Freter R, Abrams GD. Function of various intestinal bacteria in converting germfree mice to the normal state. *Infect Immun* (1972) 6:119–26.
32. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* (1977) 31:107–33. doi:10.1146/annurev.mi.31.100177.000543
33. Walker WA. Host defense mechanisms in the gastrointestinal tract. *Pediatrics* (1976) 57:901–16.
34. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* (1999) 69:1046s–51s.
35. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal α-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* (2000) 1:113–8. doi:10.1038/77783
36. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* (2000) 288:2222–6. doi:10.1126/science.288.5474.2222
37. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) 99:15451–5. doi:10.1073/pnas.202604299
38. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* (2006) 313:1126–30. doi:10.1126/science.1127119
39. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* (2006) 24:677–88. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002
40. Soares MP, Teixeira L, Moita LF. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:83–96. doi:10.1038/nri.2016.136
41. Tomkovich S, Jobin C. Microbiota and host immune responses: a love-hate relationship. *Immunology* (2016) 147:1–10. doi:10.1111/imm.12538
42. Laurent P, Jolivel V, Manicki P, Chiu L, Contin-Bordes C, Truchetet M-E, et al. Immune-mediated repair: a matter of plasticity. *Front Immunol* (2017) 8:454. doi:10.3389/fimmu.2017.00454
43. Brugiroux S, Beutler M, Pfann C, Garzetti D, Ruscheweyh H-J, Ring D, et al. Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Microbiol* (2016) 2:16215. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.215
44. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* (2015) 517:205–8. doi:10.1038/nature13828
45. Spees AM, Lopez CA, Kingsbury DD, Winter SE, Baumler AJ. Colonization resistance: battle of the bugs or ménage a trois with the host? *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003730. doi:10.1371/journal.ppat.1003730
46. Stecher B, Hardt W-D. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol* (2011) 14:82–91. doi:10.1016/j.mib.2010.10.003
47. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* (2010) 8:15–25. doi:10.1038/nrmicro2259
48. Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB, Raffa KF, Handelsman J. Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu Rev Microbiol* (2008) 62:375–401. doi:10.1146/annurev.micro.030608.101423
49. Ruhe ZC, Low DA, Hayes CS. Bacterial contact-dependent growth inhibition. *Trends Microbiol* (2013) 21:230–7. doi:10.1016/j.tim.2013.02.003
50. Becattini S, Littmann ER, Carter RA, Kim SG, Morjaria SM, Ling L, et al. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* (2017) 214:1973–89. doi:10.1084/jem.20170495
51. Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, Edwards RA, Ochoa RJ, Contreras H, et al. Probiotic bacteria reduce *Salmonella* Typhimurium intestinal colonization by competing for iron. *Cell Host Microbe* (2013) 14:26–37. doi:10.1016/j.chom.2013.06.007
52. Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T. Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* (2013) 8:e53957. doi:10.1371/journal.pone.0053957
53. Sassone-Corsi M, Nuccio S-P, Liu H, Hernandez D, Vu CT, Takahashi AA, et al. Microcins mediate competition among *Enterobacteriaceae* in the inflamed gut. *Nature* (2016) 540:280–3. doi:10.1038/nature20557
54. Schamberger GP, Diez-Gonzalez F. Selection of recently isolated colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* (2002) 65:1381–7. doi:10.4315/0362-028X-65.9.1381
55. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* (2016) 535:511–6. doi:10.1038/nature18634
56. Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, et al. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian GI tract. *Nature* (2015) 526:719–22. doi:10.1038/nature15524
57. Rea MC, Sit CS, Clayton E, O'Connor PM, Whittal RM, Zheng J, et al. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:9352–7. doi:10.1073/pnas.0913554107
58. Rea MC, Dobson A, O'Sullivan O, Crispie F, Fouhy F, Cotter PD, et al. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:4639–44. doi:10.1073/pnas.1001224107
59. Sutyak Noll K, Prichard MN, Khaykin A, Sinko PJ, Chikindas ML. The natural antimicrobial peptide subtilosin acts synergistically with glycerol monolaurate, lauric arginate, and ε-poly-L-lysine against bacterial vaginosis-associated pathogens but not human *Lactobacilli*. *Antimicrob Agents Chemother* (2012) 56:1756–61. doi:10.1128/AAC.05861-11
60. Cogen AL, Yamasaki K, Muto J, Sanchez KM, Crotty Alexander L, Tanios J, et al. *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulin-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PLoS One* (2010) 5:e8557. doi:10.1371/journal.pone.0008557
61. Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Dorschner RA, Lai Y, MacLeod DT, et al. Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol* (2010) 130:192–200. doi:10.1038/jid.2009.243
62. Crost EH, Pujol A, Ladiré M, Dabard J, Raibaud P, Carlier JP, et al. Production of an antibacterial substance in the digestive tract involved in colonization-resistance against *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* (2010) 16:597–603. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.06.009
63. Shin R, Suzuki M, Morishita Y. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Med Microbiol* (2002) 51:201–6. doi:10.1099/0022-1317-51-3-201
64. Theriot CM, Bowman AA, Young VB. Antibiotic-induced alterations of the gut microbiota alter secondary bile acid production and allow for *Clostridium difficile* spore germination and outgrowth in the large intestine. *mSphere* (2016) 1:e00045-15. doi:10.1128/mSphere.00045-15
65. Weingarden AR, Dosa PI, DeWinter E, Steer CJ, Shaughnessy MK, Johnson JR, et al. Changes in colonic bile acid composition following fecal microbiota transplantation are sufficient to control *Clostridium difficile* germination and growth. *PLoS One* (2016) 11:e0147210. doi:10.1371/journal.pone.0147210
66. Britton RA, Young VB. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology* (2014) 146:1547–53. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.059
67. Chatzidaki-Livanis M, Geva-Zatorsky N, Comstock LE. *Bacteroides fragilis* type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to

antagonize human gut *Bacteroidales* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113:3627–32. doi:10.1073/pnas.1522510113
68. Wexler AG, Bao Y, Whitney JC, Bobay L-M, Xavier JB, Schofield WB, et al. Human symbionts inject and neutralize antibacterial toxins to persist in the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113:3639–44. doi:10.1073/pnas.1525637113
69. Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M. Characterization of intestinal *Lactobacilli* as putative probiotic candidates. *J Appl Microbiol* (2003) 94:403–12. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01847.x
70. Mishra C, Lambert J. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pac J Clin Nutr* (1996) 5:20–4.
71. Danielsson D, Teigen PK, Moi H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. *Ann N Y Acad Sci* (2011) 1230:48–58. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06041.x
72. Shu M, Wang Y, Yu J, Kuo S, Coda A, Jiang Y, et al. Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* (2013) 8:e55380. doi:10.1371/journal.pone.0055380
73. Altier C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* (2005) 43:85–92.
74. Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman MM, Carey KE. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun* (1983) 39:686–703.
75. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* (2010) 465:346–9. doi:10.1038/nature09074
76. Vandecandelaere I, Depuydt P, Nelis HJ, Coenye T. Protease production by *Staphylococcus epidermidis* and its effect on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pathog Dis* (2014) 70:321–31. doi:10.1111/2049-632X.12133
77. Wu C-C, Lin C-T, Wu C-Y, Peng W-S, Lee M-J, Tsai Y-C. Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol Oral Microbiol* (2015) 30:16–26. doi:10.1111/omi.12063
78. Melo TA, dos Santos TF, de Almeida ME, Junior LAGF, Andrade EF, Rezende RP, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol* (2016) 16:250. doi:10.1186/s12866-016-0871-8
79. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell* (2006) 125:237–46. doi:10.1016/j.cell.2006.04.001
80. Davis MF, Baron P, Price LB, Williams DL, Jeyaseelan S, Hambleton IR, et al. Dry collection and culture methods for recovery of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from indoor home environments. *Appl Environ Microbiol* (2012) 78:2474–6. doi:10.1128/AEM.06886-11
81. Cotar A, Ionescu B, Pelinescu D, Voidarou C, Lazar V, Bezirtzoglou E, et al. Current solutions for the interception of quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Curr Org Chem* (2013) 17:97–104. doi:10.2174/1385272811317020004
82. Algburi A, Zehm S, Netrebov V, Bren AB, Chistyakov V, Chikindas ML. Subtilosin prevents biofilm formation by inhibiting bacterial quorum sensing. *Probiotics Antimicrob Proteins* (2017) 9:81–90. doi:10.1007/s12602-016-9242-x
83. Irie Y, O'Toole GA, Yuk MH. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* (2005) 250:237–43. doi:10.1016/j.femsle.2005.07.012
84. Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, et al. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103:12558–63. doi:10.1073/pnas.0605399103
85. Sambanthamoorthy K, Feng X, Patel R, Patel S, Paranavitana C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from *Lactobacilli* against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol* (2014) 14:197. doi:10.1186/1471-2180-14-197
86. Shokouhfard M, Kermanshahi RK, Shahandashti RV, Feizabadi MM, Teimourian S. The inhibitory effect of a *Lactobacillus acidophilus* derived biosurfactant on biofilm producer *Serratia marcescens*. *Iran J Basic Med Sci* (2015) 18:1001–7.
87. Kinnunen M, Dechesne A, Proctor C, Hammes F, Johnson D, Quintela-Baluja M, et al. A conceptual framework for invasion in microbial communities. *ISME J* (2016) 10:2773–9. doi:10.1038/ismej.2016.75
88. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol* (2006) 296:149–61. doi:10.1016/j.ijmm.2006.02.005
89. Murall CL, Abbate JL, Puelma Touzel M, Allen-Vercoe E, Alizon S, Froissart R, et al. Invasions of host-associated microbiome networks. In: Bohan DA, Dumbrell AJ, Massol F, editors. *Networks of Invasion: Empirical Evidence and Case Studies*. Oxford: Elsevier (2017). p. 201–81.
90. Mallon CA, van Elsas JD, Salles JF. Microbial invasions: the process, patterns, and mechanisms. *Trends Microbiol* (2015) 23:719–29. doi:10.1016/j.tim.2015.07.013
91. Levine JM, Adler PB, Yelenik SG. A meta-analysis of biotic resistance to exotic plant invasions: biotic resistance to plant invasion. *Ecol Lett* (2004) 7:975–89. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00657.x
92. Catford JA, Jansson R, Nilsson C. Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. *Divers Distrib* (2009) 15:22–40. doi:10.1111/j.1472-4642.2008.00521.x
93. Blackburn TM, Pyšek P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jarošík V, et al. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends Ecol Evol* (2011) 26:333–9. doi:10.1016/j.tree.2011.03.023
94. Brenchley JM, Douek DC. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol* (2012) 30:149–73. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075001
95. Bron PA, Kleerebezem M, Brummer R-J, Cani PD, Mercenier A, MacDonald TT, et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br J Nutr* (2017) 117:93–107. doi:10.1017/S0007114516004037
96. Gill N, Wlodarska M, Finlay BB. Roadblocks in the gut: barriers to enteric infection. *Cell Microbiol* (2011) 13:660–9. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01578.x
97. Wootton L. Phage biology: a new barrier at mucosal surfaces. *Nat Rev Microbiol* (2013) 11:430–1. doi:10.1038/nrmicro3064
98. Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:10771–6. doi:10.1073/pnas.1305923110
99. Martins FS, Vieira AT, Elian SDA, Arantes RME, Tiago FCP, Sousa LP, et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes Infect* (2013) 15:270–9. doi:10.1016/j.micinf.2012.12.007
100. Botes M, Loos B, van Reenen CA, Dicks LMT. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch Microbiol* (2008) 190:573–84. doi:10.1007/s00203-008-0408-0
101. Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2004) 40:223–9. doi:10.1016/S0928-8244(03)00368-7
102. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* (1999) 276:G941–50.
103. Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol* (1999) 26:137–42. doi:10.1111/j.1574-695X.1999.tb01381.x
104. Walsham ADS, MacKenzie DA, Cook V, Wemyss-Holden S, Hews CL, Juge N, et al. *Lactobacillus reuteri* inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to human intestinal epithelium. *Front Microbiol* (2016) 7:244. doi:10.3389/fmicb.2016.00244
105. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, et al. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* (2006) 72:946–9. doi:10.1128/AEM.72.1.946-949.2006
106. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* (2011) 469:543–9. doi:10.1038/nature09646
107. Ayres JS. Cooperative microbial tolerance behaviors in host-microbiota mutualism. *Cell* (2016) 165:1323–31. doi:10.1016/j.cell.2016.05.049
108. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science* (2012) 335:936–41. doi:10.1126/science.1214935
109. Schneider DS, Ayres JS. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:889–95. doi:10.1038/nri2432

110. Råberg L, Sim D, Read AF. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science* (2007) 318:812–4. doi:10.1126/science.1148526
111. de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, Martin C. Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* (2009) 77:783–90. doi:10.1128/IAI.01048-08
112. Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods* (2008) 73:125–32. doi:10.1016/j.mimet.2008.01.014
113. Hsiao A, Ahmed AMS, Subramanian S, Griffin NW, Drewry LL, Petri WA, et al. Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature* (2014) 515:423–6. doi:10.1038/nature13738
114. Kolling GL, Wu M, Warren CA, Durmaz E, Klaenhammer TR, Timko MP, et al. Lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* alters *Clostridium difficile* infection and in vitro Toxin A production. *Gut Microbes* (2012) 3:523–9. doi:10.4161/gmic.21757
115. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Probiotic *Bifidobacteria* protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* (2004) 72:2240–7. doi:10.1128/IAI.72.4.2240-2247.2004
116. Ripert G, Racedo SM, Elie A-M, Jacquot C, Bressollier P, Urdaci MC. Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain o/c inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrob Agents Chemother* (2016) 60:3445–54. doi:10.1128/AAC.02815-15
117. Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* (1999) 67:302–7.
118. Valdés-Varela L, Hernández-Barranco AM, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M. Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* growth and toxicity when co-cultured in different prebiotic substrates. *Front Microbiol* (2016) 7:738. doi:10.3389/fmicb.2016.00738
119. Valdés-Varela L, Alonso-Guervos M, García-Suárez O, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Screening of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* able to antagonize the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* upon intestinal epithelial HT29 monolayer. *Front Microbiol* (2016) 7:577. doi:10.3389/fmicb.2016.00577
120. Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* (2008) 456:507–10. doi:10.1038/nature07450
121. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* (2005) 122:107–18. doi:10.1016/j.cell.2005.05.007
122. Pradeu T. A mixed self: the role of symbiosis in development. *Biol Theory* (2011) 6:80–8. doi:10.1007/s13752-011-0011-5
123. Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity* (2017) 46:562–76. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008
124. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* (2011) 9:356–68. doi:10.1038/nrmicro2546
125. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:503–16. doi:10.1038/nri3228
126. Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, et al. *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect* (2006) 8:2195–205. doi:10.1016/j.micinf.2006.04.001
127. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology* (2003) 4:269–73. doi:10.1038/ni888
128. Franzenburg S, Walter J, Künzel S, Wang J, Baines JF, Bosch TCG, et al. Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:E3730–8. doi:10.1073/pnas.1304960110
129. Salzman NH. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* (2010) 1:401–6. doi:10.4161/gmic.1.6.14076
130. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:20858–63. doi:10.1073/pnas.0808723105
131. Macpherson AJ, Köller Y, McCoy KD. The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA. *Trends Immunol* (2015) 36:460–70. doi:10.1016/j.it.2015.06.006
132. Macpherson AJ, Geuking MB, Slack E, Hapfelmeier S, McCoy KD. The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA. *Immunol Rev* (2012) 245:132–46. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01072.x
133. Strugnell RA, Wijburg OLC. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol* (2010) 8:656–67. doi:10.1038/nrmicro2384
134. Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev* (2014) 260:76–85. doi:10.1111/imr.12189
135. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* (2011) 4:603–11. doi:10.1038/mi.2011.41
136. Everett ML, Palestrant D, Miller SE, Bollinger RR, Parker W. Immune exclusion and immune inclusion: a new model of host-bacterial interactions in the gut. *Clin Appl Immunol Rev* (2004) 4:321–32. doi:10.1016/j.cair.2004.03.001
137. Fransen F, Zagato E, Mazzini E, Fosso B, Manzari C, El Aidy S, 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* (2015) 43:527–40. doi:10.1016/j.immuni.2015.08.011
138. Zagato E, Mazzini E, Rescigno M. The variegated aspects of Immunoglobulin A. *Immunol Lett* (2016) 178:45–9. doi:10.1016/j.imlet.2016.04.009
139. Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, Barry NA, Stefanowski J, Hao L, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* (2014) 158:1000–10. doi:10.1016/j.cell.2014.08.006
140. Ivanov II, Littman DR. Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria. *Curr Opin Microbiol* (2011) 14:106–14. doi:10.1016/j.mib.2010.12.003
141. Molloy M, Bouladoux N, Belkaid Y. Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses. *Semin Immunol* (2012) 24:58–66. doi:10.1016/j.smim.2011.11.008
142. Pang IK, Iwasaki A. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome. *Immunol Rev* (2012) 245:209–26. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01073.x
143. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* (2009) 139:485–98. doi:10.1016/j.cell.2009.09.033
144. Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* (2010) 10:735–44. doi:10.1038/nri2850
145. Chudnovskiy A, Mortha A, Kana V, Kennard A, Ramirez JD, Rahman A, et al. Host-protozoan interactions protect from mucosal infections through activation of the inflammasome. *Cell* (2016) 167:444–56.e14. doi:10.1016/j.cell.2016.08.076
146. Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science* (2014) 346:954–9. doi:10.1126/science.1260144
147. Belkaid Y, Tamoutounour S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:353–66. doi:10.1038/nri.2016.48
148. Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* (2008) 158:442–55. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x
149. Man WH, de Steenhuijsen Piters WAA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* (2017) 15:259–70. doi:10.1038/nrmicro.2017.14
150. Gabryszewski SJ, Bachar O, Dyer KD, Percopo CM, Killoran KE, Domachowske JB, et al. *Lactobacillus*-mediated priming of the respiratory mucosa protects against lethal pneumovirus infection. *J Immunol* (2011) 186:1151–61. doi:10.4049/jimmunol.1001751
151. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. Planting the seed: origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol* (2016) 43:352–69. doi:10.1080/1040841X.2016.1211088
152. Sharma R, Young C, Neu J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J Biomed Biotechnol* (2010) 2010:15. doi:10.1155/2010/305879
153. Pontier-Bres R, Rampal P, Peyron J-F, Munro P, Lemichez E, Czerucka D. The *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 strain shows protective effects against

the *B. anthracis* LT toxin. *Toxins (Basel)* (2015) 7:4455–67. doi:10.3390/toxins7114455
154. Frantz AL, Bruno MEC, Rogier EW, Tuna H, Cohen DA, Bondada S, et al. Multifactorial patterns of gene expression in colonic epithelial cells predict disease phenotypes in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* (2012) 18:2138–48. doi:10.1002/ibd.22923
155. Knoop KA, McDonald KG, Kulkarni DH, Newberry RD. Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. *Gut* (2016) 65:1100–9. doi:10.1136/gutjnl-2014-309059
156. Birchenough GMH, Johansson ME, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol* (2015) 8:712–9. doi:10.1038/mi.2015.32
157. Birchenough GMH, Nyström EEL, Johansson MEV, Hansson GC. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* (2016) 352:1535–42. doi:10.1126/science.aaf7419
158. Ramanan D, Bowcutt R, Lee SC, Tang MS, Kurtz ZD, Ding Y, et al. Helminth infection promotes colonization resistance via type 2 immunity. *Science* (2016) 352:608–12. doi:10.1126/science.aaf3229
159. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* (2008) 453:620–5. doi:10.1038/nature07008
160. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol* (2017) 15:55–63. doi:10.1038/nrmicro.2016.142
161. El-Solh AA. Association between pneumonia and oral care in nursing home residents. *Lung* (2011) 189:173–80. doi:10.1007/s00408-011-9297-0
162. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* (2014) 513:59–64. doi:10.1038/nature13568
163. Willis AR, Moore C, Mazon-Moya M, Krokowski S, Lambert C, Till R, et al. Injections of predatory bacteria work alongside host immune cells to treat *Shigella* infection in zebrafish larvae. *Curr Biol* (2016) 26:3343–51. doi:10.1016/j.cub.2016.09.067
164. Geva-Zatorsky N, Sefik E, Kua L, Pasman L, Tan TG, Ortiz-Lopez A, et al. Mining the human gut microbiota for immunomodulatory organisms. *Cell* (2017) 168:928–43.e11. doi:10.1016/j.cell.2017.01.022
165. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* (2004) 4:478–85. doi:10.1038/nri1373
166. Gorjifard S, Goldszmid RS. Microbiota-myeloid cell crosstalk beyond the gut. *J Leukoc Biol* (2016) 100:865–79. doi:10.1189/jlb.3RI0516-222R
167. Khosravi A, Yáñez A, Price JG, Chow A, Merad M, Goodridge HS, et al. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* (2014) 15:374–81. doi:10.1016/j.chom.2014.02.006
168. Rizzetto L, Ifrim DC, Moretti S, Tocci N, Cheng S-C, Quintin J, et al. Fungal chitin induces trained immunity in human monocytes during cross-talk of the host with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* (2016) 291:7961–72. doi:10.1074/jbc.M115.699645
169. Ganal SC, Sanos SL, Kallfass C, Oberle K, Johner C, Kirschning C, et al. Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota. *Immunity* (2012) 37:171–86. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.020
170. de Agüero MG, Ganal-Vonarburg SC, Fuhrer T, Rupp S, Uchimura Y, Li H, et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* (2016) 351:1296–302. doi:10.1126/science.aad2571
171. Koch MA, Reiner GL, Lugo KA, Kreuk LSM, Stanbery AG, Ansaldo E, et al. Maternal IgG and IgA antibodies dampen mucosal T helper cell responses in early life. *Cell* (2016) 165:827–41. doi:10.1016/j.cell.2016.04.055
172. Gallichan WS, Woolstencroft RN, Guarasci T, McCluskie MJ, Davis HL, Rosenthal KL. Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol* (2001) 166:3451–7. doi:10.4049/jimmunol.166.5.3451
173. Villarino NF, LeCleir GR, Denny JE, Dearth SP, Harding CL, Sloan SS, et al. Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113:2235–40. doi:10.1073/pnas.1504887113
174. Yilmaz B, Portugal S, Tran TM, Gozzelino R, Ramos S, Gomes J, et al. Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell* (2014) 159:1277–89. doi:10.1016/j.cell.2014.10.053
175. Benson A, Pifer R, Behrendt CL, Hooper LV, Yarovinsky F. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe* (2009) 6:187–96. doi:10.1016/j.chom.2009.06.005
176. Pfeiffer JK, Sonnenburg JL. The intestinal microbiota and viral susceptibility. *Front Microbiol* (2011) 2:92. doi:10.3389/fmicb.2011.00092
177. Davidson LE, Fiorino A-M, Snydman DR, Hibberd PL. *Lactobacillus* GG as an immune adjuvant for live-attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Eur J Clin Nutr* (2011) 65:501–7. doi:10.1038/ejcn.2010.289
178. Pérez-Santiago J, Gianella S, Massanella M, Spina CA, Karris MY, Var SR, et al. Gut *Lactobacillales* are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection. *AIDS* (2013) 27:1921–31. doi:10.1097/QAD.0b013e3283611816
179. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity* (2012) 37:158–70. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.011
180. Pradeu T. Mutualistic viruses and the heteronomy of life. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* (2016) 59:80–8. doi:10.1016/j.shpsc.2016.02.007
181. Roossinck MJ. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nat Rev Microbiol* (2011) 9:99–108. doi:10.1038/nrmicro2491
182. Virgin HW. The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* (2014) 157:142–50. doi:10.1016/j.cell.2014.02.032
183. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell* (2009) 138:30–50. doi:10.1016/j.cell.2009.06.036
184. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, et al. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* (2007) 447:326–9. doi:10.1038/nature05762
185. Robinson CM, Pfeiffer JK. Viruses and the microbiota. *Annu Rev Virol* (2014) 1:55–69. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085550
186. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* (2001) 345:715–24. doi:10.1056/NEJMoa010398
187. Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med* (2001) 345:707–14. doi:10.1056/NEJMoa003364
188. Stapleton JT, Chaloner K, Martenson JA, Zhang J, Klinzman D, Xiang J, et al. GB virus C infection is associated with altered lymphocyte subset distribution and reduced T cell activation and proliferation in HIV-infected individuals. *PLoS One* (2012) 7:e50563. doi:10.1371/journal.pone.0050563
189. Fardini Y, Chung P, Dumm R, Joshi N, Han YW. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. *Infect Immun* (2010) 78:1789–96. doi:10.1128/IAI.01395-09
190. Donnet-Hughes A, Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, et al. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc* (2010) 69:407–15. doi:10.1017/S0029665110001898
191. Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J Clin Microbiol* (2001) 39:1956–9. doi:10.1128/JCM.39.5.1956-1959.2001
192. Tomás I, Diz P, Tobías A, Scully C, Donos N. Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol* (2012) 39:213–28. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01784.x
193. Zeng MY, Cisalpino D, Varadarajan S, Hellman J, Warren HS, Cascalho M, et al. Gut microbiota-induced Immunoglobulin G controls systemic infection by symbiotic bacteria and pathogens. *Immunity* (2016) 44:647–58. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.006
194. Schieber AMP, Lee YM, Chang MW, Leblanc M, Collins B, Downes M, et al. Disease tolerance mediated by microbiome *E. coli* involves inflammasome and IGF-1 signaling. *Science* (2015) 350:558–63. doi:10.1126/science.aac6468
195. Bocci V. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspect Biol Med* (1992) 35:251–60. doi:10.1353/pbm.1992.0004

196. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* (2007) 56:1761–72. doi:10.2337/db06-1491
197. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* (2008) 57:1470–81. doi:10.2337/db07-1403
198. Hersoug L-G, Møller P, Loft S. Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implications for inflammation and obesity. *Obes Rev* (2016) 17:297–312. doi:10.1111/obr.12370
199. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* (2010) 16:228–31. doi:10.1038/nm.2087
200. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* (2012) 482:179–85. doi:10.1038/nature10809
201. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106:3698–703. doi:10.1073/pnas.0812874106
202. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol* (2014) 28:1221–38. doi:10.1210/me.2014-1108
203. Samuelson DR, Welsh DA, Shellito JE. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Front Microbiol* (2015) 6:1085. doi:10.3389/fmicb.2015.01085
204. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* (2014) 6:263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759
205. Underhill DM, Iliev ID. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol* (2014) 14:405. doi:10.1038/nri3684
206. Denny JE, Powell WL, Schmidt NW. Local and long-distance calling: conversations between the gut microbiota and intra- and extra-gastrointestinal tract infections. *Front Cell Infect Microbiol* (2016) 6:41. doi:10.3389/fcimb.2016.00041
207. Fagundes CT, Amaral FA, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, et al. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J Immunol* (2012) 188:1411–20. doi:10.4049/jimmunol.1101682
208. Clarke TB. Early innate immunity to bacterial infection in the lung is regulated systemically by the commensal microbiota via Nod-like receptor ligands. *Infect Immun* (2014) 82:4596–606. doi:10.1128/IAI.02212-14
209. Perry S, de Jong BC, Solnick JV, de la Luz Sanchez M, Yang S, Lin PL, et al. Infection with *Helicobacter pylori* is associated with protection against tuberculosis. *PLoS One* (2010) 5:e8804. doi:10.1371/journal.pone.0008804
210. Majlessi L, Sayes F, Bureau J-F, Pawlik A, Michel V, Jouvion G, et al. Colonization with *Helicobacter* is concomitant with modified gut microbiota and drastic failure of the immune control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol* (2017) 10:1178–89. doi:10.1038/mi.2016.140
211. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:5354–9. doi:10.1073/pnas.1019378108
212. Chen L-W, Chen P-H, Hsu C-M. Commensal microflora contribute to host defense against *Escherichia coli* pneumonia through toll-like receptors. *Shock* (2011) 36:67–75. doi:10.1097/SHK.0b013e3182184ee7
213. Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJTH, de Boer JD, et al. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut* (2016) 65:575–83. doi:10.1136/gutjnl-2015-309728
214. Tanaka K, Sawamura S, Satoh T, Kobayashi K, Noda S. Role of the indigenous microbiota in maintaining the virus-specific CD8 memory T cells in the lung of mice infected with murine cytomegalovirus. *J Immunol* (2007) 178:5209–16. doi:10.4049/jimmunol.178.8.5209
215. Gauguet S, D'Ortona S, Ahnger-Pier K, Duan B, Surana NK, Lu R, et al. Intestinal microbiota of mice influences resistance to *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* (2015) 83:4003–14. doi:10.1128/IAI.00037-15
216. McAleer JP, Nguyen NLH, Chen K, Kumar P, Ricks DM, Binnie M, et al. Pulmonary Th17 antifungal immunity is regulated by the gut microbiome. *J Immunol* (2016) 197:97–107. doi:10.4049/jimmunol.1502566
217. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community—implications for therapeutic management. *PLoS One* (2012) 7:e36313. doi:10.1371/journal.pone.0036313
218. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio* (2015) 6:e00037. doi:10.1128/mBio.00037-15
219. Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, et al. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *MBio* (2015) 6:e02284-14. doi:10.1128/mBio.02284-14
220. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Homeostasis and its disruption in the lung microbiome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2015) 309:L1047–55. doi:10.1152/ajplung.00279.2015
221. Whiteson KL, Bailey B, Bergkessel M, Conrad D, Delhaes L, Felts B, et al. The upper respiratory tract as a microbial source for pulmonary infections in cystic fibrosis. Parallels from island biogeography. *Am J Respir Crit Care Med* (2014) 189:1309–15. doi:10.1164/rccm.201312-2129PP
222. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, Walker N, Scales BS, Beck JM, et al. Changes in the lung microbiome following lung transplantation include the emergence of two distinct *Pseudomonas* species with distinct clinical associations. *PLoS One* (2014) 9:e97214. doi:10.1371/journal.pone.0097214
223. Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet* (2014) 384:691–702. doi:10.1016/S0140-6736(14)61136-3
224. Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, Falkowski NR, Erb-Downward JR, Standiford TJ, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nat Microbiol* (2016) 1:16113. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.113
225. de Steenhuijsen Piters WAA, Sanders EAM, Bogaert D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2015) 370(1675):20140294. doi:10.1098/rstb.2014.0294
226. Buddington R. Using probiotics and prebiotics to manage the gastrointestinal tract ecosystem. In: Charalampopoulos D, Rastall RA, editors. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. New York: Springer (2009). p. 1–31.
227. Wright ML, Pendarvis K, Nanduri B, Edelmann MJ, Jenkins HN, Reddy JS, et al. The effect of oxygen on bile resistance in *Listeria monocytogenes*. *J Proteomics Bioinform* (2016) 9:107–19. doi:10.4172/jpb.1000396
228. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* (2015) 14:20–32. doi:10.1038/nrmicro3552
229. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol* (2013) 14:676–84. doi:10.1038/ni.2640
230. Santagati M, Scillato M, Patanè F, Aiello C, Stefani S. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2012) 65:23–31. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00928.x
231. Probiotics to Prevent Severe Pneumonia and Endotracheal Colonization Trial (PROSPECT). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02462590 (2016). Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02462590
232. Santagati M, Scillato M, Muscaridola N, Metoldo V, La Mantia I, Stefani S. Colonization, safety, and tolerability study of the *Streptococcus salivarius* 24SMBc nasal spray for its application in upper respiratory tract infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2015) 34:2075–80. doi:10.1007/s10096-015-2454-2
233. Olier M, Marcq I, Salvador-Cartier C, Secher T, Dobrindt U, Boury M, et al. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* (2012) 3:501–9. doi:10.4161/gmic.21737

234. Pradeu T. *The Limits of the Self: Immunology and Biological Identity*. New York: Oxford University Press (2012).
235. Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* (2003) 21:3374–6. doi:10.1016/S0264-410X(03)00336-0
236. Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P. Social immunity. *Curr Biol* (2007) 17:R693–702. doi:10.1016/j.cub.2007.06.008
237. Anderson RM. The concept of herd immunity and the design of community-based immunization programmes. *Vaccine* (1992) 10:928–35. doi:10.1016/0264-410X(92)90327-G
238. Fine PEM. Herd immunity: history, theory, practice. *Epidemiol Rev* (1993) 15:265–302. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036121
239. Chow J, Mazmanian SK. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe* (2010) 7:265–76. doi:10.1016/j.chom.2010.03.004
240. Siegrist C-A. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine* (2003) 21:3406–12. doi:10.1016/S0264-410X(03)00342-6

Conflict of Interest Statement: The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Chiu, Bazin, Truchetet, Schaeverbeke, Delhaes and Pradeu. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Host-microbiota co-immunity:

An intimate relationship that goes beyond defense

Thomas Bazin[1,2], Lynn Chiu[3], Thomas Pradeu[3,4]

1. University of Bordeaux, INRA, Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, EA 3671, Bordeaux, France

2. Department of Hepato-Gastroenterology, Bordeaux Hospital University Center, Pessac, France

3. ImmunoConcept (UMR5164), CNRS & University of Bordeaux, France.

4. Institut d'histoire et de philosophie des sciences et des techniques (UMR8590), CNRS & Panthéon-Sorbonne University, France.

For Peer Review

Abstract

Resident microorganisms, known as the microbiota, are essential for many physiological functions including protection against pathogens. Microbiota is indeed required for proper immune system development and function, and can also host-independently protect against infections. Thus, a co-constructed view of host defense involving both host and microbiota, named "co-immunity", has been proposed, and the idea of an "immunological holobiont" has been suggested. Yet this view of co-immunity might be too limited, as experimental work has shown that the immune system is involved in functions other than defense, essentially development and repair. Microbiota, through co-immunity, is thereby most likely involved in these functions, although strong evidence is currently lacking. Moreover, as our point of view is mainly host-centered, we may miss the implications of co-immunity at broader scales, including cellular and populational levels. Intriguingly, co-immunity

effects could be beneficial for one function and/or one level, while detrimental for others. All these elements should be taken into consideration for microbiota manipulation, in order to avoid potentially harmful side effects.

Keywords

Individuality; immunity; tissue repair; symbiosis; microbial ecology; colonization resistance; disease tolerance; containment.

Acknowledgements

We would like to thank Nadine Cerf-Bensussan, Laurence Delhaes, Gérard Eberl, Bruno Lemaitre, Thierry Schaeverbeke, Philippe Sansonetti, and Marie-Elise Truchetet for discussions. L. C. and T. P. have received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme - grant agreement n° 637647 – IDEM".

For Peer Review

39

40

41 1. **Introduction: From immunity against microbes to co-immunity between hosts and**
42 **microbes**

43 Microorganisms have long been seen as intrinsically and essentially harmful, and therefore as entities
44 against which potential hosts must protect themselves. This has led to the concept that organisms
45 isolate themselves from their microbial environment, and are protected against such microbial
46 threats by their immune system, understood as a "defense" system (Burnet 1962; Clark 2008). Yet
47 resident microorganisms are now clearly recognized as an integral and crucial part of our protective
48 system against pathogens. Commensal bacteria, viruses, fungi and helminths can indeed protect
49 their hosts against a variety of pathogens (Buffie and Pamer 2013; Belkaid and Hand 2014; Pamer
50 2016). We have recently proposed to label "co-immunity" this host-microorganism partnership
51 ensuring host defense (Chiu et al. 2017).

52 In this short essay, we present our main arguments in favor of the idea of co-immunity, before
53 showing that this concept must be expanded in two main directions, namely the influence of the
54 microbiota on non-defensive immune activities, and on multiple levels of immune responses.

55 A few remarks about the vocabulary used in the present paper are in order. We define "microbiota"
56 as all the resident microorganisms living in or on a host, regardless of the nature of their ecological
57 interaction (parasitic, commensal, and mutualistic) with the host, their size, or taxonomic category
58 (bacteria, viruses, fungi, or parasites such as helminths). In addition, we understand the notion of
59 "holobiont" physiologically, as the collective entity composed by the host and its resident microbiota
60 and displaying functions realized jointly by the host and the microbiota (Chiu and Eberl 2016; Pradeu
61 2016). We do not claim that this collective entity is an evolutionary unit, contrary to the dominant
62 (and disputed) use of the term "holobiont" (Vandenkoornhuyse et al. 2015; Bordenstein and Theis
63 2015; Douglas and Werren 2016; Skillings 2016; Doolittle and Booth 2017; Roughgarden et al. 2017),

For Peer Review

though it could qualify as an ecological unit (Hester et al. 2016). Moreover, the crux of our arguments concerns the details of how the microbiota influences immunity, and these arguments applies to the intimate association between a host and its microbiota, whether or not one considers that such association qualifies as "holobiont".

2. What is "co-immunity"?

In a recent paper (Chiu et al. 2017), we have proposed the concept of "co-immunity". This concept builds on previous knowledge about the potentially protective role of the microbiota, but makes also several steps further.

Recent work has distinguished two main modes of microbiota-induced protection: a direct one *via* microbe-to-microbe interactions and an indirect one *via* activation by the microbiota of host's immune system. For instance, probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 directly outcompetes commensal and pathogen *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium *via* micromicin secretion (Sassone-Corsi et al. 2016), while protozoan *Tritrichomonas musculis* indirectly protects from gut *S.* Typhimurium infection through the promotion of inflammatory Th1 and Th17 type immunity (Chudnovskiy et al. 2016). These two modes of protection are grouped together under the concept of "colonization resistance", which refers to all forms of host-dependent or host-independent resistance to pathogens that is induced by the microbiota.

Still, this classic concept of microbiota-induced protection is too narrow for two reasons: on the one hand, the concept of colonization resistance is generally limited to a single defense strategy, that is the resistance against pathogen's establishment and growth; on the other, protective effects are limited to the immediate vicinity of protective microbes. Thus, colonization resistance seems too limited to embrace the variety and the complexity of microbiota-mediated protective effects.

For Peer Review

First, other protective mechanisms than colonization resistance exist, namely *containment* and *disease tolerance*. Containment is the controlled localization of microbes within a particular site inside the host. For instance, in various organisms, bacteriophages that adhere to mucus glycoproteins can prevent translocation of bacteria, thus providing a host-independent localized protection of mucosal surfaces against bacterial infections (Barr et al. 2013). Disease tolerance is the limitation of host's tissue damages induced by pathogens, without pathogen elimination. As an illustration, *Bacteroides fragilis* in the gut affects systemic T-cell responses through the action of the bacterium-derived polysaccharide A, which protects against pathobiont *Helicobater hepaticus* colitis *via* the production of anti-inflammatory IL-10 by CD4+ T cells and the promotion of regulatory T cells, without any effect on pathogen fitness or load (Mazmanian et al. 2008).

Second, microorganisms in one organ (mainly the gut) can influence immune responses in other organs. Long-reaching protective effects are less documented than local effects in the scientific literature, but convincing examples exist. For instance, mice challenged with pulmonary staphylococcal infection but lacking segmented filamentous bacteria in their gut microbiota show more severe infection with higher bacterial load and mortality, associated with diminished lung concentration of Th17 immune effector cells. Reintroduction of segmented filamentous bacteria is sufficient to restore protective effect (Gauguet et al. 2015).

Thus, we propose a systematic classification of protective mechanisms that includes a broader range of defensive strategies than localized colonization resistance, distinguishing the modes (direct or indirect), the ranges (localized or long-reaching) and the effects (mechanisms) of protection (see **Figure 1**). The notion of co-immunity that we propose (i.e., a form of immune defense associating components of several organisms), which in the present contexts combines components of the host and of the microbiota, includes all these different modes, ranges, and effects.

3. Enriching the concept of co-immunity in terms of activities and levels

For Peer Review

Despite the encompassing nature of the concept of co-immunity, we think it is still too limited, and must therefore be expanded in two main directions. First, immunity is not limited to defense strategies, and taking this fact into account extends significantly the implications of the concept of co-immunity. Second, co-immunity might concern other levels than that of the individual organism.

a. Co-immunity beyond defense

We previously defined co-immunity as a form of immune defense (Chiu et al. 2017). But what does "defense" exactly mean in this context? If we agree that to defend means to fight or to help to fight against an external aggression, which is the commonly accepted definition, colonization resistance and containment can be considered as defense mechanisms, acting as "knights" – either using a "shield" (protection) or a "sword" (attack). But should disease tolerance be always considered as a defense mechanism? In the case of the inhibition of pathogenic toxins, for instance (de Sablet et al. 2009), it might be said so. But the toleration (rather than the destruction) of pathogens can be a cost-effective alternative when upkeep of pathogen fitness does not strongly decrease host fitness (e.g., when pathogen virulence is low), especially since the side effects of aggressive inflammatory immune responses are sometimes more damaging to the host than the "infection" itself. For instance, gut commensal *Escherichia coli* O21:H+ antagonizes muscle wasting during *Burkholderia thailandensis* or *Salmonella* Typhimurium infections, without a negative impact on the fitness of these pathogens (Schieber et al. 2015). In this precise case, disease tolerance could act more like a wise gate-keeper than like a knight, away from a strictly speaking defense action, and sometimes paving the way for a potentially mutualistic relationship.

Moreover, we know that immunity is implicated in many other activities than protection alone. The immune system plays indeed a key role in robustness, that is the capacity for each organism to develop, defend, and repair (Laurent et al. 2017; Truchetet and Pradeu 2018). Could co-immunity be implicated in development-associated and repair-associated activities?

For Peer Review

136 The notion that animal development universally relies on microbial cues (developmental symbiosis)
137 is gaining traction (Gilbert 2016). However, in most cases the three actors' game between
138 microbiota, immune system and development remains to be demonstrated, as for the most part
139 what we have is correlations only. A much studied bacterial symbiosis in the animal world is the
140 association between the squid *Euprymna scolopes* and the bacterium *Vibrio fischeri*, where a crucial
141 step of the squid's organogenesis relies on the presence of this particular bacterium. *V. fischeri* is
142 specifically required for the *E. scolopes'* light organ to fully develop, which is to lose its superficial
143 ciliated field. This action is linked with a direct interaction between tracheal cytotoxin (a fragment of
144 the peptidoglycan) released by *V. fischeri* and epithelium-lined crypts of the light organ (Koropatnick
145 et al. 2004). Pathways explaining developmental effects distant from this specific epithelium
146 probably involve macrophage-like hemocytes that are recruited during *V. fischeri* colonization
147 (McFall-Ngai et al. 2010), suggesting that in the present case organogenesis relies on the interaction
148 between a specific bacterium and the animal's immune system. Interestingly, microscopic
149 examination of various squid tissues revealed that host hemocytes specifically migrate into the
150 epithelial fields on the surface of the light organ before any signal of morphogenesis changes,
151 suggesting a causal link between hemocyte modifications and organogenesis. Moreover, hemocyte
152 gene expression correlates with the induction of light organ morphogenesis, suggesting that
153 bacteria-induced molecular changes in the hemocytes are required for their developmental effects.
154 However, direct impact of *V. fischeri* on hemocytes' gene expression has yet to be demonstrated
155 (Koropatnick et al. 2007).

156 Microbiota in association with the immune system is also suspected to play a role in the
157 development and the organization of the enteric nervous system (Obata and Pachnis 2016). For
158 instance, in the network of murine enteric nervous system, mucosal glial cells develop in response to
159 gut microbiota, but it is unclear whether this is a consequence of direct glia sensing of microbial
160 factors, or if it is instead mediated by the immune system (Veiga-Fernandes and Pachnis 2017). In
161 humans, the microbiota is suspected to play a role in neurodevelopment, this having been

For Peer Review

particularly studied in autism (Kelly et al. 2017). Microglia development, maturation and function are influenced both prenatally and postnatally by the microbiota (Erny et al. 2015); as microglia contribute to brain development, microbiota could indirectly influence brain development (Thion et al. 2018), though more research is needed to entirely establish this claim.

Concerning repair, some studies show a beneficial role of peculiar species in healing intestinal ulcers and cutaneous infections (Lukic et al. 2018), potentially through systemic effects of beneficial bacteria, whereas others point to an accelerated and scarless skin healing in germ-free conditions (Canesso et al. 2014). Interestingly, the three actors' game between the microbiota, the immune system and repair processes have begun to be deciphered. A link between the microbiota and intestinal repair was suspected after the discovery that toll-like receptor (TLR) activation by microbiota components is needed to promote tissue repair and host survival following acute injury (Rakoff-Nahoum et al. 2004). Moreover, Lai et al. showed that lipoteichoic acid, produced by skin commensal *Staphylococcus epidermidis*, can bind to TLR 2, and thus mitigate inflammation, thereby promoting wound healing (Lai et al. 2009). More recently, Linehan et al. showed that a skin commensal can induce a specific T-cell response that accelerates skin wound healing, proving the implication of the immune system in microbiota modulation of tissue repair (Linehan et al. 2018). Notably, commensal-specific T-cells expressed repair signature genes and were different from pathogen-induced ones.

Together, these results suggest that the boundaries of our conceptual framework need to be extended, and raise a new question: if a microbe can modulate different immune functions, is there a possibility that what we call a pathogen because of its deleterious effect on one function could be beneficial in another immune function? And, conversely, can a protective microbe for one function be deleterious for another function? The latter is crucial for safety of microbiota interventions.

For Peer Review

b. Co-immunity beyond the level of the organism

Our vision of protection is usually centered on the level of the organism. Yet co-immunity could occur at different scales, both within and beyond the organism. This raises the question of whether pathogenic effects can impact differentially the various levels under consideration.

At the populational scale, microbiota transmission could be implicated in social immunity in insects (Cremer et al. 2007), and in "herd immunity" (Fine 1993) in humans and cattle, whose prototypical example is vaccination. Social immunization, that is the interindividual transmission of protective properties against pathogens, is a part of social immunity and has been observed in termite *Zootermopsis angusticollis* (Traniello et al. 2002) and in *Bombus terrestris* bumblebee (Sadd et al. 2005). Precise mechanisms are unknow, and cannot involve antibody transmission in invertebrate animals (Moret and Schmid-Hempel 2001). As microbiota transmission is strongly favored by sociality (Kwong and Moran 2016), it could be the vector of this sort of social immunity.

In humans, the carcinogenic effect of *Helicobacter pylori* on gastric mucosa is well-known, but at the organism scale *H. pylori* infection is associated with a protection against tuberculosis (Perry et al. 2010), which can hypothetically modify the transmission of infection at the population level. It is also plausible that a peculiar microbiota could protect one host from the damages induced by a pathogen, for instance by inducing disease tolerance, thereby encouraging its growth and transmission and decreasing population's fitness, though evidence for such a phenomenon is currently lacking. In the opposite way, a peculiar microbiota could increase community fitness, while disadvantaging predisposed hosts (altruistic immunity).

Within a multicellular organism, it is perfectly plausible that a bacterium hosts a phage that protects the bacterium against pathogens (which means that there is a co-immunity between the bacterium and the phage), but this association weakens the immune protection of the multicellular host against a given pathogenic threat in a given context. It is also conceivable (though no evidence currently exists for this, to our knowledge) that an intracellular microorganism increases cell-intrinsic immunity

For Peer Review

(i.e., immunity at the level of a cell) (e.g, (Bieniasz 2004; Yan and Chen 2012; Ablasser et al. 2013)), at the expense of the immune response of the whole organism against a given pathogen. This could happen in plants, for example, where immunity is to a large extent dependent on cell-intrinsic processes, making the coordination of these cellular responses at the higher level of the organism quite complicated (Szittya and Burgyán 2013). Other interesting cases of conflicts between levels of co-immunity could include organisms that transition from a unicellular to a multicellular stage, with the emergence of collective immunity at the multicellular level, like *Dictyostelium discoideum* (Chen et al. 2007). Here again, one could imagine an intracellular symbiont favoring the immune protection of a cell within the multicellular slug, but detrimental to immune protection of the slug as a whole against a given pathogen. Though speculative, these considerations are plausible, and it is likely that the lack of evidence about such phenomena is to a large extent due to lack of investigations based on these exact questions.

4. Conclusion

The immune system is so dependent on its interactions with the microbiota for its development and functioning that the "pure" eukaryote-only concept of immunity seems to progressively vanish. In parallel, "host-independent" immune protection is very relative, as microbiota composition is actively modulated by the immune system. Thus, a co-constructed view of immunity (according to which immunity is the product of the intricate contribution of both the host and the microbiota) is essential.

The question can be raised as whether it is useful to continue to use the term "immunity" alone, or if this term should be completely replaced by that of "co-immunity" (see **Figure 2**). Considering protective immunity as a distinct physiological function and the holobiont as an individual, co-

For Peer Review

immunity could give birth to the notion of a "immunological holobiont", without again assuming that this entity constitutes an evolutionary unit (Pradeu 2016; Postler and Ghosh 2017).

It might be possible to object to our argument here that the vision of the immune system as multifunctional is not consensual, and that evidence concerning development and repair mediated by a dialogue between the immune system and the microbiota is scarce. In response, we would say that recent research does seem to point in that direction and that, as philosophers and medical doctors involved in microbiota research, our aim is mainly to try to open up original avenues for future research. We suggest that testing the potential beneficial effects of a new bug should be accompanied by a broad reflection about its impact on all immune functions (not just defense), at different scales (not just that of the organism), and in different contexts. This expanded view of co-immunity should also be combined with a switch from a host-centric view (as is usually the case in discussions over "holobionts") to a microbe-centric view. This switch is likely to further enrich the co-constructed view of immunity that we have tried to propose in this essay.

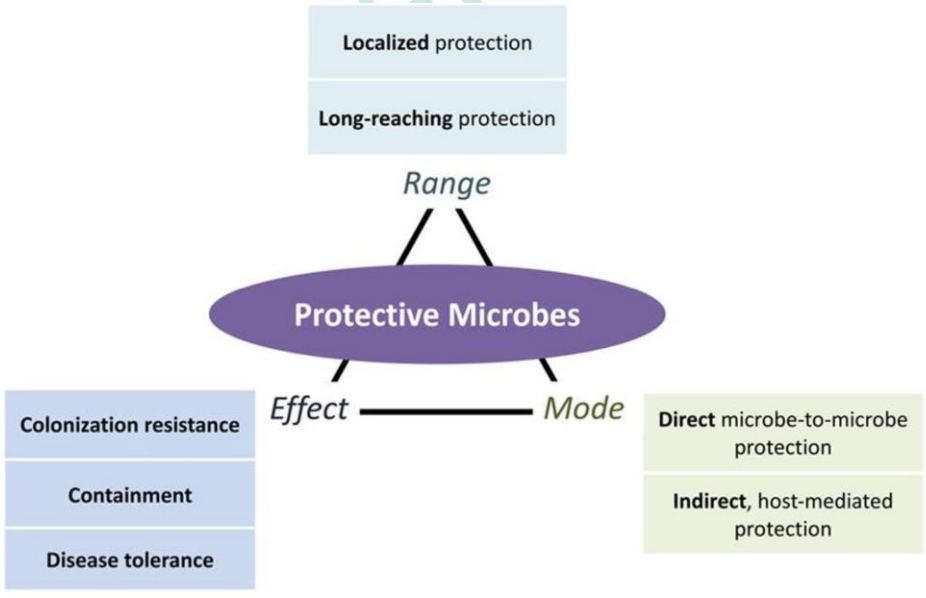


Figure 1. An expanded view of microbe-conferred protection. Microorganisms can protect the host in different ways, depending on the mode of protection (direct ecological and indirect host-mediated),

the effects of protection (colonization resistance against pathogenic establishment and growth, containment of pathogens and their effects, and disease tolerance of pathogens while suppressing their negative effects), and the range of protection (localized or long-reaching, with the latter further divided into protection that is systemic or from one locale to another locale). All three aspects of protection can occur in combination. Long-reaching protection, for instance, involves both direct (ecological) and indirect (host-mediated) modes of protection that result in colonization resistance, containment, or disease tolerance effects. Source: *Frontiers in Immunology* (Chiu et al. 2017).

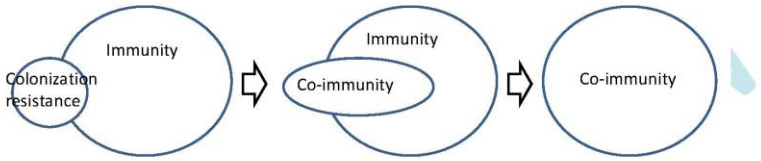


Figure 2. Conceptual transition from colonization resistance as a peripheral part of our understanding of immunity to co-immunity as an integrated sub-part of immunity, and finally to co-immunity alone.

For Peer Review

267 Ablasser A, Schmid-Burgk JL, Hemmerling I, et al (2013) Cell intrinsic immunity spreads to bystander
268 cells via the intercellular transfer of cGAMP. Nature 503:530–534. doi: 10.1038/nature12640
269 Barr JJ, Auro R, Furlan M, et al (2013) Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived
270 immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 110:10771–10776. doi: 10.1073/pnas.1305923110
271 Belkaid Y, Hand TW (2014) Role of the microbiota in immunity and inflammation. Cell 157:121–141.
272 doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011
273 Bieniasz PD (2004) Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. Nat Immunol 5:1109–
274 1115. doi: 10.1038/ni1125
275 Bordenstein SR, Theis KR (2015) Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts
276 and Hologenomes. PLoS Biol 13:e1002226. doi: 10.1371/journal.pbio.1002226
277 Buffie CG, Pamer EG (2013) Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal
278 pathogens. Nat Rev Immunol 13:790–801. doi: 10.1038/nri3535
279 Burnet FM (1962) The Integrity of the Body: A Discussion of Modern Immunological Ideas. Harvard
280 University Press, Cambridge, MA
281 Canesso MCC, Vieira AT, Castro TBR, et al (2014) Skin wound healing is accelerated and scarless in the
282 absence of commensal microbiota. J Immunol Baltim Md 1950 193:5171–5180. doi:
283 10.4049/jimmunol.1400625
284 Chen G, Zhuchenko O, Kuspa A (2007) Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. Science
285 317:678–681. doi: 10.1126/science.1143991
286 Chiu L, Bazin T, Truchetet M-E, et al (2017) Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching
287 Co-Immunity. Front Immunol 8:. doi: 10.3389/fimmu.2017.01678
288 Chiu L, Eberl G (2016) Microorganisms as scaffolds of host individuality: an eco-immunity account of
289 the holobiont. Biol Philos 31:819–837. doi: 10.1007/s10539-016-9552-0
290 Chudnovskiy A, Mortha A, Kana V, et al (2016) Host-Protozoan Interactions Protect from Mucosal
291 Infections through Activation of the Inflammasome. Cell 167:444-456.e14. doi:
292 10.1016/j.cell.2016.08.076
293 Clark WR (2008) In Defense of Self: How the Immune System Really Works. Oxford University Press,
294 New York
295 Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P (2007) Social immunity. Curr Biol CB 17:R693-702. doi:
296 10.1016/j.cub.2007.06.008
297 de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, et al (2009) Human microbiota-secreted factors inhibit
298 shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Infect Immun 77:783–
299 790. doi: 10.1128/IAI.01048-08
300 Doolittle WF, Booth A (2017) It's the song, not the singer: an exploration of holobiosis and
301 evolutionary theory. Biol Philos 32:5–24. doi: 10.1007/s10539-016-9542-2
302 Douglas AE, Werren JH (2016) Holes in the Hologenome: Why Host-Microbe Symbioses Are Not
303 Holobionts. mBio 7:e02099-15. doi: 10.1128/mBio.02099-15
304 Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, et al (2015) Host microbiota constantly control maturation and
305 function of microglia in the CNS. Nat Neurosci 18:965–977. doi: 10.1038/nn.4030
306 Fine PEM (1993) Herd Immunity: History, Theory, Practice. Epidemiol Rev 15:265–302. doi:
307 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036121
308 Gauguet S, D'Ortona S, Ahnger-Pier K, et al (2015) Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance
309 to Staphylococcus aureus Pneumonia. Infect Immun 83:4003–4014. doi: 10.1128/IAI.00037-
310 15
311 Gilbert SF (2016) Developmental Plasticity and Developmental Symbiosis: The Return of Eco-Devo.
312 Curr Top Dev Biol 116:415–433. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.12.006
313 Hester ER, Barott KL, Nulton J, et al (2016) Stable and sporadic symbiotic communities of coral and
314 algal holobionts. ISME J 10:1157–1169. doi: 10.1038/ismej.2015.190
315 Kelly JR, Minuto C, Cryan JF, et al (2017) Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental
316 Disorders. Front Neurosci 11:490. doi: 10.3389/fnins.2017.00490
317 Koropatnick TA, Engle JT, Apicella MA, et al (2004) Microbial factor-mediated development in a host-
318 bacterial mutualism. Science 306:1186–1188. doi: 10.1126/science.1102218

319 Koropatnick TA, Kimbell JR, McFall-Ngai MJ (2007) Responses of host hemocytes during the initiation
320 of the squid-Vibrio symbiosis. Biol Bull 212:29–39. doi: 10.2307/25066578
321 Kwong WK, Moran NA (2016) Gut microbial communities of social bees. Nat Rev Microbiol 14:374–
322 384. doi: 10.1038/nrmicro.2016.43
323 Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, et al (2009) Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-
324 dependent inflammation after skin injury. Nat Med 15:1377–1382. doi: 10.1038/nm.2062
325 Laurent P, Jolivel V, Manicki P, et al (2017) Immune-Mediated Repair: A Matter of Plasticity. Front
326 Immunol 8:. doi: 10.3389/fimmu.2017.00454
327 Linehan JL, Harrison OJ, Han S-J, et al (2018) Non-classical Immunity Controls Microbiota Impact on
328 Skin Immunity and Tissue Repair. Cell 172:784-796.e18. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.033
329 Lukic J, Chen V, Strahinic I, et al (2018) Probiotics or Pro-healers the Role of Beneficial Bacteria in
330 Tissue Repair. Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc. doi:
331 10.1111/wrr.12607
332 Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal
333 inflammatory disease. Nature 453:620–625. doi: 10.1038/nature07008
334 McFall-Ngai M, Nyholm SV, Castillo MG (2010) The role of the immune system in the initiation and
335 persistence of the Euprymna scolopes--Vibrio fischeri symbiosis. Semin Immunol 22:48–53.
336 doi: 10.1016/j.smim.2009.11.003
337 Moret Y, Schmid-Hempel P (2001) Entomology: Immune defence in bumble-bee offspring. Nature
338 414:506. doi: 10.1038/35107138
339 Obata Y, Pachnis V (2016) The Effect of Microbiota and the Immune System on the Development and
340 Organization of the Enteric Nervous System. Gastroenterology 151:836–844. doi:
341 10.1053/j.gastro.2016.07.044
342 Pamer EG (2016) Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens.
343 Science 352:535–538. doi: 10.1126/science.aad9382
344 Perry S, de Jong BC, Solnick JV, et al (2010) Infection with Helicobacter pylori is associated with
345 protection against tuberculosis. PloS One 5:e8804. doi: 10.1371/journal.pone.0008804
346 Postler TS, Ghosh S (2017) Understanding the Holobiont: How microbial metabolites affect human
347 health and shape the immune system. Cell Metab 26:110–130. doi:
348 10.1016/j.cmet.2017.05.008
349 Pradeu T (2016) Organisms or biological individuals? Combining physiological and evolutionary
350 individuality. Biol Philos 31:797–817. doi: 10.1007/s10539-016-9551-1
351 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al (2004) Recognition of commensal microflora by
352 toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell 118:229–241. doi:
353 10.1016/j.cell.2004.07.002
354 Roughgarden J, Gilbert SF, Rosenberg E, et al (2017) Holobionts as Units of Selection and a Model of
355 Their Population Dynamics and Evolution. Biol Theory 1–22. doi: 10.1007/s13752-017-0287-1
356 Sadd BM, Kleinlogel Y, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P (2005) Trans-generational immune
357 priming in a social insect. Biol Lett 1:386–388. doi: 10.1098/rsbl.2005.0369
358 Sassone-Corsi M, Nuccio S-P, Liu H, et al (2016) Microcins mediate competition among
359 Enterobacteriaceae in the inflamed gut. Nature 540:280–283. doi: 10.1038/nature20557
360 Schieber AMP, Lee YM, Chang MW, et al (2015) Disease tolerance mediated by microbiome E. coli
361 involves inflammasome and IGF-1 signaling. Science 350:558–563. doi:
362 10.1126/science.aac6468
363 Skillings D (2016) Holobionts and the ecology of organisms: Multi-species communities or integrated
364 individuals? Biol Philos 31:875–892. doi: 10.1007/s10539-016-9544-0
365 Szittya G, Burgyán J (2013) RNA interference-mediated intrinsic antiviral immunity in plants. Curr Top
366 Microbiol Immunol 371:153–181. doi: 10.1007/978-3-642-37765-5_6
367 Thion MS, Low D, Silvin A, et al (2018) Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-
368 Specific Manner. Cell 172:500-516.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.042

369 Traniello JFA, Rosengaus RB, Savoie K (2002) The development of immunity in a social insect:
370 Evidence for the group facilitation of disease resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 99:6838–
371 6842. doi: 10.1073/pnas.102176599
372 Truchetet M-E, Pradeu T (2018) Re-thinking our understanding of immunity: Robustness in the tissue
373 reconstruction system. Semin Immunol 36:45–55. doi: 10.1016/j.smim.2018.02.013
374 Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, et al (2015) The importance of the microbiome of the
375 plant holobiont. New Phytol 206:1196–1206. doi: 10.1111/nph.13312
376 Veiga-Fernandes H, Pachnis V (2017) Neuroimmune regulation during intestinal development and
377 homeostasis. Nat Immunol 18:116–122. doi: 10.1038/ni.3634
378 Yan N, Chen ZJ (2012) Intrinsic Antiviral Immunity. Nat Immunol 13:214–222. doi: 10.1038/ni.2229
379

For Peer Review

Projet

L'association entre des modifications du microbiote et les MIC est attestée par de nombreuses études. Un lien causal est plausible en raison des très nombreux effets du microbiote sur la physiologie de l'hôte. Même en l'absence de causalité, une association pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs utilisables en pratique clinique. Actuellement, un des défis majeurs dans les MIC est de permettre une thérapie personnalisée, ciblée. La recherche de biomarqueurs microbiotaux de réponse aux anti-TNFα est donc particulièrement intéressante, d'autant plus dans les SpA ou aucun facteur prédictif n'est clairement reconnu.

Par ailleurs, l'étude des effets directs du TNFα sur le microbiote intestinal présente un intérêt particulier dans la mesure où ils pourraient permettre une meilleure compréhension de l'action des anti-TNFα.

Hypothèses

Dans les MIC, la relation hôte-microbiote apparaît déséquilibrée pour plusieurs raisons, génétiques et environnementales.

L'étude approfondie de l'hôte, comprenant les GWAS, les profils cytokiniques et les données d'immunome disponibles, n'a pas abouti à l'obtention de résultats transposables en pratique clinique pour stratifier nos patients et leur proposer une prise en charge personnalisée.

Le défi thérapeutique dans ces maladies complexes est en effet de proposer rapidement le traitement le plus adapté.

Nos travaux se sont focalisés sur les traitements anti-TNFα, les plus anciennes biothérapies dans les MIC, dont le mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé.

Notre hypothèse est que les anti-TNFα permettent une restauration de l'homéostasie muqueuse intestinale entre l'hôte et le microbiote digestif, par une action sur l'hôte en modérant la réponse inflammatoire, mais également par une action directe sur les composants du microbiote digestif, *via* une régulation inter-règnes. Une composition particulière du microbiote digestif pourrait prédire l'efficacité thérapeutique, soit en étant elle-même « répondeuse » au traitement, soit en potentialisant son action, soit en reflétant un état inflammatoire particulier répondant particulièrement au traitement.

Objectifs

Notre projet de recherche comportait deux axes principaux :

1) Etude clinique
    - Etudier la composition du microbiote intestinal de patients atteints de spondyloarthrite, avant et après introduction d'un traitement par anti-TNFα, à la recherche en particulier de candidats au rôle de biomarqueur prédictif de la réponse clinique à ce traitement

2) Etude *in vitro*
    - Rechercher des effets directs du TNFα sur la croissance de microorganismes commensaux ou pathogènes

Résultats expérimentaux

Article 1 : la composition du microbiote intestinal de patients atteints de spondyloarthrite pourrait permettre de prédire le profil de réponse aux anti-TNFα

Les modifications de la composition du microbiote intestinal sont mal connues dans les SpA. Il existe de nombreux arguments en faveur, d'une part, de l'existence d'une inflammation digestive dans ces pathologies et, d'autre part, d'une association entre les modifications immunes que l'on retrouve dans ces pathologies et des modifications de composition du microbiote intestinal.

Notre travail avait pour objectif d'étudier les modifications de la composition du microbiote intestinal bactérien chez des patients atteints de SpA, avant l'initiation d'un traitement par anti-TNFα et trois mois après le début de ce traitement. Cette durée permettait de définir la réponse ou la non-réponse clinique, et donc d'établir *a posteriori* des associations entre composition du microbiote intestinal avant traitement et réponse clinique à trois mois. Ce type d'étude longitudinale avant/après traitement n'a jamais été réalisé dans les SpA.

L'étude du microbiote intestinal a été réalisée par séquençage du gène de l'ARNr 16S à partir d'échantillons de selles.

Chez 19 patients inclus, nous n'avons pas retrouvé de modification de taxon bactérien statistiquement significative après trois mois de traitement par anti-TNFα. Cependant, la diversité bactérienne avant traitement des patients non-répondeurs était inférieure à celle des répondeurs et des répondeurs partiels, et cette différence n'était plus visible après trois mois de traitement.
Un nœud taxonomique, l'ordre des *Burkholderiales*, était prédictif de la réponse clinique. Une plus grande concentration de *Burkholderiales* avant traitement était associée à une meilleure réponse clinique.
Cette étude suggère une influence croisée entre traitement par anti-TNFα et microbiote intestinal.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Microbiota Composition May Predict Anti-Tnf Alpha Response in Spondyloarthritis Patients: an Exploratory Study

Received: 13 November 2017
Accepted: 13 March 2018
Published online: 03 April 2018

Thomas Bazin[1,2], Katarzyna B. Hooks[3,4], Thomas Barnetche[5], Marie-Elise Truchetet[5], Raphaël Enaud[6,7,8], Christophe Richez[5], Maxime Dougados[9], Christophe Hubert[10,11], Aurélien Barré[3], Macha Nikolski[3,12] & Thierry Schaeverbeke[1,5]

Spondyloarthritis (SpA) pathophysiology remains largely unknown. While the association with genetic factors has been established for decades, the influence of gut microbiota is only an emerging direction of research. Despite the remarkable efficacy of anti-TNF-α treatments, non-responders are frequent and no predictive factors of patient outcome have been identified. Our objective was to investigate the modifications of intestinal microbiota composition in patients suffering from SpA three months after an anti-TNF-α treatment. We performed 16S rDNA sequencing of 38 stool samples from 19 spondyloarthritis patients before and three months after anti-TNF-α treatment onset. SpA activity was assessed at each time using ASDAS and BASDAI scores. Some modifications of the microbiota composition were observed after three months of anti-TNF-α treatment, but no specific taxon was modified, whatever the clinical response. We identified a particular taxonomic node before anti-TNF-α treatment that can predict the clinical response as a biomarker, with a higher proportion of Burkholderiales order in future responder patients. This study suggests a cross-influence between anti-TNF-α treatment and intestinal microbiota. If its results are confirmed on larger groups of patients, it may pave the way to the development of predictive tests suitable for clinical practices.

Spondyloarthritis (SpA) pathophysiology involves a genetic background, characterized by a strong association with the HLA-B27 genotype and a weak link with up to 40 other genes (IL-23R, ERAP1, TNFRSF15…)[1]. The role of some environmental factors has also been shown, such as smoking[2]. More recently, a large body of evidence has emphasized the implication of the gut in the SpA pathophysiology, and more specifically of an intestinal dysbiosis. In HLA-B27 transgenic rats, the germ-free animals failed to develop the disease phenotype that was restored by the introduction of bacteria in food supply, specifically with some bacterial cocktails containing *Bacteroidetes* species[3–5]. In human, overlap between SpA and inflammatory bowel disease (IBD) is common: about 5–10% of SpA patients develop IBD, while up to 30% of IBD patients may develop inflammatory arthritis[6,7]; moreover up to 60% of patients with SpA present microscopic gut inflammation[8,9]. In addition, clinical remission of SpA is always associated with normal digestive histology, while the persistence of rheumatic symptoms is mostly

[1]Univ. Bordeaux, INRA, Mycoplasmal and chlamydial infections in humans, EA 3671, 33000, Bordeaux, France. [2]Bordeaux Hospital University Center, Department of Hepato-gastroenterology, 33600, Pessac, France. [3]Univ. Bordeaux, Bordeaux Bioinformatics Center, 33000, Bordeaux, France. [4]Univ. Bordeaux, CNRS, Immunoconcept, UMR 5164, 33000, Bordeaux, France. [5]Bordeaux Hospital University Center, Department of Rheumatology, 33000, Bordeaux, France. [6]Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, FHU ACRONIM, Laboratoire 8 de Parasitologie-Mycologie, F-33000, Bordeaux, France. [7]CHU Bordeaux, Unité d'Hépatologie, Gastroentérologie et Nutrition Pédiatriques, CRCM Pédiatrique, Service 10 de Rhumatologie, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, 33000, Bordeaux, France. [8]INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000, Bordeaux, France. [9]AP-HP, Cochin Hospital University Center, Department of Rheumatology, 75014, Paris, France. [10]Univ. Bordeaux, INSERM, Rare Diseases, genetic and metabolism, U1211, 33000, Bordeaux, France. [11]Univ. Bordeaux, Genome Transcriptome Facility of Bordeaux, 33000, Bordeaux, France. [12]Univ. Bordeaux, CNRS, LaBRI, UMR 5800, 33400, Talence, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.S. (email: thierry.schaeverbeke@chu-bordeaux.fr)

associated with a persistent intestinal inflammation[10]. These data suggest a close physiopathological link between gut inflammation and SpA, the recent demonstration of the crucial role of the gut microbiota in IBD raising the same query in SpA[11].

Five Next-Generation DNA Sequencing (NGS) studies compared the gut microbiota of patients suffering from SpA spectrum disease with that of healthy controls. Stoll *et al.* examined gut microbiota of 25 pediatric patients with enthesitis-related arthritis and 13 healthy controls[12]. They showed that these patients exhibited a significant reduction of *Faecalibacterium prausnitzii*, as observed in Crohn's disease. Costello *et al.* studied terminal ileal biopsies obtained during colonoscopy in nine ankylosing spondylitis (AS) patients and nine controls. They observed an increase in *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, *Prophyromonadaceae* and *Bacteroidaceae* and a decrease in *Ruminococcaceae* and *Rikenellaceae* in patients compared with healthy control subjects[13]. Still in AS, Wen *et al.* performed a quantitative metagenomic study on 97 AS patients and 114 healthy controls. They found in AS patients an increase in the abundance of *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella copri*, and *Prevotella* sp. C561 and *Bifidobacterium* genus, and a decrease in *Bacteroides* spp.[14].

Concerning SpA, Tito *et al.* performed investigation of bacterial composition from ileal and colonic biopsies from 27 SpA patients[15]. They found different microbial profiles associated with the status of inflammation in the tissue and observed positive correlation between abundance of *Dialister* sp. and Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS). More recently, Breban *et al.* compared microbiota composition of 87 SpA patients to that of 69 controls. Microbial diversity was lower in SpA patients, with a marked increase of *Ruminococcus gnavus*[16].

Tumour necrosis factor alpha (TNF-α) inhibitors have revolutionized the treatment of SpA patients who failed to respond to NSAID and conventional Disease-Modifying Anti-rheumatic Drugs (DMARDs)[17,18]. However, non-response to this biotherapy is a major concern for clinicians, as only about 30 to 50% of patients exhibit a meaningful clinical response[19,20]. The mechanism of action of these widely-used molecules is still a matter of debate. The most commonly accepted hypothesis is that, by acting on host immune cells, they down-regulate the inflammatory cascade leading to clinical symptoms[21].

In this context, the aim of our study was to investigate the modification of the intestinal microbiota three months after the introduction of an anti-TNF-α treatment and to look for a relationship between the characteristics of the microbiota composition at M0 and the clinical response to treatment.

Methods

All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Study design and patients. We conducted a bicentric prospective observational hospital-based exploratory study from September 2013 through August 2015 at the Rheumatology departments of the Bordeaux University Hospital and of Cochin University Hospital in Paris. Patients' inclusion criteria were as follows: (i) at least 18 years of age, with a diagnosis of axial only or axial and peripheral SpA fulfilling the ASAS imaging criteria, (ii) naïve to anti-TNF-α, justifying the initiation of an anti-TNF-α treatment according to current guidelines (recommendations of the French Society for Rheumatology)[22] and (iii) affiliated to health insurance. Exclusion criteria were as follows: patients with (i) an inflammatory bowel disease, (ii) an history of bowel resection or digestive stoma, or under antibiotic treatment in the three months before inclusion, (iii) any contra-indication to anti-TNF-α therapy, (iv) refusal to sign the informed consent or linguistic or cognitive difficulties that did not allow a full understanding of the consent form, (v) pregnancy or breastfeeding, or the refusal to follow an effective contraception method for all the study duration (for women).

Informed consent was obtained from study participants. The non-interventional character of this study has been approved by the ethical committee "CPP Sud-Ouest et Outremer III". All enrolled patients were followed in the service of rheumatology at Bordeaux University Hospital or Cochin University Hospital, where a first anti-TNF-α treatment for SpA was initiated. Clinical characteristics of SpA were registered at two times of stool sampling, at enrollment (M0) and after three months of biotherapy (M3); activity was assessed using ASDAS and BASDAI scores[23]. The lack of clinical response was defined by an ASDAS improvement ≤ 1, partial response by an ASDAS improvement between 1 and 2 and clinical response by an ASDAS improvement ≥ 2. CRP levels and HLA-B27 status were obtained by systematic blood tests.

The choice of anti-TNF-α drug and dosage was left to the discretion of the clinicians in accordance with standard practices. Possible combination with other treatments (immunosuppressant agents, corticosteroids, non steroidal anti-inflammatory drugs) has been left up to the clinicians and recorded in the Supplementary Table 1.

Sample collection and DNA extraction. Stool samples were collected at M0 and M3 and frozen at −80 °C within 24 hours after collection. DNA contained in feces was extracted with Dneasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) according to DNeasy Blood & tissue handbook (Qiagen). In order to optimize the extraction for Gram-positive bacteria, we added a combination of lysostaphin and lysozyme (20 mg/ml in lysis solution). We then used silica columns, provided with the previously described kit, to separate DNA from other prokaryotic cells components.

16S amplification. 16S DNA from 38 samples (19×2) was amplified using 2x Phusion GC Master mix and primers 515 F and 806 R (5′CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA and 5′GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT, respectively), targeting variable V4 region of 16S bacterial DNA. Maximal expected amplicon length of 347 bp was compatible with direct paired-end MiSeq Illumina sequencing. The DNA was amplified using Master Mix Phusion GC Buffer (New England Biolabs®). PCR conditions were as follows: 30 ng of DNA, two primers with final concentration 10 µM each, 25 µl of Master Mix Phusion GC Buffer, and completion with water leading to a final volume of 50 µl. Cycle conditions were as follows: 1 cycle of 98 °C, 30 s (hot start activation); 25 cycles of 98 °C,10 s (denaturation)/60 °C,

30 s (hybridation)/72 °C, 45 s (elongation); and 72 °C during 7 min (final elongation). Then, purification with magnetic beads was performed (Beckman Agencourt® AMPure).

Library build and sequencing. Resulting libraries were pooled, normalized and denatured according to Illumina protocol. Samples were then deposited on a MiSeq flowcell 15 M and sequenced using the MiSeq Illumina® sequencer at the Genome Transcriptome facility of the University of Bordeaux, generating paired-end reads of 2 × 250 bp. Raw data have been deposited in the ENA sequence read archive (ENA accession number PRJEB23107).

16S bioinformatic sequence analysis. Raw reads were quality filtered using the NGS QC toolkit (version 2.3.3)[24] and kept if both of the paired reads passed the filter criteria. The cutoff for quality score was >20 Q30 and >70% of the total read length should have high-quality bases. Possible human contamination was filtered out by mapping the remaining high quality reads against the human genome (*Homo sapiens* alternate assembly HuRef GCF_000002125.1) using BWA (version 0.7.12)[25] with default parameters. Possible chimeric sequences were further identified and eliminated using DECIPHER (version 2.14.1)[26]. Remaining reads were aligned with BWA against the 16S sequences contained in the GreenGenes database (v13.5)[27] keeping all the hits (Supplemental Table 2).

Two complementary methods for analyzing microbiota composition were used: operational taxonomic units (OTU) and taxonomic assignment with tango. First remaining reads after filtering were classified using USEARCH_global method of VSEARCH v2.3.0[28] against 16S OTUs from GreenGenes database with a 97% identity threshold. We have further analysed microbiota richness of our samples by building rarefaction curves based on the OTU computation with the R package vegan[29]. Microbiota alpha diversity as expressed by Shannon and Simpson indexes was computed from the OTU occurrence matrix. To calculate phylogenetic beta diversity, we used a weighted UniFrac metric[30] implemented by R package phyloseq.[31] by inputting OTU table (Supplemental Table 3) and GreenGenes OTU tree. Then, to robustly deal with the reads mapped to multiple taxa, we used Tango for taxonomic assignment with *q*-value parameter set to 0.5[32]. This approach allows using ambiguous reads by assigning them to higher taxonomic ranks. Consequently, the number of reads assigned to the root was equal to the total number of high quality reads of the sample. Number of reads assigned at every taxonomic node was normalized by the total number of reads in each sample. Normalized counts of all samples were combined in a global occurrence matrix (Supplemental Table 4).

Prediction of bacterial function. Biological function of the assigned microbiota was predicted using predictive functional metagenome PICRUSt method[33]. Briefly, OTU table was normalized by copy number using precomputed tables of gene counts from GreenGenes. The mean of weighted nearest sequenced taxon index scores of 0.082 ± 0.018 suggest a good imputation quality. KEGG orthologs prediction was used to identify gene families. In total 328 KEGG pathways were imputed. Pathways with no proportion higher than 90% were removed, leaving 279 pathways. Pathways were analyzed using DESeq. 2, a *p*-value threshold of 5% and ratio change of more than 5% was considered significant.

Statistical analysis. Nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare quantitative variables between groups. Correlations were calculated using Spearman method. Correction for multiple-testing was performed using Benjamini Hochberg test. LEfSe method was used to discover metagenomic biomarkers[34].

Ethics approval and consent to participate. Ethical committee CPP Sud-Ouest et Outremer III; informed consent was sought from study participants.

Availability of data and material. The datasets supporting the conclusions of this article (raw data) are available in the ENA sequence read archive (ENA accession number PRJEB23107).

Results

Patients. Nineteen patients were recruited. Given the rarefaction curves, we excluded patient P6 since the asymptote was not reached in the M0 sample for this patient (Supplemental Fig. 1). Consequently, the analysis of microbiota sequencing was performed for 18 out of 19 patients who participated in the study (Table 1 and Supplemental Table 1) and P6 does not appear in figures.

None of them has been treated with any of the biologic DMARDs prior to the study and they were considered eligible for anti-TNF-α treatment. Nine patients were referred by Cochin Hospital and nine by Bordeaux Hospital; 13 men and 5 women presented with axial Ankylosing Spondylitis (N = 3) or axial and peripheral Ankylosing Spondylitis (N = 15). Fifteen of them were HLA-B27 positive. Prior to the beginning of the study, the median Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS) value was 2.9 ± 0.8. Fifteen patients received etanercept, two received adalimumab and one received infliximab. At time M3, eight patients were determined not to have responded to the treatment (ASDAS improvement ≤1), whereas five patients exhibited substantial improvement (Δ ASDAS ≥1.1) and another five patients exhibited a major positive response (Δ ASDAS ≥2). BASDAI and ASDAS scores were higher in non-responding patients (Table 2, *p*-value = 0.007 and *p*-value = 0.048, respectively). CRP levels were higher in responding patients (*p*-value = 0.012). No difference was found between the groups in terms of sex ratio, age, disease duration or HLA-B27 status.

Microbiota composition description. The median number of high-quality reads per patient was 913,431 (from 223,961 to 2,131,801). After removing singletons, reads were assigned to 24,732 unique OTUs. We used the taxonomic assignment to compare the profiles of patients' microbiota at a phylum-level (Fig. 1). The fecal microbiota of most patients was characterized by a very high proportion of Firmicutes followed by Bacteroidetes,

Patients N	18
Females	5 (28%)
Age (years)*	37 ± 14
Disease duration (years)*	2 ± 14
HLA-B27 positive	15 (83%)
Localisation	
Axial	3 (17%)
Axial and peripheral	15 (83%)
M0	
CRP (mg/L)*	7 ± 10.7
ASDAS*	2.9 ± 0.8
BASDAI*	4.9 ± 1.7
M3	
CRP (mg/L)*	2 ± 1.2
ASDAS*	1.4 ± 0.9
BASDAI*	2.0 ± 2.3
Response at M3	
non responder (NR)	8 (44%)
partial responder (PR)	5 (28%)
responder (R)	5 (28%)
Δ ASDAS*	1.3 ± 1.2

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients. *Medians ± SD.

Clinical response	R (n = 5)	PR (n = 5)	NR (n = 8)
Females	0 (0%)	2 (40%)	3 (37%)
Age (years)*	24 ± 10.1	40 ± 19.8	37 ± 9.7
Disease duration (years)*	2 ± 1.5	7 ± 23.3	1 ± 10.6
HLA-B27 positive	4 (80%)	4 (80%)	7 (87%)
Localisation			
Axial	3 (17%)	4 (17%)	5 (17%)
Axial and peripheral	15 (83%)	16 (83%)	17 (83%)
CRP (mg/L) at M0*	12 ± 15.5	8 ± 4.8	2 ± 3.2
ASDAS at M0*	4.0 ± 0.6	2.4 ± 0.4	2.2 ± 0.8
BASDAI at M0*	1.0 ± 0.4	1.8 ± 0.6	5.0 ± 2.2
Δ ASDAS*	2.8 ± 0.5	1.3 ± 0.3	0.1 ± 0.7

Table 2. Demographic and clinical characteristics of patients according to clinical response. *Medians ± SD.

Tenericutes and Proteobacteria. Patient 19, who exhibited the most aggravating disease despite treatment as shown by negative ΔASDAS score and increased inflammation confirmed by a higher level erythrocyte sedimentation rate at M3 *vs* M0, (Supplementary Table 1), exhibited a clearly different microbiota profile with more Proteobacteria than other patients at M0 and M3.

Effect of the anti-TNF-α treatment on microbiota composition. First we compared the global composition of the fecal microbiota at M0 and M3. For all patients as well as for responder or non-responder subgroups, some modifications were observed after treatment, but differences were not significant after multiple-test correction.

Subsequently, we compared the microbiota composition before and after treatment at the taxonomic levels: order, family, genus and species. There were a number of taxa that differ in proportion at the two time-points (Supplementary Table 4), with four decreasing and 15 increasing at M3. These differences were not significant after multiple-test correction. In addition, no characteristic for M0 or M3 microbiota composition was observed using LEfSe method.

Still using taxonomic assignment, we then compared the variation of proportion of each taxa between M0 and M3 for each patient with the mean value of variation in all patients. This comparison is expressed as a z-score, which is the number of standard deviations that separate the value of interest from the mean of all the values. A value below the mean gives a negative z-score, indicating a significant decrease of the taxa when a value above the mean gives a positive z-score, corresponding to an increased proportion of the taxa. Ratio-normalized reads assigned with Tango were summed at the order level and z-scores were calculated between M0 and M3 for each patient and filtered by $|z| > 100$ (see Supplemental Table 5). Patients that responded well to treatment had few

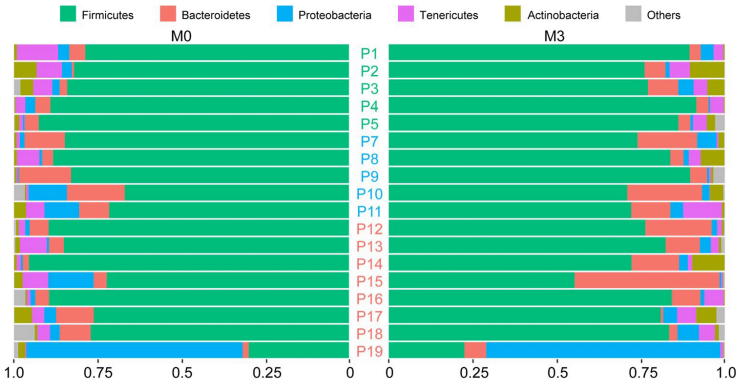


Figure 1. Proportion of reads assigned to different phyla. For each patient reads assigned with Tango were summed up at the phylum level. Proportions of reads belonging to five dominant phyla coloured according to the legend above are shown. Each row corresponds to one patient at M0 and M3, left and right, respectively. P1-P5 responders (green), P7-P11 partial responders (blue), P12-P19 non responders (red). Median proportions per phylum ± SD are as follows: Firmicutes − 0.82 ± 0.15, Bacteroides − 0.05 ± 0.08, Tenericutes − 0.03 ± 0.03, Proteobacteria 0.02 ± 0.15.

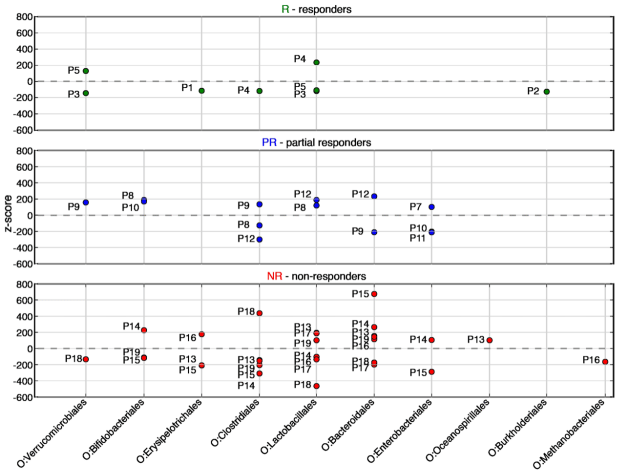


Figure 2. z-scores analysis at the order level. Each point represents z-score between M0 and M3 for one order for one patient. Dots above the zero black dotted represent an increase in the corresponding taxa's proportion in the corresponding patient's gut microbiome after the TNF alpha treatment, while dots below this line represent a decrease. Reads assigned with Tango were summed up for each patient at the order level and normalized. The z-scores were calculated between proportions of reads of each order at M0 and M3 (relative to the total number of reads in the sample) for each patient and filtered by $|z| > 100$. P1-P5 responders (green), P7-P11 partial responders (blue) P12-P19 non responders (red).

taxa changing after treatment, and changes were moderate, with most of taxa (6 out of 8) being reduced. Whereas for each of the non-responding patients many bacterial orders exhibited drastic changes (Fig. 2), the corresponding taxa increased or decreased chaotically in their proportion. These results suggest that patients who did not respond to anti-TNF-α treatment had high disease activity and unstable microbiota composition.

Finally we analyzed the alpha and beta-diversity of the samples. Alpha diversity evaluates within-community diversity, i.e. diversity at the scale of one sample. Beta-diversity compares the composition of different communities, i.e. of different samples. Upon comparing alpha diversity as assessed by Shannon and Simpson indices

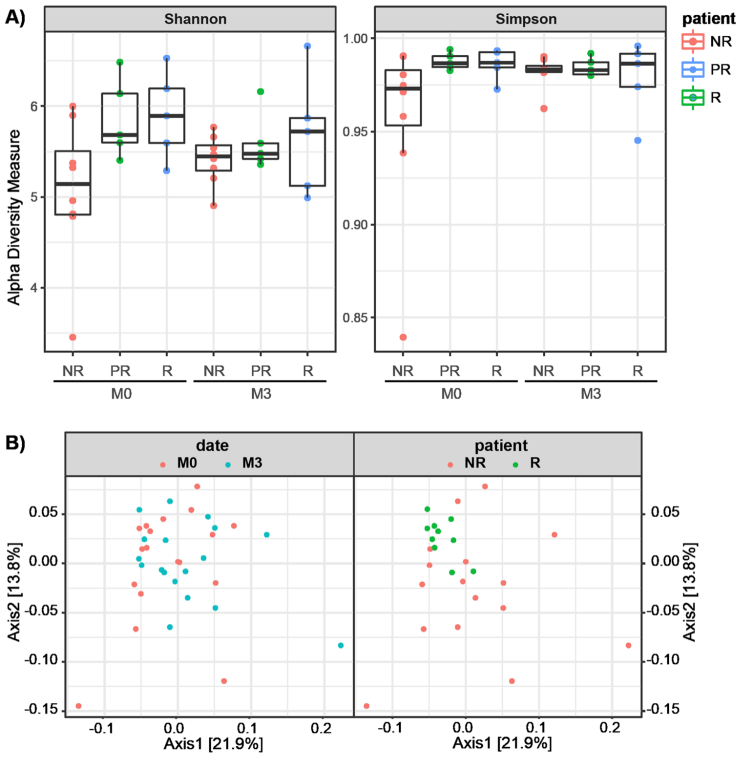


Figure 3. Diversity plots for microbiota patient samples. (**A**) Shannon and Simpson diversity indices calculated based on OTU analysis for each type of patient at M0 and M3. Shannon index for NR is significantly different than for R at M0 (two-tailed *t*-test with unequal variance, p-value = 0.04). (**B**) PCoA plot of β-diversity calculated by weighted UniFrac distances on OTU occurrence table. Left graph is coloured by the date of the sample. Timepoints M0 and M3 do not form separate clusters (ANOSIM, R = −0.011, p-value 0.641). Right plot is colored by the type of patient's response (partial responders are removed for clarity). Patients with different level of response form significant clusters (ANOSIM, R = 0.1032, p-value 0.042).

we observed a difference between responder (R) and non-responder (NR) patients at M0 (Fig. 3A). The clinical response to anti-TNF-α treatment observed for a given patient at M3 correlated with the observed sample diversity at M0 (Spearman r = 0.54, *p*-value = 0.022). This suggests that patients with reduced initial microbiota diversity are more likely to fail to the anti-TNF-α treatment. However, the treatment abolishes the differences among patient groups as shown by the absence of any differences among the Shannon and Simpson indices calculated at M3, suggesting that, independently to the clinical response, anti-TNF-α treatment was able to restore the fecal microbial diversity in all patients. There was no relationship between any specific drug (etanercept, adalimumab and infliximab) or clinical feature of the disease (axial, peripheral, severity…) and microbiota diversity at the beginning or at the end of the study. When phylogenetic beta-diversity, assessed by weighted UniFrac, was used to establish microbiota distances among patients, there was no apparent grouping of patients before and after treatment (Fig. 3B, left graph). In contrast, microbiota profiles of R (M0 + M3) appeared to aggregate compared to non-responders (Fig. 3B, right graph). Microbiota within responding patients appeared to be more uniform compared to that from non-responding patients, the latter being revealed as a random scattering of the points on the PCoA plot (Fig. 3B, right graph).

Microbial composition can predict response to anti-TNF-α treatment. We focused on the two subgroups of patients - those strongly responding to anti-TNF-α treatment (R, Δ ASDAS ≥2, n = 5) and those showing no response (NR, Δ ASDAS ≤1, n = 8) and we looked for the microbiota composition at M0 that could be predictive of the treatment outcome. We found multiple taxa at different levels to be differentially present between R and NR at M0, however after multiple test correction these results became not significant (Supplementary Table 5).

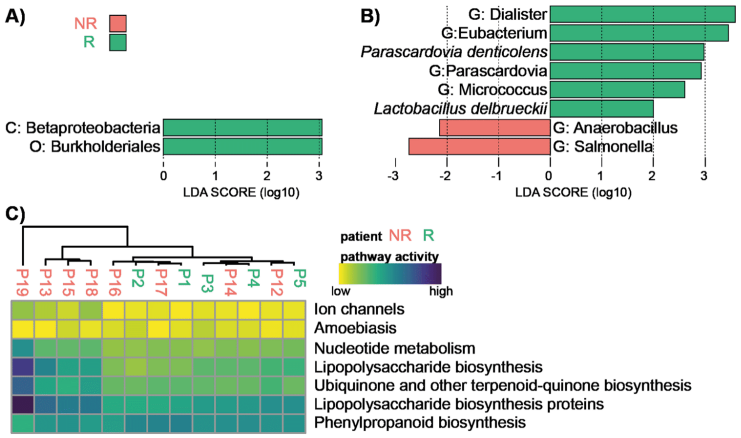


Figure 4. Biomarkers of responders and non-responders. LEfSE analysis distinguishing characteristics of taxonomic composition of responders and non-responders at M0 (**A**) and M3 (**B**). Biomarkers are coloured according to the legend. Taxa of higher level than species are denoted as follows: G: genus, C: class and O: order. (**C**) Heatmap showing most diversely activated pathways between responders and non-responders at M0 as predicted by PICRUSt.

Using LEfSe analysis, we found two taxonomic nodes at M0 that can predict clinical response at M3 in our population: Betaproteobacteria class and, belonging to it, Burkholderiales order (Fig. 4A). AUC was 0.86 when testing Burkholderiales order abundance at M0 as a predictor of clinical response at M3 (Figure S2).

Similarly, at M3 many taxonomic levels appear to be differentially present when R and NR were compared (Supplementary Table 6). Again, after multiple test correction these results became not significant.

LEfSe analysis confirmed the results of the Wilcoxon test and indicated genus *Dialister* as the most strongly correlated with the responding patients at M3 in our population. Non-responders were characterized by the presence of genus *Salmonella* (Fig. 4B).

Prediction of bacterial function. Additionally, we used PICRUSt[33] to infer functions performed by microbiota using KEGG pathways database. This computational analysis allows to predict the metagenome functional content, matching genes of species found in our samples with a database that links gene sequences to metabolic functions. We found that at M0, microbiota of half of NR patients presented higher proportion of bacteria that have predicted genes involved in synthesis of lipopolysaccharides, ubiquinone and phenylpropanoids (Fig. 4C), that was not found in any R patients. Other non-responding patients have a profile of microbiota function very similar to that of responders. Patient 19 with an atypical phylum composition is the most distant compared to other patients also in terms of present microbial pathways.

Discussion

Strength and weakness of this study. Our study did not compare intestinal microbiota of patients with those of healthy people, so it does not establish the nature of the dysbiosis that is highly suspected to play a key role in the pathogenesis of SpA. Furthermore, we did not compare groups of patients treated either by anti-TNF-α or by all treatment but anti-TNF-α, so we cannot affirm that modifications of microbiota are specifically related to this pharmacological class. Moreover, although the majority of patients were treated by etanercept, the anti-TNF-α treatment was heterogeneous in our cohort making each conclusion more difficult, especially considering that *in vitro* and *in vivo* effects are different depending on molecules[35]. In particular, as we will discuss further, etanercept is expected to exert specific effects on microbiota. The small number of patients treated by other molecules than etanercept enabled us to focus on specific effects of this molecule. Some of our patients received other DMARDs than biologics; that could bias microbiota composition even if DMARDs consequences on microbiota composition are largely unknown. Generally, as our cohort was small, the power of our statistical analysis was limited.

We found that R patients had higher ASDAS scores and CRP at baseline; these results are coherent with previous studies[36,37], which increases the external validity of our study.

We estimated intestinal microbiota by fecal microbiota analysis, even if the two are not equivalent[38]. However, using stool samples is the easiest way to assess intestinal microbiota, especially in patients without any digestive symptoms, and therefore do not require an endoscopy. Moreover, non-invasive methods are more suitable for developing biomarkers.

Our study is based on 16S rDNA sequencing, which allows only a partial view of microbiota focused on bacteria. Virobiota, mycobiota and eucaryota of intestinal tract are therefore not considered in this study, and dynamic interactions between all these microorganisms are consequently not encompassed, although many studies have shown implications of these actors in IBD physiopathology in particular and in human health in

general[39]. Moreover, the quantification of taxonomic nodes is only relative since we use a ratio between the number of reads of a given taxonomic node and the total number of bacterial reads. In addition, 16S rDNA analysis is not discriminant enough for some close species. Quantitative PCR could allow more precise inter-sample comparisons. Although our predictive metabolic functional analysis is computational, it predicts the abundance of gene families with quantifiable uncertainty[33].

We have not specifically screened inflammatory digestive manifestations in our population, so we have not evaluated the overlap between rheumatologic and digestive clinical manifestations, which could influence the results. We also did not take into account differing diets of patients.

Impact of TNF-α inhibitors on microbiota. In this study we have not shown significant modification of particular taxa after treatment, probably due to low statistical power, but diversity seemed to be restored at M3 in NR.

Modifications of microbiota composition by TNF-α inhibitors could be caused either by indirect or direct effects. These treatments are well-known to heal and profoundly down-regulate inflammation in the wounded digestive mucosa, therefore restoring normal structure of digestive epithelium[40] and control and tolerance functions toward mucosal microbiota. Thus, they could indirectly change microbiota composition.

More precisely, etanercept exerts a specific action on the host, which could be explained by its structure. Etanercept is a recombinant TNF receptor-Fc fusion protein[41]. Etanercept inhibits not only TNF-α but also soluble TNF-ß, aka lymphotoxin-α, while infliximab and adalimumab are monoclonal antibodies that are exclusively directed against TNF-α. Soluble form of lymphotoxin-α controls IgA induction in the lamina propria, and through this process controls microbiota composition[42]. Thus, the effects of etanercept could modify intestinal microbiota composition in a different way from the others TNF-α inhibitors *via* reduced IgA levels.

Direct action on the intestinal microbiota, *via* an inter-reigns regulation (inter-kingdom interaction), is suggested by several studies[43,44]. The existence of membrane-bound bacterial receptor to TNF-α has been anciently suspected, especially on gram negative bacteria[45]; in this study the presence of TNF-α seemed to increase virulence of *Shigella flexneri*. *In vitro* studies are needed to test the effects of TNF-α inhibitors used in clinical practice on bacterial gut commensals.

Microbiota profiles as biomarkers of response to treatment. One of our more interesting results was that microbiota composition could predict clinical response to anti-TNF. Interestingly, such predictive capacity has been emphasized in multiple studies concerning various diseases. Overall diversity as well as presence or absence of specific taxa have been shown to be biomarkers of disease or response to treatment in other disorders. For example, intestinal microbiota has been proposed as a prognosis factor in colorectal cancer[46]. In advanced stages of colorectal cancer an increased colonic colonization by cyclomodulin-producing *E. coli* and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Fusobacterium nucleatum* has been reported, suggesting a potential use of microbiota as a colorectal cancer prognosis biomarker[46]. Moreover, it has been suggested that chemotherapy toxicity could be dependent on microbiota composition[47]. Indeed, microbial-produced β-glucuronidases modulate irinotecan digestive toxicity[48]. In case of digestive tumors an intact gut microbiota is needed to obtain an optimal response to oxaliplatin. Indeed, microbiota together with the immune system augment intra-tumor oxaliplatin damages, modulating tumor oxidative microenvironment[49]. In melanoma, microbiota composition can predict resistance to immunotherapy-induced colitis and peculiar microbiota species can condition or potentialize CTLA4 or PD-L1 therapy effects[50–53]. Another recent study in ulcerative colitis patients treated by anti-TNF therapy revealed lower dysbiosis indices and higher abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in responders compared with non-responders at baseline. Furthermore, the authors showed that responders and non responders exhibited distinct mucosal antimicrobial peptides expression patterns[54]. Moreover, a recent study has shown that low concentrations of *F. prausnitzii* are correlated with early recurrence of Crohn's disease after anti-TNF-α treatment interruption[55]. Studies in the field of rheumatology have shown that rheumatoid arthritis patients have altered gut and mouth microbiomes that are partly normalized after DMARDs treatment[56] and could predict response to treatment[57]. However, the effect on the gut microbiome was shown to be moderate compared to the oral microbiome. Patients that responded well to treatment were characterized by a greater number of virulence factors before treatment and also by the reduction in *Holdemania filiformis* and *Bacteroides* sp. after treatment[56]. It should be noted that all these results concern other diseases than SpA. Given the differences in physiopathology, changes in the microbiota composition may also be different.

Comparison with previous results. Similarly to Zhang *et al.*[56], whose approach in rheumatoid arthritis patients did not find large differences in gut microbiota composition before and after non-biologic DMARDs treatment, in our small cohort we only observed moderate changes with limited statistical significance. However, those differences are consistent with the previous studies of microbiota in spondyloarthritis. First, we observed an increase of Proteobacteria in patient 19. This phylum has a low abundance in gut flora of healthy subjects and its increase have been associated with gastric bypass, metabolic disorders, inflammation and cancer[58], which is consistent with our observation of unresolved inflammation in this patient. Second, we observed higher proportions of pathogenic and potentially pathogenic species in NR patients, specifically *Klebsiella oxytoca* and *Salmonella* sp. It has been shown before that AS patients produce higher levels of anti-*Klebsiella* and anti-*Enterobacter* secretory IgA, which have been hypothesized to interact with self-antigen HLA B27 and promote disease progression[59]. It is also known that some gastrointestinal (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp. and *Campylobacter* sp.) and urethral infections (*Chlamydia* sp.) can trigger reactive arthritis and up to 20% of those cases will develop AS within 10–20 years[60,61]. Considering that NR patients are characterized by the presence of *Salmonella* sp., especially at M3 sampling time, we hypothesize that this might be a contributing factor in their SpA development. Third, previous reports indicated the changes in Bacteroides associated with the state of the disease. The direction of

the changes varies depending on the cohort[13,15]. In our study we observed that all NR patients showed a change in Bacteroides order: five of them had an increase and two a decrease, whereas R patients were not affected. This result suggests that the proportion of this bacteria order varies significantly in rheumatoid conditions.

Interestingly, R patients at M3 also exhibit higher proportion of *Lactobacillus delbrueckii*, species known to carry out the fermentation of kefirs and which has been previously proposed as probiotic in treatment for IBD[62].

Magnusson *et al*. showed that abundance of *F. prausnitzii* increased in ulcerative colitis patients during induction therapy by anti-TNF-α in R, and not in NR[54]. A recent study in Crohn's disease patients has shown changes in the microbiota composition after TNF-α inhibitor (adalimumab) treatment, with recovery of phylogroups (Firmicutes, Bacteroides and Actinobacteria) and decrease of *E. coli* during treatment[63]. We didn't found comparable results in our study, but our patient population and treatment molecules were different.

We observed microbiota composition instability over time in NR. Major shifts in microbiota composition have been associated with diseases such as IBD and neurodevelopmental disorders[64], but never with spondyloarthritis.

Perspectives. It is now clearly established that subclinical or even symptomatic gut inflammation is associated with SA; nevertheless relationships between cause and effect remain to be established[65]. In the same way, we have only observed an association between microbiota composition clusters and clinical response, without presuming causality. Nonetheless, these results suggest that a specific fecal microbiota signature could be predictive of a good clinical response to the anti-TNF-α treatment, for which no biomarkers currently exist. It could be particularly clinically relevant to have a reliable test before the initiation of this type of treatment, to first avoid a delay in symptom relief, and second to ease the financial burden on health services. Prospective studies are required to confirm these results.

The stability of microbiota composition is considered to be critical for human health in general, and results from a competitive equilibrium within microbiota's diverse bacterial, fungal and viral components[64]. Microbiota stability in patients could be a good prognostic factor in itself. This hypothesis would require longitudinal long-term studies in order to be confirmed.

Conclusions

In this study based on microbiota composition analysis before and three months after treatment with TNF-α inhibitors, no specific taxon was observed to be consistently modified by the treatment. Nevertheless, each of NR patients displayed drastic differences before and after treatment in microbiota composition at order level, whereas R patients displayed only few mild differences, suggesting a higher stability of microbiota composition in R patients. Alpha-diversity of non-responders was lower at M0 compared to two other groups (PR and R) and this difference was rectified after anti-TNF-α treatment. High proportion of Burkholderiales at M0 was associated with the clinical response at M3, as high proportion of *Dialister* sp. at M3. All these results suggest possible biomarkers for anti-TNF-α efficacy in SpA patients.

References

1. Brown, M. A., Kenna, T. & Wordsworth, B. P. Genetics of ankylosing spondylitis–insights into pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 81–91 (2016).
2. Lukas, C., Dougados, M. & Combe, B. Factors associated with a bad functional prognosis in early inflammatory back pain: results from the DESIR cohort. *RMD Open* **2**, e000204 (2016).
3. Taurog, J. D. *et al*. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med.* **180**, 2359–2364 (1994).
4. Rath, H. C. *et al*. Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J. Clin. Invest.* **98**, 945–953 (1996).
5. Lin, P. *et al*. HLA-B27 and human β2-microglobulin affect the gut microbiota of transgenic rats. *PloS One* **9**, e105684 (2014).
6. Shivashankar, R. *et al*. Incidence of spondyloarthropathy in patients with Crohn's disease: a population-based study. *J. Rheumatol.* **39**, 2148–2152 (2012).
7. Shivashankar, R. *et al*. Incidence of Spondyloarthropathy in patients with ulcerative colitis: a population-based study. *J. Rheumatol.* **40**, 1153–1157 (2013).
8. Mielants, H., Veys, E. M., Cuvelier, C. & De Vos, M. Course of gut inflammation in spondylarthropathies and therapeutic consequences. *Baillières Clin. Rheumatol.* **10**, 147–164 (1996).
9. Van Praet, L., Jacques, P., Van den Bosch, F. & Elewaut, D. The transition of acute to chronic bowel inflammation in spondyloarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 288–295 (2012).
10. Cypers, H., Van Praet, L., Varkas, G. & Elewaut, D. Relevance of the gut/joint axis for the management of spondyloarthritis in daily clinical practice. *Curr. Opin. Rheumatol.* **26**, 371–376 (2014).
11. Costello, M.-E., Robinson, P. C., Benham, H. & Brown, M. A. The intestinal microbiome in human disease and how it relates to arthritis and spondyloarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **29**, 202–212 (2015).
12. Stoll, M. L. *et al*. Altered microbiota associated with abnormal humoral immune responses to commensal organisms in enthesitis-related arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 486 (2014).
13. Costello, M.-E. *et al*. Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ*, https://doi.org/10.1002/art.38967 (2014).
14. Wen, C. *et al*. Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis. *Genome Biol.* **18**, 142 (2017).
15. Tito, R. Y. *et al*. Dialister as microbial marker of disease activity in spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ*, https://doi.org/10.1002/art.39802 (2016).
16. Breban, M. *et al*. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1614–1622 (2017).
17. Sedger, L. M. & McDermott, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 453–472 (2014).
18. Ward, M. M. *et al*. American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network 2015 Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**, 282–298 (2016).
19. Moltó, A., Paternotte, S., Claudepierre, P., Breban, M. & Dougados, M. Effectiveness of tumor necrosis factor α blockers in early axial spondyloarthritis: data from the DESIR cohort. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 1734–1744 (2014).

20. Maxwell, L. J. *et al*. TNF-alpha inhibitors for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst. Rev*. CD005468 https://doi.org/10.1002/14651858.CD005468.pub2 (2015).
21. Byng-Maddick, R. & Ehrenstein, M. R. The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **54**, 768–775 (2015).
22. Société Française de Rhumatologie: Les fiches anti-TNF alpha. Available at: http://www.rhumatologie.asso.fr/05-Bibliotheque/fiches-anti-tnf-Spondy.asp. (Accessed: 16th August 2017).
23. Braun, J., Kiltz, U., Baraliakos, X. & van der Heijde, D. Optimisation of rheumatology assessments - the actual situation in axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **32**, S-96–104 (2014).
24. Patel, R. K. & Jain, M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PloS One* **7**, e30619 (2012).
25. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **25**, 1754–1760 (2009).
26. Wright, E. S., Yilmaz, L. S. & Noguera, D. R. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 717–725 (2012).
27. DeSantis, T. Z. *et al*. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5069–5072 (2006).
28. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**, e2584 (2016).
29. Oksanen, J. *et al*. *vegan: Community Ecology Package*. (2017).
30. Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J. & Knight, R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J.* **5**, 169–172 (2011).
31. McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One* **8**, e61217 (2013).
32. Alonso-Alemany, D. *et al*. Further steps in TANGO: improved taxonomic assignment in metagenomics. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**, 17–23 (2014).
33. Langille, M. G. I. *et al*. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **31**, 814–821 (2013).
34. Segata, N. *et al*. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, R60 (2011).
35. Nesbitt, A. *et al*. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): *in vitro* comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 1323–1332 (2007).
36. Arends, S. *et al*. Baseline predictors of response and discontinuation of tumor necrosis factor-alpha blocking therapy in ankylosing spondylitis: a prospective longitudinal observational cohort study. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R94 (2011).
37. Brown, M. A. *et al*. Evaluation of the effect of baseline MRI sacroiliitis and C reactive protein status on etanercept treatment response in non-radiographic axial spondyloarthritis: a post hoc analysis of the EMBARK study. *Ann. Rheum. Dis*. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211313 (2017).
38. Hong, P.-Y., Croix, J. A., Greenberg, E., Gaskins, H. R. & Mackie, R. I. Pyrosequencing-Based Analysis of the Mucosal Microbiota in Healthy Individuals Reveals Ubiquitous Bacterial Groups and Micro-Heterogeneity. *PLoS ONE* **6** (2011).
39. Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. & Knight, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* **148**, 1258–1270 (2012).
40. Baert, F. J. *et al*. Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* **116**, 22–28 (1999).
41. Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. & Tak, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* **117**, 244–279 (2008).
42. Kruglov, A. A. *et al*. Nonredundant Function of Soluble LTα3 Produced by Innate Lymphoid Cells in Intestinal Homeostasis. *Science* **342**, 1243–1246 (2013).
43. Hughes, D. T. & Sperandio, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 111–120 (2008).
44. Lesouhaitier, O. *et al*. Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. *Sensors* **9**, 6967–6990 (2009).
45. Luo, G., Niesel, D. W., Shaban, R. A., Grimm, E. A. & Klimpel, G. R. Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. *Infect. Immun.* **61**, 830–835 (1993).
46. Gagnière, J. *et al*. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **22**, 501–518 (2016).
47. Garrett, W. S. Cancer and the microbiota. *Science* **348**, 80–86 (2015).
48. Molecular Insights into Microbial β-Glucuronidase Inhibition to Abrogate CPT-11 Toxicity | Molecular Pharmacology. Available at: http://molpharm.aspetjournals.org.gate2.inist.fr/content/84/2/208?ijkey=f35822668b63df2f0847f4a6196a22d0bd2d2a34&keytype2=tf_ipsecsha. (Accessed: 3rd April 2017).
49. Iida, N. *et al*. Commensal Bacteria Control Cancer Response to Therapy by Modulating the Tumor Microenvironment. *Science* **342**, 967–970 (2013).
50. Dubin, K. *et al*. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat. Commun.* **7**, 10391 (2016).
51. Vétizou, M. *et al*. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* **350**, 1079–1084 (2015).
52. Sivan, A. *et al*. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* **350**, 1084–1089 (2015).
53. Routy, B. *et al*. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, 91–97 (2018).
54. Magnusson, M. K. *et al*. Anti-TNF Therapy Response in Patients with Ulcerative Colitis Is Associated with Colonic Antimicrobial Peptide Expression and Microbiota Composition. *J. Crohns Colitis* **10**, 943–952 (2016).
55. Rajca, S. *et al*. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 978–986 (2014).
56. Zhang, X. *et al*. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med.* **21**, 895–905 (2015).
57. Phillips, R. Rheumatoid arthritis: Microbiome reflects status of RA and response to therapy. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 502 (2015).
58. Shin, N.-R., Whon, T. W. & Bae, J.-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* **33**, 496–503 (2015).
59. Rashid, T., Wilson, C. & Ebringer, A. The link between ankylosing spondylitis, Crohn's disease, Klebsiella, and starch consumption. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 872632 (2013).
60. Leirisalo-Repo, M. P. course of disease, and treatment of the spondyloarthropathies. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **24**, 737–751 (1998). viii.
61. Kim, T.-H., Uhm, W.-S. & Inman, R. D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **17**, 400–405 (2005).
62. Santos Rocha, C. *et al*. Local and systemic immune mechanisms underlying the anti-colitis effects of the dairy bacterium Lactobacillus delbrueckii. *PloS One* **9**, e85923 (2014).

63. Busquets, D. *et al.* Anti-tumour Necrosis Factor Treatment with Adalimumab Induces Changes in the Microbiota of Crohn's Disease. *J. Crohns Colitis* **9**, 899–906 (2015).
64. Coyte, K. Z., Schluter, J. & Foster, K. R. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science* **350**, 663–666 (2015).
65. Ciccia, F., Rizzo, A. & Triolo, G. Subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **28**, 89–96 (2016).

Acknowledgements

We thank ACRONIM FHU, Bordeaux Bioinformatics Center and Genome Transcriptome Facility of Bordeaux. This study was funded by Association Aquitaine pour la Recherche Clinique en Rhumatologie. KH was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-IDEX-03–02) awarded to Maureen O'Malley.

Author Contributions

Studies were performed by T. Bazin, C.H. and T. Barnetche, with contribution from M.-E.T., R.E. and C.R. Statistical analysis was performed by K.H., M.N. and A.B. Studies were planned by T.S., M.D., T. Bazin and T. Barnetche. Manuscript was written by T. Bazin, K.H., M.N. and T.S.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-018-23571-4.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2018

Article 2 : le TNFα humain stimule *in vitro* la croissance de *Bacteroides fragilis*

L'écosystème hôte/microbiote présente plusieurs systèmes de communication. Au sein de l'hôte, et donc entre les cellules eucaryotes, il existe de nombreuses voies de signalisation dédiées (cytokines, hormones, neurotransmetteurs etc.). Au sein des bactéries, il existe également plusieurs systèmes de communication permettant notamment aux microorganismes d'adapter leur comportement en fonction de la densité bactérienne.

Mais ces différents compartiments de l'holobionte ne sont pas étanches. D'un point de vue évolutioniste, les différents protagonistes ont en effet tout intérêt à percevoir finement les variations du milieu dans lequel ils évoluent afin de s'adapter au mieux. Les cellules eucaryotes ont ainsi développé de nombreux récepteurs permettant de reconnaître des motifs microbiotaux, comme nous l'avons développé en introduction, et plus largement réagissent à des stimuli non eucaryotes très variés. Les bactéries, beaucoup plus anciennes sur l'échelle de l'évolution, ont également développé une capacité de reconnaissance des signaux liés à l'environnement de l'hôte. En particulier, il a été montré que des pathogènes pouvaient moduler leur virulence en fonction de l'environnement cytokinique.

Il est donc extrêmement probable que des composants du microbiote aient également la capacité de s'adapter aux signaux de l'hôte. Nous avons vu en introduction que le maintien d'une inflammation était un élément fondamental dans le développement des MIC ; une réponse particulière de certains composants du microbiote digestif dans un contexte inflammatoire pourrait être à l'origine du maintien de cette inflammation.

Nous avons étudié *in vitro* les effets directs du TNFα humain sur la croissance de plusieurs microorganismes humains, dont des bactéries et un champignon. Nous avons observé une stimulation de la croissance du pathobionte *Bacteroides fragilis* en présence de faibles concentrations de TNFα. Connaissant l'activité anti-inflammatoire de cette bactérie en dehors d'un contexte infectieux systémique, cet effet du TNFα pourrait être impliqué dans une boucle de rétrocontrôle négatif de l'inflammation digestive, permettant un retour à l'homéostasie.

GROWTH STIMULATION OF *BACTEROIDES FRAGILIS* BY HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA

RUNNING TITLE: Tumour necrosis factor alpha boosts *Bacteroides fragilis* growth

Thomas Bazin[a,b#*], Audrey Payet[c], Arnaud Zabala[c], Thierry Schaeverbeke[a,d], Fatima M'Zali[c]

a. Univ. Bordeaux, INRA, Mycoplasmal and chlamydial infections in humans, EA 3671, F-33000, Bordeaux, France
b. Bordeaux Hospital University Center, Department of Hepato-gastroenterology, F-33600, Pessac, France
c. Univ. Bordeaux, Aquitaine microbiologie, F-33000 Bordeaux, France
d. Bordeaux Hospital University Center, Department of Rheumatology, F-33000, Bordeaux, France

CORRESPONDING AUTHOR: Thomas Bazin, mail: thomas.bazin@parisdescartes.fr

For Peer Review

*Present address: Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Department of Hepato-gastroenterology, F-75015, Paris, France

ABSTRACT

Background and aim: Bacteria can sense a variety of eukaryotic signals, including cytokines. Growth stimulation has been previously observed when pathogenic bacteria are exposed to cytokines including TNFα. The aim of the present study was to assess *in vitro* the effects of TNFα on a variety of bacteria including microbiota members.

Methods: We used a panel of microorganisms including a variety of wild type reference strains and strains from clinical origin. The microorganisms were cultured during 48 hours in a liquid broth in presence of various TNFα concentrations. Growth was measured by mean of Time-Kill assays and colony counting, and expressed in CFU/mL. ANOVA analysis was performed, followed by Tukey's and Dunnet's post-hoc tests. Multiple testing corrections were applied.

Results: We observed a significant increase of bacterial growth at T24h in *Bacteroides fragilis* cultures. This effect was statistically significant only for the lowest TNFα concentration (1pg/mL). None of the other microorganisms exhibited significant growth modulation.

Conclusion: This is the first study to show a growth modulation of an anaerobic microbiota member, *Bacteroides fragilis*, by the human cytokine TNFα. These results could be of interest in the management of patients with chronic inflammatory diseases.

For Peer Review

INTRODUCTION

Bacteria continuously evaluate the benefit/cost ratio of expressing their genes, wheter involved in virulence, or in growth, metabolism etc. For instance, since the discovery of quorum sensing (QS) molecules, we know that virulence is strongly regulated by the growth phase(1). It is now also well accepted that the modulation of virulence depends in part on the release into the microenvironment of eukaryotic messengers. In particular, in addition to the actions of cytokines on the host, another parallel action during the infectious process was suspected in the 1990s, as it was shown that non-infectious stress could promote massive translocation of intestinal bacteria and/or toxins in the systemic compartment(2). These observations led to the study of the direct effects of cytokines on bacteria. These effects have been studied *in vitro*.

Interleukin-1, interleukin-2, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-6, interferon-γ and TNFα(3) have been shown to stimulate bacterial growth from a certain concentration. For example, *Pseudomonas aeruginosa* can bind elements of the host immune system such as interferon-γ and dynorphin (endogenous agonist peptide of morphine receptors) and then via the QS circuit increase its virulence(4). Porat et al. have shown that IL-1β, but not TNFα or IL-4, stimulates the growth of virulent strains of *E. coli*, but not of non-virulent strains. This stimulation was blocked by IL-1ra (IL-1 receptor antagonist), suggesting the presence of a receptor-like structure on the surface of virulent strains(5). It is noted that these effects were observed during the exponential growth phase, before reaching the stationary phase. The *Yersinia pestis* Caf1A usher protein has a high affinity for IL-1beta(6), making it a good candidate for the role of receptor for this cytokine. Moreover, it has been shown that IL-2 and GM-CSF stimulate the growth of a virulent *E. coli* strain

For Peer Review

(isolated from a skin infection), but not from a non-virulent strain(7). Meduri et al. have shown *in vitro* that clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* sp. and *P. aeruginosa* used cytokines TNFα, IL-1 and IL-6 as growth factors, with concentration-dependent action(8). Kanangat et al. showed that *S. aureus* growth was significantly increased in the presence of IL-1β, in a concentration-dependent manner, and decreased by the presence of IL-1ra, suggesting a receptor-mediated action of IL-1beta (9). TNFα increases in vitro the growth of *E. coli* but not *P. aeruginosa*, in a concentration-dependent manner. This effect is attenuated by anti-TNFα antibodies(10). Luo et al. have shown that TNFα can bind to several gram-negative and positive bacteria via a protein-like membrane receptor. TNFα was able in *Shigella flexneri* to increase HeLa cell invasion as well as uptake by human and murine macrophages, suggesting an interaction between the TNFα/bacterium complex and eukaryotic receptors(3). However, the specific receptor that mediates the response has not yet been identified. In addition, the specific signaling mechanisms and virulence factors involved in the effects of TNFα on *Shigella flexneri* remain unknown. IFN-γ but neither IL-2 nor IL-1β increases the growth of *E. coli* and *Klebsiella pneumonia*(11). Wu et al. showed that IFN-γ could bind to a *P. aeruginosa* membrane protein, OprF, and induce expression of a quorum-sensing-dependent virulence determinant(12). This effect was not present with TNFα, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 or IL-12. None of these cytokines, including IFN-γ, altered bacterial growth. More recently, it has been shown that the capture of pro-inflammatory cytokines TNFα and IL-8 leads to a transcriptional modification of the virulence genes in *Neisseria meningitidis*. This capture is mediated by type IV pili(13).

Thus, prokaryotic receptors may have a dual role: the perception of signals in an eminently complex medium and the signal transduction(4) to initiate changes in bacterial physiology.

For Peer Review

Since the messenger molecules are generally unable to passively pass through the bacterial membrane, their recognition implies either the presence of membrane receptors or the presence of active intra-cytoplasmic transport mechanisms allowing internal recognition.

Strikingly, all precedent studies focused on TNFα effects on pathogens, as the underlying hypothesis was that sepsis-associated cytokines could influence directly bacterial physiology. However, strict pathogens represent only a tiny proportion of microbiota bacteria. The majority of bacteria in our digestive tract belong to the continuum ranging from the symbionts to the pathobionts through the commensals. This distinction is highly context-dependent. Non pathogenic bacteria are constantly exposed to host signals, including cytokines. For instance, TNFα can be found in feces at higher concentrations than in blood(14, 15). There is no reason that these bacteria do not modulate their behavior depending on cytokines levels, as pathogens do. Switch in microbiota composition is associated with a variety of inflammatory conditions(16); in an inflammatory environment, bacteria could reinforce inflammation without *stricto sensu* infection, expressing specific genes after inflammatory cytokines sensing. These genes could be involved in adhesion, growth, metabolism etc. This could perpetuate inflammation and ultimately lead to a chronic inflammatory disease.

Studying direct effects of pro-inflammatory cytokines on microbiota species is therefore of great interest, as it could help to target pro-inflammatory bacteria through luminal inactivation of cytokines, or to predict the efficacy of anti-cytokine biotherapy as it has been proposed(17–19).

For Peer Review

OBJECTIVES

The objective of this study was to evaluate the potential modulation of microorganisms' growth in presence of human TNFα.

MATERIAL AND METHODS

BACTERIAL STRAINS

The panel comprised reference control strains and clinical ones. The choice of reference strains was based on previous published studies whilst the clinical ones were chosen on their occurrence at the time of the study.

Eight reference strains included *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus*∗ ATCC 29213, *Candida albicans* ATCC 10231, *Lactobacillus plantarum*∗ DSMZ 100813, *Enterococcus faecium*∗ ATCC 6569, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Clostridium leptum*∗ ATCC 29065 and *Ruminococcus gnavus*∗ ATCC 29149. The clinical strains were identified by mean of MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) and antibiograms were determined according to European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines. For Time-Kill assays, a single colony of each organism was subcultured in nutrient broth and incubated at 37° C for 6h in presence of TNFα. Seven clinical isolates recovered from patients attending immunology department of Bordeaux University Hospital were also included: *Shigella flexneri, Stenotrophomonas maltophilia, Bacteroides fragilis, Burkholderia multivorans, Burkholderia cenocepacia* and *Clostridium perfringens*∗.

∗ : Firmicutes phylum

For Peer Review

TNFα

We used lyophilized recombinant human TNFα protein ab9642 (abcam®), with purity > 98%, and no excipients. TNFα was reconstituted with dH_2O, aliquoted, and immediately stored at -80°C. The concentrations tested were: 6000 pg/ml, 1000 pg/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml. In addition, for each microorganism a control culture without TNFα was performed.

Growth curves

Colonies at 48h were sampled and re-suspended in 1mL of TSB to obtain an optical density (MacFarland) between 0.4 and 0.6 in order to reach a concentration of 10^5 CFU/10µL. 100µL were sampled and added in Eppendorf tubes pre-filled with 900µL of TSB. One tube by time point and by TNFα concentration was prepared. Culture medium for *Candida albicans* was Sabouraud.

For colony counting at each time point, 100µL of broth cultures was subjected to serial dilutions in PBS to obtain 10^{-1} to 10^{-6} dilutions. Then, 10µL of each dilution was spread out onto a 6cm blood agar plate. The plates were incubated in the appropriate conditions (aerobic/anaerobic) for the tested microorganism. The resulting colonies were counted by an automated reader (Colony Doc-It® Imaging Station, UVP) and expressed as Colony-Forming Units (CFU)/milliliter.

Statistical Analysis

All experiments were repeated 6 times. For all analyses, bacterial growth, measured in CFU/ml, was transformed by calculating the natural logarithm of values. Statistical analyses were performed separately for each species. First, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare bacterial growth after incubating during 6, 24 and 48 hours in medium containing various concentrations of TNFα. Normality of values distribution was

For Peer Review

beforehand tested using Shapiro-Wilk's test and variance homogeneity using Bartlett's test. Second, we compared growth effects of TNFα pair by pair using Tukey's and Dunnet's tests. All statistical tests were performed using JMP® 10 software.

RESULTS

We observed a stimulation of *B. fragilis* growth at T24, at all TNFα concentrations (Table 1, Figure 1 and Image 1). Mean CFU/mL at 24h in TNFα groups was 1.14×10^6 compared with 4.0×10^4 in control group. ANOVA showed significant differences between groups (p=0.003). Post-hoc Tukey's and Dunnet's tests showed that only lowest TNFα concentration (1pg/mL) was significantly associated with a higher bacterial growth (p=0.005 and p=0.002, respectively). This effect was not visible at T48 (Figure 2).

None of the other species exhibited a growth modulation under TNFα stimulation at any timepoint. Data for other species are included as Supplementary Material.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to demonstrate a growth stimulation of an anaerobic microbiota member, *B. fragilis*, in presence of human TNFα.

As previously observed, effects of TNFα were only visible during exponential phase, with no modifications of the numbers of bacteria at the stationary phase. We did not show a concentration dependent modulation of growth, in contradiction with previous results. Even

For Peer Review

170 if a type 2 error cannot be exclude, it is biologically plausible that commensals sense human
171 cytokines in a very precise way, as a modulation of their properties could be relevant for
172 them only in case of fine inflammatory variations.

173 We did not observe growth modulation of *S. aureus* as Meduri et al. did(8). Of note, in this
174 study the authors observed a growth modulation only when using defined synthetic
175 bacteriologic medium, and not RPMI medium. Moreover, we did not observe growth
176 modulation of *E. coli* as Lee et al. did(10). The authors used the same *E. coli* strain
177 (ATCC25922) but used a different preparation of bacteria, without agar plate step in order to
178 obtain a stationary phase organisms. Growth was measured only at 8 hours. Moreover,
179 authors used recombinant mouse tumor necrosis factor-α instead of human protein as in
180 our study.

181 Interestingly, cytokine growth effects shown by Meduri et al.(8) were only visible using fresh
182 isolates, and disappeared when passed *in vitro* in non-cytokine enriched media. Recognition
183 of eucaryotes signals has probably a relatively high cost for bacteria, positively selected only
184 when the environment requires an adaptation to such signals and rapidly lost in their
185 absence.

186 *B. fragilis* is a strict anaerobic Gram-negative bacillus, belonging to *Bacteroides* genus, with
187 rounded ends 0.5 to 0.8 µm in diameter and 1.5 to 4.5 µm long. Most strains are
188 encapsulated. *B. fragilis* is of importance in human health as it is the anaerobic Gram-
189 negative bacteria the most encountered in clinical infections(20), and as it exhibits resistance
190 to antimicrobial agents. *B. fragilis* is frequently found in samples of patients with an infection
191 of a digestive origin as the particular species of our isolate. It is a non-pathogenic bacterium
192 at the basal state. We found it physiologically in animal digestive and urogenital tracts,

For Peer Review

including humans' ones. It acts as a secondary pathogen, opportunistic, becoming pathogen from endogen flora to systemic compartment in a context of favoring factor such as mucosal breach, surgery, trauma, tumour or aspiration pneumonia. As for all Gram-negative anaerobic bacilli, infections involving *B. fragilis* are characterized by abscess formation and tissue destruction. It is classified as level 2 risk group.

It is noteworthy that *B. fragilis* exhibits anti-inflammatory properties, as it can induce Treg differenciation(21) *via* its polysaccharide A(22) through plasmacytoid dendritic cells(23). In addition, this bacterium has the ability to protect mice from experimental colitis induced by *Helicobacter hepaticus*(24). This beneficial effect is mediated by polysaccharide A, which increases the transcription of IL-10 mRNA(25). These studies clearly show that this bacterium has several mechanisms that can reduce digestive and systemic inflammation. Modulation of the growth of this bacterium in response to TNFα could be interpreted as a negative feedback mechanism aimed at decreasing local inflammation, this return to homeostasis benefiting both the bacterium and the host. The fact that the growth response was significant only for small concentrations of TNFα could be interpreted as the result of a peculiar adaptation to micro-inflammatory environments, higher levels of cytokines being much rarer from the point of view of a commensal.

Bacterial growth stimulation by TNFα has been previously observed in human aerobic pathogens, but never in anaerobic microbiota members. This discovery is of importance, as conceptually it proves that, without any infectious context, host inflammatory climate could be integrated by a commensal and can boost its growth. Interstingly, this effect was not shown on all bacterial species, that showing the high specificity concerning human cytokine

For Peer Review

sensing. It could explain why, in addition with favorising events, peculiar microbiota could be at higher risk of deleterious infection.

It appears that cytokines have a double-edged effect on inflammation and infection: pro-inflammatory cytokines act as stimulators of bacterial growth. However, in an immunocompetent patient, positive effects of cytokines during infections clearly overtake any growth effect on pathogens(10). Thus, in the case of immuno-competent animals, the ability of TNFα to recruit phagocytic neutrophils clearly outweighs any growth promoter effects that may occur. However, apart from the infectious context, the commensal bacteria of the digestive tract are located for the most part, including *B. fragilis*, at a distance from the digestive epithelium; the major action of TNFα on neutrophils(26) could therefore exert only minimal effects on microbiota bacteria, while the direct action of TNFα surely exists, since we find TNFα abundantly in the blood but also stool and mucosa of patients with inflammatory bowel diseases(27). Thus, inflammation whatever its cause could modulate *per se* the composition of the intestinal microbiota, resulting in a cascade of events that can lead depending on the context to a resolution or on the contrary a perpetuation of inflammation. This could explain, at least partially, why some patients do not respond to biotherapies targeting inflammatory cytokines.

Many questions need to be answered, as our study did not identify the bacterial receptor responsible of bacterial sensing. The main mechanism by which bacteria detect and respond to environmental variations seems to be the two-component transduction system (detection/transduction), but other mechanisms cannot be exluded. Bioinformatic studies have identified, in the genome of prokaryotes, sequences showing a homology with all major families of eukaryotic receptors (tyrosine kinase receptor, receptor coupled to G proteins,

For Peer Review

238 ionotropic receptor, etc.), suggesting that bacteria can express receptors sensitive to a
239 multitude of eukaryotic signals including cytokines, neurotransmitters and hormones(4).

240 Other studies looking at the effects of TNFα on microorganisms representative of microbiota
241 communities are warranted.

242 CONCLUSION

243 In this study we showed for the first time a growth modulation of an anaerobic microbiota
244 member in response to human TNFα cytokine. This could be of particular interest in chronic
245 inflammatory disease, in order to tailor the treatment or to predict the efficacy of molecules.

246

247

248

For Peer Review

249 ## ACKNOWLEDGMENT

250 This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial,
251 or not-for-profit sectors.

252 We thank Pr Philippe Lehours for providing us with the clinical strains of *B. fragilis*.

253 Authors declare no conflicts of interest in connection with this study.

254

255

For Peer Review

REFERENCES

1. Hartmann A, Schikora A. 2012. Quorum sensing of bacteria and trans-kingdom interactions of N-acyl homoserine lactones with eukaryotes. J Chem Ecol 38:704–713.

2. Caso JR, Leza JC, Menchén L. 2008. The effects of physical and psychological stress on the gastro-intestinal tract: lessons from animal models. Curr Mol Med 8:299–312.

3. Luo G, Niesel DW, Shaban RA, Grimm EA, Klimpel GR. 1993. Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. Infect Immun 61:830–835.

4. Lesouhaitier O, Veron W, Chapalain A, Madi A, Blier A-S, Dagorn A, Connil N, Chevalier S, Orange N, Feuilloley M. 2009. Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. Sensors 9:6967–6990.

5. Porat R, Clark BD, Wolff SM, Dinarello CA. 1991. Enhancement of growth of virulent strains of Escherichia coli by interleukin-1. Science 254:430–432.

6. Zav'yalov VP, Chernovskaya TV, Navolotskaya EV, Karlyshev AV, MacIntyre S, Vasiliev AM, Abramov VM. 1995. Specific high affinity binding of human interleukin 1 beta by Caf1A usher protein of Yersinia pestis. FEBS Lett 371:65–68.

7. Denis M, Campbell D, Gregg EO. 1991. Interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate growth of a virulent strain of Escherichia coli. Infect Immun 59:1853–1856.

8. Meduri GU, Kanangat S, Stefan J, Tolley E, Schaberg D. 1999. Cytokines IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha enhance in vitro growth of bacteria. Am J Respir Crit Care Med 160:961–967.

9. Kanangat S, Bronze MS, Meduri GU, Postlethwaite A, Stentz F, Tolley E, Schaberg D. 2001. Enhanced extracellular growth of Staphylococcus aureus in the presence of selected linear peptide fragments of human interleukin (IL)-1beta and IL-1 receptor antagonist. J Infect Dis 183:65–69.

For Peer Review

10. Lee J-H, Del Sorbo L, Khine AA, de Azavedo J, Low DE, Bell D, Uhlig S, Slutsky AS, Zhang H. 2003. Modulation of bacterial growth by tumor necrosis factor-alpha in vitro and in vivo. Am J Respir Crit Care Med 168:1462–1470.

11. Hogan JS, Todhunter DA, Smith KL, Schoenberger PS, Sordillo LM. 1993. Growth responses of coliform bacteria to recombinant bovine cytokines. J Dairy Sci 76:978–982.

12. Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, Kohler JE, Patel N, Musch MW, Chang EB, Fu Y-X, Jacobs MA, Nishimura MI, Hancock REW, Turner JR, Alverdy JC. 2005. Recognition of Host Immune Activation by Pseudomonas aeruginosa. Science 309:774–777.

13. Mahdavi J, Royer P-J, Sjölinder HS, Azimi S, Self T, Stoof J, Wheldon LM, Brännström K, Wilson R, Moreton J, Moir JWB, Sihlbom C, Borén T, Jonsson A-B, Soultanas P, Ala'Aldeen DAA. 2013. Pro-inflammatory cytokines can act as intracellular modulators of commensal bacterial virulence. Open Biol 3:130048.

14. Puz P, Lasek–Bal A. 2017. Repeated measurements of serum concentrations of TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 in the evaluation of internal carotid artery stenosis progression. Atherosclerosis 263:97–103.

15. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. 1992. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. Lancet Lond Engl 339:89–91.

16. Lynch SV, Pedersen O. 2016. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. N Engl J Med 375:2369–2379.

17. Bazin T, Hooks KB, Barnetche T, Truchetet M-E, Enaud R, Richez C, Dougados M, Hubert C, Barré A, Nikolski M, Schaeverbeke T. 2018. Microbiota Composition May Predict Anti-Tnf Alpha Response in Spondyloarthritis Patients: an Exploratory Study. Sci Rep 8:5446.

18. Magnusson MK, Strid H, Sapnara M, Lasson A, Bajor A, Ung K-A, Öhman L. 2016. Anti-TNF Therapy Response in Patients with Ulcerative Colitis Is Associated with Colonic Antimicrobial Peptide Expression and Microbiota Composition. J Crohns Colitis 10:943–952.

For Peer Review

19. Zhou Y, Xu ZZ, He Y, Yang Y, Liu L, Lin Q, Nie Y, Li M, Zhi F, Liu S, Amir A, González A, Tripathi A, Chen M, Wu GD, Knight R, Zhou H, Chen Y. 2018. Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. mSystems 3.

20. Yusuf E. 2015. A Book Review on: Sherris Medical Microbiology – International Edition, 6th Edition. Front Cell Infect Microbiol 5.

21. Round JL, Mazmanian SK. 2010. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. Proc Natl Acad Sci U S A 107:12204–12209.

22. Telesford KM, Yan W, Ochoa-Reparaz J, Pant A, Kircher C, Christy MA, Begum-Haque S, Kasper DL, Kasper LH. 2015. A commensal symbiotic factor derived from Bacteroides fragilis promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. Gut Microbes 6:234–242.

23. Dasgupta S, Erturk-Hasdemir D, Ochoa-Reparaz J, Reinecker H-C, Kasper DL. 2014. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. Cell Host Microbe 15:413–423.

24. Troy EB, Kasper DL. 2010. Beneficial effects of Bacteroides fragilis polysaccharides on the immune system. Front Biosci J Virtual Libr 15:25–34.

25. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature 453:620–625.

26. Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. J Immunol Baltim Md 1950 168:4620–4627.

27. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. 2006. Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease--seven years on. Aliment Pharmacol Ther 23:451–463.

For Peer Review

Table 1: *Bacteroides fragilis* growth in the presence of TNFα

TNFα concentration (pg/mL)	T0	log10	T24	log10	T48	log10
0	4×10^4	4.6	4.0×10^4	4.6	8.3×10^7	7.9
1	4×10^4	4.6	3.8×10^6	6.6	5.4×10^7	7.7
10	4×10^4	4.6	6.5×10^5	5.8	1.8×10^7	7.3
100	4×10^4	4.6	8.5×10^4	4.9	3.7×10^7	7.6
1000	4×10^4	4.6	1.1×10^6	6.0	1.6×10^8	8.2
6000	4×10^4	4.6	1.4×10^5	5.1	2.7×10^7	7.4

values are CFU/mL means

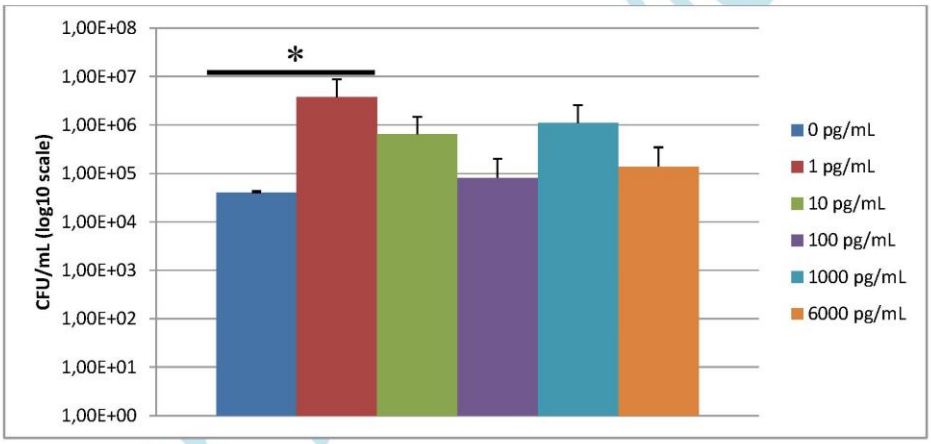


Figure 1: *Bacteroides fragilis* growth curve in presence of TNFα at T24h

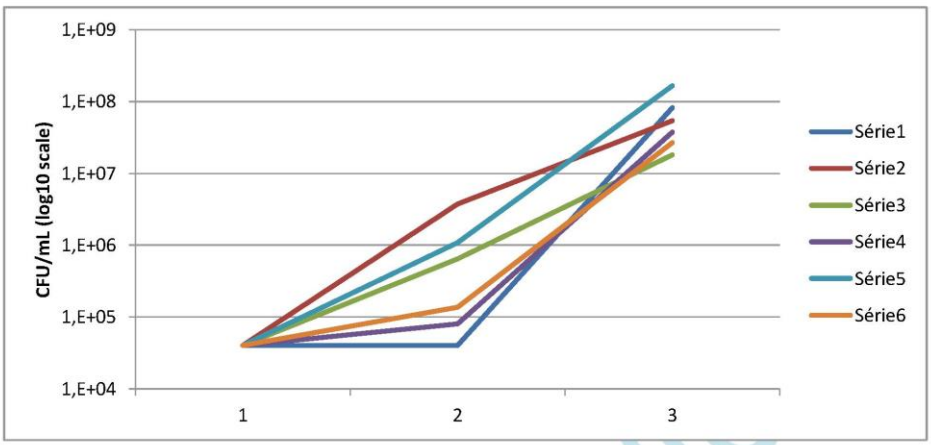


Figure 2: *Bacteroides fragilis* growth curve in presence of TNFα

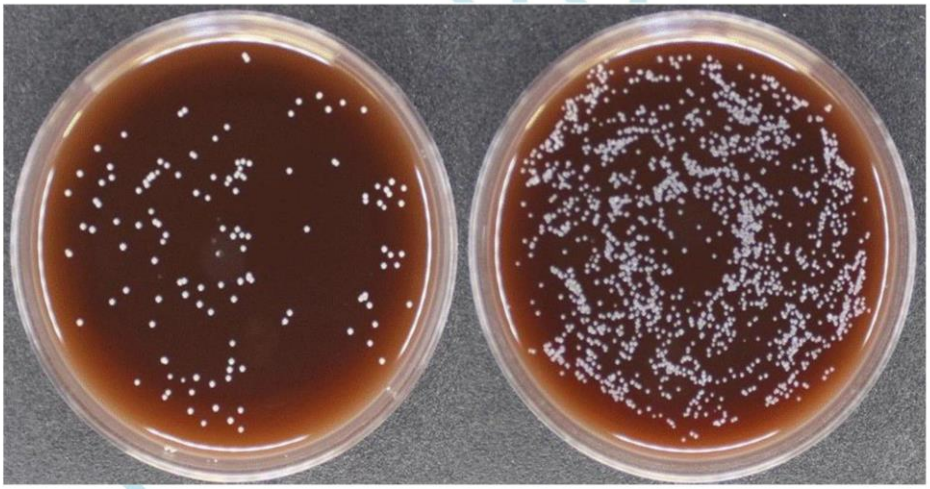


Image 1: Agar plates showing *Bacteroides fragilis* growth at T24h without (left plate) and in presence of TNFα at 1pg/mL (right plate) (10^{-5} dilution)

337 SUPPLEMENTARY MATERIAL

338 (Online only) Supplementary Table - Growth values of tested species.

339

340

For Peer Review

5 Discussion

Notre étude clinique basée sur l'analyse du microbiote intestinal par séquençage du gène de l'ARNr 16S avant et après traitement par anti-TNFα n'a pas retrouvé de modification significative d'un taxon particulier après traitement. Cependant, la composition des patients répondeurs semblait plus stable que celle des non répondeurs. La diversité α des patients non répondeurs était plus basse avant traitement que celle des autres patients, et cette différence était supprimée après traitement anti-TNFα. Une proportion élevée de l'ordre des *Burkholderiales* avant traitement était associée à la réponse clinique à trois mois ; cet ordre pourrait donc être utilisé comme biomarqueur prédictif de l'efficacité des traitements anti-TNF α chez les patients atteints de SpA.

Ces résultats sont importants car aucun facteur prédictif n'est actuellement disponible dans les SpA, malgré un réel besoin clinique.

Nous avons, par ailleurs, montré qu'une espèce de *Bacteroides fragilis* isolée à partir d'un échantillon clinique réagissait aux faibles concentrations de TNFα humain en augmentant sa croissance.

Nos résultats suggèrent une influence directe du TNFα et donc des anti-TNFα sur le microbiote intestinal, ainsi qu'une influence du microbiote intestinal sur l'efficacité des anti-TNFα. Ces résultats soulignent l'importance du dialogue hôte-microbiote dans les maladies inflammatoires chroniques.

L'hypothèse d'une action des anti-TNFα médiée par son action sur le microbiote intestinal n'est bien sûr pas exclusive, et ne remet pas en cause l'action directe de ces traitements sur l'inflammation à l'échelle de l'hôte. Ces deux actions se combinent probablement, sans qu'il soit à l'heure actuelle possible d'identifier laquelle est la plus importante cliniquement. Notre hypothèse est cohérente avec un point de vue microbiologique intégré dans le mode de pensée inclusif propre à la biologie de système.

Notre hypothèse permettra d'orienter de nouvelles recherches, visant par exemple à renforcer artificiellement le microbiote en microorganismes « facilitateurs ». Cependant, comme il a été montré dans les MICI qu'un phénotype inflammatoire était prédictif d'une bonne réponse aux anti-TNFα, il faudra avant toute intervention s'assurer que ces microorganismes sont réellement facilitateurs et pas seulement pro-inflammatoires. Dans tous les cas, l'étude des effets des traitements à la fois sur l'hôte indépendamment des microorganismes et sur les microorganismes indépendamment de l'hôte sera nécessaire afin de mieux catégoriser les profils de patients et d'identifier les plus susceptibles de répondre à un traitement ou plus probablement à une combinaison de traitements.

5.1 *Burkholderiales*

L'ordre des *Burkholderiales*, identifié dans notre étude comme biomarqueur de réponse aux anti-TNFα, appartient à la classe des Betaproteobacteria et au phylum des Proteobacteria. Comme toutes les Proteobacteria, les bactéries de cet ordre sont Gram négatives. Elles incluent plusieurs bactéries pathogènes, donc des espèces de *Burkholderia* comme *Burkholderia cepacia* et de *Bordetella* comme *Bordetella pertusis*. Il est à noter que ces bactéries exercent leur pouvoir pathogène au niveau pulmonaire, et qu'à notre connaissance aucune bactérie de l'ordre de *Burkholderiales* n'a été à ce jour associé à une pathologie digestive et/ou à une pathologie inflammatoire chronique. Ces bactéries incluent surtout une grande variété de non pathogènes, dont de nombreuses bactéries retrouvées dans le tube digestif humain comme le genre *Oxalobacter* dont le métabolisme est particulier dans la mesure où il utilise l'acide oxalique comme source primaire de carbone (Garrity 2005).

Les hypothèses mécanistiques quant à un rôle potentiel de l'ordre des *Burkholderiales* dans le déclenchement de l'inflammation, son maintien ou un rôle de potentialisation des anti-TNFα sont donc extrêmement difficiles à formuler. Cela souligne la limite de la technique du séquençage de l'ADN 16S, qui dans ce cas précis n'a pas permis de déterminer nettement l'espèce incriminée, ce qui limite *de facto* les possibilités d'études mécanistiques *in vitro*.

5.2 *Bacteroides fragilis*

Les résultats obtenus *in vitro* relevant une augmentation de la croissance de notre isolat de *Bacteroides fragilis* sont d'un intérêt particulier. En effet, *Bacteroides fragilis*, bactérie Gram négative anaérobie appartenant au phylum des Bacteroidetes, bien que fréquemment identifiée dans les prélèvements de patients présentant une infection à point de départ digestif comme l'espèce particulière de notre isolat, est une bactérie non pathogène à l'état basal, retrouvée dans le microbiote intestinal de patients sains. De plus, cette bactérie a, comme décrit plus haut, la capacité de protéger des souris d'une colite expérimentale induite par *Helicobacter hepaticus*, une bactérie pathobionte. Cet effet bénéfique est médié par une molécule bactérienne, le polysaccharide A, qui augmente la transcription de l'ARNm de l'IL-10 (Mazmanian, Round, and Kasper 2008b). *B. fragilis* peut également moduler la réponse Treg (Round and Mazmanian 2010). Ces études montrent clairement que cette bactérie possède plusieurs mécanismes pouvant diminuer l'inflammation digestive et systémique. Une modulation de la croissance de cette bactérie en réponse au TNFα pourrait être interprétée comme un mécanisme de rétrocontrôle négatif visant à diminuer l'inflammation locale, ce retour à l'homéostasie bénéficiant à la fois à la bactérie et à l'hôte.

6 Perspectives personnelles

La suite logique de ces travaux consistera à consolider les résultats des travaux de ma thèse.
Pour cela, nous avons :

- développé un protocole de PCR quantitative ciblant l'ordre des *Burkholderiales*. A cette fin, nous avons tout d'abord créé des amorces spécifiques, puisqu'aucun couple d'amorces ciblant spécifiquement cet ordre bactérien n'avait été décrit. Nous avons utilisé la méthode RUCS (Thomsen *et al.* 2017), définissant comme contrôle positif les séquences d'ARNr 16S appartenant à l'ordre des *Burkholderiales* à partir de la banque de données SILVA, et comme contrôle négatif tous les autres taxa n'appartenant pas à la classe des Betaproteobacteria. Cette méthode a permis d'identifier une région d'ARNr spécifique, puis de sélectionner le couple d'amorce présentant les meilleures caractéristiques par alignement de séquences multiples et par vérification de la distribution taxonomique à partir du serveur SILVA. La mise au point de la PCR quantitative sur mono cultures puis sur échantillons de selles est en cours. Cette qPCR sera réalisée sur les échantillons de l'étude MIST (cf ci-dessous).
- déposé un brevet européen (1er dépôt le 13/07/2017, modifications et second dépôt le 13/07/2018) visant à protéger l'invention suivante « quantification de l'ordre des *Burkholderiales* dans les MIC comme biomarqueur de la réponse au traitement par anti-TNFα ». Les amorces innovantes de qPCR sont intégrées dans cette demande de brevet. Ma part inventive personnelle est de 25%.
- lancé au CHU de Bordeaux un nouveau protocole de recherche clinique appelé MIST (Microbiote intestinal de patients présentant une MICI et/ou une SpA : caractérisation et impact d'un traitement par anti-TNF α), qui inclut à la fois des patients atteints de SpA et des patients atteints de MICI, traités pour la première fois par anti-TNFα (protocole en annexe). Ce protocole s'est attaché à améliorer toutes les méthodes de notre premier article et de corriger ses points faibles. En particulier, une analyse du mycobiome sera réalisée en plus de l'analyse du microbiome bactérien. Une analyse alimentaire détaillée ainsi qu'un circuit des échantillons optimisé permettront de limiter les biais. De plus, afin de progresser dans l'étude des interactions entre microbiote et système immunitaire, un immunolymphotypage des lymphocytes circulants permettra de quantifier les différentes populations de cellules T, et en particulier d'établir un ratio Th17/Treg, à partir de sang frais. Enfin, ce protocole permettra de vérifier si notre test prédictif est confirmé et de valider notre qPCR sur une cohorte indépendante. Ce protocole a obtenu le financement de l'appel d'offres interne du CHU de Bordeaux (50000 euros) à mon nom. Le budget total est de 65000 euros, répartis en deux ans. Les premières inclusions ont débuté en juin 2018.

En collaboration avec la société Owlstone Medical (Cambridge), j'ai monté un projet d'étude des composés organiques volatils (COVs) expirés greffé dans l'étude MIST (étude ancillaire, addendum ay protocole MIST). L'analyse de ces composés est en plein essor et reflète l'ensemble du métabolisme de l'holobionte (hôte + microbiotes) ; de par son caractère totalement non invasif et sa très bonne acceptabilité de la part des patients, les données issues de ces mesures (exhalome faisant partie du métabolome) pourraient permettre le développement de tests de suivi longitudinal dans les maladies chroniques, par exemple. Mes autres perspectives personnelles au sein de l'Université de Bordeaux sont de poursuivre l'étude des *Burkholderiales*, en évaluant notamment les effets du TNFα sur des

isolats cliniques. Je souhaiterais évaluer d'abord la réponse en termes de croissance bactérienne, mais surtout la modulation de l'adhérence à l'épithélium digestif. Pour cela, nous avons mis au point en collaboration avec la société SMALTIS un modèle d'adhésion cellulaire sur cellules épithéliales humaines T84. Des demandes de financement sont en cours afin de pouvoir lancer ce projet.

J'intégrerai l'année prochaine l'unité INSERM UMR 1173 « Infection et Inflammation Chronique » à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, où je travaillerai à la mise au point d'un projet de type gut-on-a-chip, qui permettra de co-cultiver des cellules épithéliales humaines, des cellules immunitaires et des microorganismes anaérobies grâce aux canaux clos de microfluidique intégrés à ce type de modèle expérimental.

7 Perspectives générales

7.1 Médecine personnalisée

Dans le but d'offrir aux patients la médecine la plus personnalisée possible, beaucoup d'études ont recherché des facteurs prédictifs de l'efficacité thérapeutique en comparant les répondeurs et les non répondeurs après l'initiation d'un traitement. Ainsi, dans les MICI, plusieurs caractéristiques liées aux patients ont été évaluées comme pouvant potentiellement prédire la réponse aux anti-TNFα, biothérapies les plus anciennes. On a pu montrer qu'un âge jeune, une colite isolée dans la MC et des niveaux élevés de CRP au début du traitement étaient associés à une plus grande chance de répondre au traitement. Inversement, les fumeurs étaient à risque de non-réponse, ainsi que les patients dont la maladie évoluait depuis plus de deux ans. Les marqueurs génétiques ont également été évalués et pourraient permettre de prédire la non-réponse primaire ou la réponse prolongée dans la MC (Barber *et al.* 2016), Cependant, aucun gène n'est suffisamment associé au profil de réponse clinique pour être utilisé en pratique clinique (Flamant and Roblin 2018). D'autres études ont suggéré que les profils d'expression génique (Arijs *et al.* 2010), l'imagerie moléculaire et la composition du microbiote digestif pourraient être utilisés dans un but prédictif (Flamant and Roblin 2018). Dans la SA, un âge jeune, le sexe masculin, un score de sévérité haut, une sacro-iliite radiologique et des niveaux élevés de CRP sont associés à une meilleure réponse clinique aux anti-TNFα (Arends *et al.* 2011; Brown *et al.* 2017), sans que ces facteurs prédictifs soient utilisés en pratique courante.

Afin d'affiner ces prédictions, un projet ambitieux d'intégration des différents éléments est nécessaire. A Bordeaux, en continuant sur le moyen terme le recrutement de patients chez qui une indication de biothérapie sera posée, nous procéderons à un recueil de données détaillé comportant, outre les analyses cliniques rigoureuses et biologiques standard, un immunophénotypage des cellules circulantes, une analyse NGS du microbiote intestinal, la qPCR précédemment citée ainsi que l'analyse des COVs. En intégrant ces données à une approche bioinformatique de type machine-learning, nous développerons un test prédictif de réponse clinique aux différentes molécules, qui s'affinera en continu et deviendra donc de plus en plus précis. Cette approche composite devrait permettre de surpasser rapidement les capacités des tests basés sur des analyses mono-omiques.

7.2 Complexité

Les deux types de pathologies émergentes dans nos sociétés sont les cancers et les maladies inflammatoires chroniques. Ces deux pathologies sont caractérisées par l'absence de cause unique ainsi que par une grande diversité des mécanismes impliqués (Fiocchi 2018).

Les MIC, qu'elles soient auto-immunes ou non, ont deux caractéristiques principales : la complexité et la variabilité. La complexité est due au nombre qui semble infini des facteurs et des mécanismes associés, et la variabilité est due à la grande hétérogénéité des individus atteints et de l'environnement dans lequel ils vivent. La complexité et la variabilité se confondent dans la prédisposition, l'initiation et le cours évolutif des manifestations cliniques, qui sont également variables et imprévisibles. La présentation clinique est variable, l'efficacité des différents traitements également. Un suivi sur le long terme est nécessaire pour essayer d'anticiper et de prévenir les poussées.

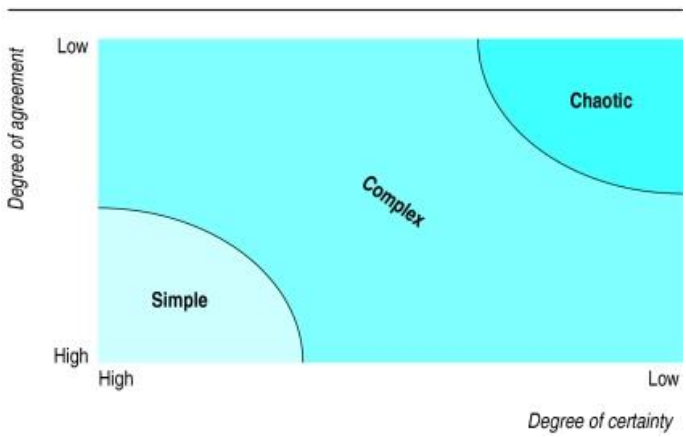


Figure 11 : Le schéma accord/certitude (certainty-agreement diagram)

Comme tous les facteurs impliqués sont modifiables, les relations non linéaires et le comportement sensible aux petites variations, le comportement précis de tout système complexe est fondamentalement imprévisible dans le temps. L'approche classique, basée sur une pensée réductionniste, consiste à tenter de corriger les anomalies pour briser l'ambiguïté, résoudre tout paradoxe, obtenir plus de certitude et d'accord et passer à la zone simple du système (Figure 11). (Plsek and Greenhalgh 2001).

7.2.1 Facteurs contribuant à la complexité et à la variabilité

Les MIC résultent de la combinaison d'une grande diversité de facteurs prédisposants ou causaux. Il est couramment admis que l'environnement, la génétique, le microbiote et la réponse immunitaire sont les facteurs principaux impliqués dans la physiopathologie des MIC, mais cette interprétation semble de plus en plus être une simplification non réaliste d'un processus bien plus complexe et multifactoriel. L'environnement est par essence non limité, et évolue continuellement en réponse au comportement humain et à l'évolution ; c'est le concept de « construction de niche » (Laland,

Matthews, and Feldman 2016). Le nombre de gènes est limité, mais ils contiennent des millions de SNPs et d'autres variants en plus d'être caractérisés par une importante pléiotropie (ils agissent sur plusieurs caractères). De plus, ils ne représentent que 1 à 2% du génome et sont régulés par les 98% restants, par la régulation inter-gènes et l'épigénétique. Le microbiote contient des milliards de bactéries, mais aussi des virus et des champignons, qui interagissent entre eux. Le système immunitaire, l'effecteur qui médie l'inflammation et cause les dommages tissulaires, est relativement pauvre en termes de diversité cellulaire, mais ses produits de sécrétion augmentent considérablement ses capacités biologiques, d'autant plus qu'elles s'influencent mutuellement.

Il paraît donc logique qu'un traitement ne puisse traiter tous les malades atteints de ces maladies, si tant est que le cadre diagnostic soit suffisamment pertinent au niveau de la physiopathologie (les mécanismes mis en jeu peuvent être plus proches entre une SpA et un certain type de MICI qu'entre deux MICI).

7.2.2 L'intégration complète des données comme solution au développement de thérapies spécifiques d'une cible

Comment donc comprendre les mécanismes mis en jeu à l'échelle d'un individu au niveau biologique et moléculaire, et ainsi choisir rationnellement la meilleure option thérapeutique ? L'histoire de la maladie, l'examen clinique, les analyses de laboratoire, l'imagerie, l'endoscopie et les biopsies n'apprennent quasiment rien des expositions environnementales, des anomalies génétiques rares, de la composition, des interactions du microbiote digestif et des mécanismes inflammatoires spécifiquement impliqués.

Le clinicien n'a pas d'autre choix que de traiter les patients avec une série de traitements non-spécifiques anti-inflammatoires ou anti-microbiens, et d'espérer une réponse positive, tout en sachant que cette réponse, même si elle existe, sera rarement complète et de durée limitée (Regueiro *et al.* 2016).

L'approche est clairement limitée par la complexité biologique. De nouveaux traitements, petites molécules ou biothérapies, sont en développement constant, mais ils sont créés dans un vide relatif de connaissance de la complexité réelle et extraordinaire de la physiopathologie des MIC. Ces nouveaux traitements vont bénéficier à des sous-groupes de patients, sans que l'on puisse anticiper lesquels, à quel point ils vont être efficaces et pour combien de temps. Même si poursuivre cette approche est justifiable, des idées et des approches totalement nouvelles sont nécessaires.

La première étape est d'accepter la réalité que ces maladies complexes requièrent des thérapies complexes, un postulat depuis longtemps accepté dans le domaine de l'oncologie. Les traitements basés sur des médicaments uniques, comme c'est souvent le cas, ne permettront jamais d'obtenir des résultats optimaux car les dysfonctionnements moléculaires causant la maladie sont différents pour chaque patient et évoluent au cours de la maladie (Iyengar 2013).

La deuxième étape est d'accepter la complexité biologique et de prendre en compte la variabilité interindividuelle. La complexité biologique est présente à tous les niveaux de l'hôte. Par exemple, les niveaux d'expression protéique sont des phénotypes moléculaires héritables qui varient

considérablement entre les individus, les populations et les sexes. Les modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN varient selon les tissus. Les variants génétiques causent des dérégulations qui sont hautement spécifiques des types cellulaires ou des tissus impliqués dans la pathologie.

Après ce changement de mode de pensée, il faut trouver le moyen de résoudre ces problèmes, ce qui est un défi majeur, que la communauté médicale ne peut pas résoudre seule, et qui nécessite de nouvelles connaissances et de nouveaux partenariats.

Les facteurs associés aux MIC (environnement, gènes, microbiote, système immunitaire) doivent ainsi être étudiés et analysés avec de nouveaux outils.

Le plus critique est que tous ces facteurs, plus tous ceux qui seront certainement découverts prochainement, doivent être intégrés fonctionnellement (N. Subramanian et al. 2015; Te Velde et al. 2016; Hand et al. 2016). C'est seulement après avoir achevé une telle intégration qu'il sera possible d'identifier les molécules clés impliquées dans la maladie pour chaque patient, et de définir un traitement réellement personnalisé.

Deux étapes majeures doivent être réalisées pour cela : 1) identifier et analyser les facteurs pathogéniques dans leur totalité et 2) intégrer la connaissance de toutes les totalités combinées.

7.2.3 Omics, biologie de système et médecine de réseau

L'analyse des facteurs dans leur totalité peut être accomplie par une approche dite « omic », un « ome » étant défini par la totalité d'un système complexe particulier. Cette approche a donné naissance au domaine des « omics », c'est-à-dire à l'étude de tous les « omes » impliqués dans toute maladie complexe, comme l'exposomique (l'exposome étant synonyme d'environnement), la génomique, la métagénomique et l'immunomique, mais aussi d'autres omes probablement impliqués comme l'épigénomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique etc. Le nombre d'omics s'étend si rapidement que leur étude devient un nouveau champ de recherche à part entière. Explorer ce nouveau champ nécessitera le traitement de quantités massives d'informations par de nouvelles méthodes de calcul et d'analyse, ce qui imposera d'appliquer les méthodologies de la biologie de système (Fiocchi 2018).

La biologie de système peut être définie comme la modélisation de systèmes biologiques complexes, ou une approche en recherche biomédicale pour comprendre une vaste organisation en rassemblant ses pièces, ce qui contraste fortement avec des décennies de biologie réductionniste, qui implique l'étude des pièces du puzzle à part. La biologie de système permet ainsi de prendre en compte une énorme quantité d'informations dont le volume et la complexité dépassent largement les capacités d'un esprit humain.

Une fois que tous les omes pertinents sont reconnus et mesurés, l'étape suivante est de comprendre comment ces omes interagissent entre eux, comment ils sont régulés et ce qui contrôle les événements

clés responsables du processus pathologique, par exemple l'inflammation intestinale dans le cadre des MICI. Cette tâche est l'essence de ce qu'on appelle la médecine de réseau (Cusick et al. 2005; D.-Y. Cho, Kim, and Przytycka 2012, 5) et requiert également des approches informatiques. Ces approches peuvent s'inspirer de celles utilisées couramment dans d'autres systèmes complexes non biologiques, comme les réseaux informatiques, les réseaux aériens, financiers ou sociaux.

Dans chaque réseau il existe des éléments qui contrôlent le réseau. S'ils sont éliminés, le réseau est déstabilisé et ne peut plus exercer sa fonction (Gao *et al.* 2014).

Par exemple, le dysfonctionnement d'un serveur informatique rendra tous les ordinateurs connectés inopérants, ou le dysfonctionnement d'un hub contrôlant de nombreux vols déstabilisera un réseau aérien. En transposant ces exemples en termes biologiques, une fois que le contrôleur d'un réseau responsable d'une pathologie comme une MIC est identifié, ce contrôleur devient la cible d'une intervention spécifique qui permettra la désintégration du réseau, c'est-à-dire l'élimination du processus pathologique (Vinayagam *et al.* 2016). Il est intéressant de noter qu'une observation isolée sans prise en compte des différentes interactions pourra aboutir à l'identification de cibles qui ne sont que des conséquences du réseau pathologique. En termes statistiques, il s'agira alors de facteurs de confusion qui ne seront qu'associés au processus pathologique sans en être la cause. Une intervention thérapeutique ciblant ce type de cible sera donc foncièrement inutile. Cela ne veut pas dire que cette cible ne pourra pas être un contrôleur dans un autre cas (chez un autre patient), et que dans cet autre cas l'intervention thérapeutique qui la ciblera ne sera pas efficace.

7.2.4 Interactome : en pratique

Le processus d'assemblage des réseaux biologiques régulateurs commence donc avec la mesure de tous les omics pertinents dans la pathologie, en collectant des échantillons multiples à partir de sources variées à de multiples moments de la maladie (études de suivi longitudinal), et de soumettre les données à une analyse informatique afin de créer un réseau régulateur, autrement appelé un interactome (Vidal, Cusick, and Barabási 2011). Cet interactome est formé d'un grand nombre de nœuds (molécules) et d'un bien plus petit nombre de hubs (nœuds régulateurs clés) qui contrôlent le réseau, tous étant connectés par des bords (Vidal, Cusick, and Barabási 2011; Kidd *et al.* 2014).

De rares études ont tenté d'analyser les interactions entre certains « omes » (Erickson *et al.* 2012), mais de nouvelles approches doivent être développées (de Souza and Fiocchi 2018). Une approche basée sur la biologie de système pour développer et cibler l'interactome des MICI a récemment été rapportée (de Souza, Fiocchi, and Iliopoulos 2017) (Figure 12).

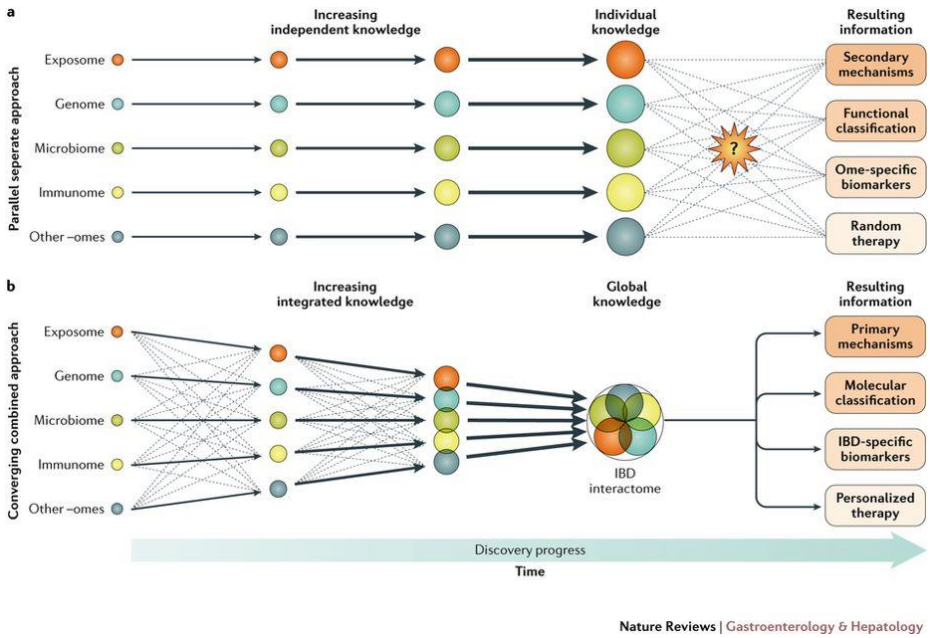


Figure 12 : Expansion des connaissances et construction de l'interactome dans les MICI (de Souza, Fiocchi, and Iliopoulos 2017)

En pratique, il sera extrêmement difficile de collecter et d'analyser tous les échantillons nécessaires à l'élaboration de l'interactome, même en se limitant aux omics actuellement incriminés dans la physiopathologie des MIC, en raison notamment du coût de l'analyse. Une étude de grande envergure longitudinale comprenant de nombreux prélèvements étagés dans le temps est encore plus difficile.

Mais, même en surmontant tous les problèmes d'ordre financier et logistique, il persistera de nombreux autres écueils.

Les algorithmes de « machine learning » nécessitent des données nombreuses et de qualité (Obermeyer and Emanuel 2016).
Dans le cadre de méta-analyses, l'hétérogénéité des méthodes d'analyse rendra délicates les comparaisons entre les études. Par exemple, ne serait-ce que pour l'analyse du 16S, il n'existe actuellement pas de méthode standardisée permettant de corriger les seules variations induites par des méthodes d'extraction différentes, en sachant qu'il ne s'agit que d'une étape dans l'obtention de résultats pertinents. Des recommandations de bonne pratique pour l'analyse du microbiome sont d'ores et déjà disponibles, mais actuellement non généralisées ; elles évolueront de plus rapidement, parallèlement à l'évolution des techniques (Knight *et al.* 2018).

Enfin, et c'est peut-être le plus important, le recueil des données cliniques est un point de faiblesse majeur. Il existe une grande variabilité inter-observateurs, même entre cliniciens experts. Les critères diagnostiques mêmes de ces maladies peuvent varier selon les pays. De plus, les MIC étant fréquemment associées à des pathologies fonctionnelles, distinguer les symptômes causés par la maladie inflammatoire elle-même et ceux induits par la maladie fonctionnelle est une gageure. Cela est d'une importance capitale, car une approche informatique modifiera son algorithme de façon non pertinente cliniquement si, par exemple, un nouveau time point pour un patient atteint de MC chez qui des prélèvements multiples ont été réalisés est associé à une poussée de la maladie alors qu'il s'agit en fait de symptômes de syndrome de l'intestin irritable. Inversement, l'intégration de données

multiples permettra peut-être une meilleure différenciation des manifestations cliniques (« organiques », inflammatoires *vs* « fonctionnelles» dans l'exemple précédent) . Cette différenciation, s'il n'est pas certain qu'elle soit pertinente au point de vue physiopathologique, permettra cependant une prise en charge thérapeutique rationnelle.

Un contrôle de la qualité des informations prises en compte dans l'analyse informatique est donc absolument indispensable, et même un contrôle optimal ne permettra que difficilement d'éviter des erreurs. De plus, l'élaboration d'algorithmes prenant en compte des données parcellaires (si, par exemple, il manque une ou plusieurs données omics) est nécessaire compte tenu des contraintes cliniques.

La construction d'un interactome peut démarrer avec une sélection de gènes issus de bases de données existantes comme les GWAS, et des « modules de pathologie » précédemment identifiés dans la littérature. Cela permettra au final une interprétation biologique du module de pathologie, la priorisation des mécanismes les plus importants et l'identification de cibles moléculaires qui contrôlent le réseau pathologique entier (l'interactome de la maladie). Cela devra être suivi d'un screening de découverte à haut débit visant à associer les médicaments existant dans les banques de données aux cibles moléculaires identifiées.

La séquence ci-dessus requiert non seulement des données cliniques excellentes, mais aussi une analyse bioinformatique complexe et performante, conduite par des bioinformaticiens ayant des connaissances dans les pathologies étudiées. C'est pourquoi, afin de résoudre les maladies complexes que sont les MIC, l'intégration devra survenir non seulement au niveau biologique mais également à l'échelle professionnelle (Bourzac 2015).

7.2.5 Capacités analytiques humaines, intelligence artificielle et expérience

La médecine devient de plus en plus dépendante de multiples technologies, et la quantité d'information qui peut être produite par l'observation détaillée d'un patient dépassera bientôt la capacité analytique du clinicien le plus expérimenté et le plus docte (Obermeyer and Emanuel 2016). Cette analyse va bien au-delà de la capacité d'un seul professionnel, et l'intelligence artificielle va progressivement devenir indispensable (Obermeyer and Lee 2017). L'intégration de la connaissance médicale et informatique est obligatoire pour permettre un réel progrès dans le diagnostic et la prise en charge des MIC ou de toute autre maladie complexe. L'IA est prête à traiter les quantités croissant continuellement, générées par la science fondamentale, la recherche translationnelle, les études cliniques et les outils portables de mesure de la santé (Hamet and Tremblay 2017).

Mais la science de la complexité suggère qu'il est souvent plus efficace d'essayer de multiples approches et de laisser survenir des découvertes en décalant progressivement l'attention vers les solutions qui semblent fonctionner le mieux. Des modèles comme celui du praticien réflexif de Schön (J. Stewart 1984), le modèle d'apprentissage expérimental de Kolb (Kolb 1984) et le cycle d'amélioration de la qualité « plan-do-study-act » (Berwick 1998) sont des exemples d'activités qui explorent les nouvelles possibilités par l'expérimentation, l'autonomie, et le travail à la lisière de la connaissance et de l'expérience.

Pour nous adapter à la complexité croissante dans les soins nous devons abandonner les modèles linéaires, accepter l'imprévisibilité, respecter (et utiliser) l'autonomie et la créativité, et répondre de manière flexible aux modèles et opportunités émergents (Plsek and Greenhalgh 2001). A l'heure actuelle, au point de vue thérapeutique, la solution la plus simple et probablement la plus inoffensive, car facilement réversible, pour moduler la composition voire la fonction du microbiote intestinal, serait une intervention alimentaire. Une approche de type machine-learning est indispensable pour proposer des interventions diététiques personnalisées, et a déjà été proposée notamment par Zeevi *et al.* dans la prise en charge du diabète (Zeevi *et al.* 2015).

Une stratégie triple, basée sur 1) la poursuite de l'approche thérapeutique classique (fish/target) qui a tout de même fait ses preuves 2) l'utilisation dès maintenant d'approches innovantes 3) le développement de nouvelles approches intégrées, est probablement la meilleure. Mon travail s'intégrait dans le point 2) ; j'espère avoir l'occasion de développer le point 3) au cours de ma carrière.

We shall not cease from exploration
And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time.

T.S. Eliot, Four Quartets

Bibliographie

Abegunde, Ayokunle T., Bashir H. Muhammad, Owais Bhatti, and Tauseef Ali. 2016. 'Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: Evidence Based Literature Review'. *World Journal of Gastroenterology* 22 (27): 6296–6317. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i27.6296.

Abeles, Shira R., and David T. Pride. 2014. 'Molecular Bases and Role of Viruses in the Human Microbiome'. *Journal of Molecular Biology* 426 (23): 3892–3906. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.002.

Allez, Matthieu, Konstantinos Karmiris, Edouard Louis, Gert Van Assche, Shomron Ben-Horin, Amir Klein, Janneke Van der Woude, et al. 2010. 'Report of the ECCO Pathogenesis Workshop on Anti-TNF Therapy Failures in Inflammatory Bowel Diseases: Definitions, Frequency and Pharmacological Aspects'. *Journal of Crohn's & Colitis* 4 (4): 355–66. https://doi.org/10.1016/j.crohns.2010.04.004.

Al-Mossawi, M. H., J. De Wit, B. Kendrick, R. Gundle, and P. Bowness. 2015. 'A1.1 Identification and Phenotyping of Innate Lymphoid Cells Present in the Diseased Joints of Patients with Spondyloarthritis, Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis'. *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (Suppl 1): A1–A1. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207259.1.

Ambarus, Carmen, Nataliya Yeremenko, Paul P. Tak, and Dominique Baeten. 2012. 'Pathogenesis of Spondyloarthritis: Autoimmune or Autoinflammatory?' *Current Opinion in Rheumatology* 24 (4): 351–58. https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283534df4.

Aminov, Rustam I. 2013. 'Role of Archaea in Human Disease'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (August). https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00042.

Ardizzone, S., P. Sarzi Puttini, A. Cassinotti, and G. Bianchi Porro. 2008. 'Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease'. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 40 Suppl 2 (July): S253-259. https://doi.org/10.1016/S1590-8658(08)60534-4.

Arends, Suzanne, Elisabeth Brouwer, Eveline van der Veer, Henk Groen, Martha K. Leijsma, Pieternella M. Houtman, Tim L. Th A Jansen, Cees G. M. Kallenberg, and Anneke Spoorenberg. 2011. 'Baseline Predictors of Response and Discontinuation of Tumor Necrosis Factor-Alpha Blocking Therapy in Ankylosing Spondylitis: A Prospective Longitudinal Observational Cohort Study'. *Arthritis Research & Therapy* 13 (3): R94. https://doi.org/10.1186/ar3369.

Arijs, Ingrid, Roel Quintens, Leentje Van Lommel, Kristel Van Steen, Gert De Hertogh, Katleen Lemaire, Anica Schraenen, et al. 2010. 'Predictive Value of Epithelial Gene Expression Profiles for Response to Infliximab in Crohn's Disease'. *Inflammatory Bowel Diseases* 16 (12): 2090–98. https://doi.org/10.1002/ibd.21301.

Arpaia, Nicholas, Clarissa Campbell, Xiying Fan, Stanislav Dikiy, Joris van der Veeken, Paul deRoos, Hui Liu, et al. 2013. 'Metabolites Produced by Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T-Cell Generation'. *Nature* 504 (7480): 451–55. https://doi.org/10.1038/nature12726.

Asquith, Mark, and James T. Rosenbaum. 2016. 'The Interaction between Host Genetics and the Microbiome in the Pathogenesis of Spondyloarthropathies'. *Current Opinion in Rheumatology* 28 (4): 405–12. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000299.

Asquith, Mark, Patrick Stauffer, Sean Davin, Claire Mitchell, Phoebe Lin MDPhD, and James T. Rosenbaum. 2016. 'Perturbed Mucosal Immunity and Dysbiosis Accompany Clinical Disease in a Rat Model of Spondyloarthritis'. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, March. https://doi.org/10.1002/art.39681.

Babickova, Janka, and Roman Gardlik. 2015. 'Pathological and Therapeutic Interactions between Bacteriophages, Microbes and the Host in Inflammatory Bowel Disease'. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 21 (40): 11321–30. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11321.

Bäckhed, Fredrik, Josefine Roswall, Yangqing Peng, Qiang Feng, Huijue Jia, Petia Kovatcheva-Datchary, Yin Li, et al. 2015. 'Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life'. *Cell Host & Microbe* 17 (6): 852. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.012.

Baerlecken, N. T., S. Nothdorft, G. H. Stummvoll, J. Sieper, M. Rudwaleit, S. Reuter, T. Matthias, R. E. Schmidt, and T. Witte. 2014. 'Autoantibodies against CD74 in Spondyloarthritis'. *Annals of the Rheumatic Diseases* 73 (6): 1211–14. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202208.

Baert, F. J., G. R. D'Haens, M. Peeters, M. I. Hiele, T. F. Schaible, D. Shealy, K. Geboes, and P. J. Rutgeerts. 1999. 'Tumor Necrosis Factor Alpha Antibody (Infliximab) Therapy Profoundly down-Regulates the Inflammation in Crohn's Ileocolitis'. *Gastroenterology* 116 (1): 22–28.

Bai, Aiping, Nonghua Lu, Yuan Guo, Zhanju Liu, Jiang Chen, and Zhikang Peng. 2009. 'All-Trans Retinoic Acid down-Regulates Inflammatory Responses by Shifting the Treg/Th17 Profile in Human Ulcerative and Murine Colitis'. *Journal of Leukocyte Biology* 86 (4): 959–69. https://doi.org/10.1189/jlb.0109006.

Barber, Grant E., Vijay Yajnik, Hamed Khalili, Cosmas Giallourakis, John Garber, Ramnik Xavier, and Ashwin N. Ananthakrishnan. 2016. 'Genetic Markers Predict Primary Non-Response and Durable Response To Anti-TNF Biologic Therapies in Crohn's Disease'. *The American Journal of Gastroenterology* 111 (12): 1816–22. https://doi.org/10.1038/ajg.2016.408.

Bazin, Thomas, Katarzyna B. Hooks, Thomas Barnetche, Marie-Elise Truchetet, Raphaël Enaud, Christophe Richez, Maxime Dougados, et al. 2018. 'Microbiota Composition May Predict Anti-Tnf Alpha Response in Spondyloarthritis Patients: An Exploratory Study'. *Scientific Reports* 8 (1): 5446. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23571-4.

Belkaid, Yasmine, and Timothy Hand. 2014. 'Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation'. *Cell* 157 (1): 121–41. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011.

Benjamin, Michael, and Dennis McGonagle. 2009. 'The Enthesis Organ Concept and Its Relevance to the Spondyloarthropathies'. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 649: 57–70.

Berthelot, Jean-Marie, and Pascal Claudepierre. 2016. 'Trafficking of Antigens from Gut to Sacroiliac Joints and Spine in Reactive Arthritis and Spondyloarthropathies: Mainly through Lymphatics?' *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme* 83 (5): 485–90. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2015.10.015.

Berthelot, Jean-Marie, and Jean Sibilia. 2016. 'Rampant Infections of Bone Marrow Stem Cell Niches as Triggers for Spondyloarthropathies and Rheumatoid Arthritis'. *Clinical and Experimental Rheumatology* 34 (2): 329–36.

Berwick, D. M. 1998. 'Developing and Testing Changes in Delivery of Care'. *Annals of Internal Medicine* 128 (8): 651–56.

Bjarnason, I., C. O'Morain, A. J. Levi, and T. J. Peters. 1983. 'Absorption of 51chromium-Labeled Ethylenediaminetetraacetate in Inflammatory Bowel Disease'. *Gastroenterology* 85 (2): 318–22.

Bourzac, Katherine. 2015. 'Collaborations: Mining the Motherlodes'. *Nature* 527 (7576): S8-9. https://doi.org/10.1038/527S8a.

Breban, Maxime, Julien Tap, Ariane Leboime, Roula Said-Nahal, Philippe Langella, Gilles Chiocchia, Jean-Pierre Furet, and Harry Sokol. 2017. 'Faecal Microbiota Study Reveals Specific Dysbiosis in Spondyloarthritis'. *Annals of the Rheumatic Diseases* 76 (9): 1614–22. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-211064.

Brewerton, D. A., F. D. Hart, A. Nicholls, M. Caffrey, D. C. James, and R. D. Sturrock. 1973. 'Ankylosing Spondylitis and HL-A 27'. *Lancet (London, England)* 1 (7809): 904–7.

Brown, Matthew A., Paul A. Bird, Philip C. Robinson, Philip J. Mease, Filip van den Bosch, Christine Surian, Heather Jones, et al. 2017. 'Evaluation of the Effect of Baseline MRI Sacroiliitis and C Reactive Protein Status on Etanercept Treatment Response in Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis: A Post Hoc Analysis of the EMBARK Study'. *Annals of the Rheumatic Diseases*, July. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211313.

Buisine, M. P., P. Desreumaux, V. Debailleul, L. Gambiez, K. Geboes, N. Ectors, M. P. Delescaut, et al. 1999. 'Abnormalities in Mucin Gene Expression in Crohn's Disease'. *Inflammatory Bowel Diseases* 5 (1): 24–32.

Buonocore, Sofia, Philip P. Ahern, Holm H. Uhlig, Ivaylo I. Ivanov, Dan R. Littman, Kevin J. Maloy, and Fiona Powrie. 2010. 'Innate Lymphoid Cells Drive Interleukin-23-Dependent Innate Intestinal Pathology'. *Nature* 464 (7293): 1371–75. https://doi.org/10.1038/nature08949.

Bush, Katherine A., Katherine M. Farmer, Judith S. Walker, and Bruce W. Kirkham. 2002. 'Reduction of Joint Inflammation and Bone Erosion in Rat Adjuvant Arthritis by Treatment with Interleukin-17 Receptor IgG1 Fc Fusion Protein'. *Arthritis and Rheumatism* 46 (3): 802–5. https://doi.org/10.1002/art.10173.

Busquets, David, Teresa Mas-de-Xaxars, Mireia López-Siles, Margarita Martínez-Medina, Anna Bahí, Miriam Sàbat, René Louvriex, Josep Oriol Miquel-Cusachs, Jesus L. Garcia-Gil, and Xavier Aldeguer. 2015. 'Anti-Tumour Necrosis Factor Treatment with Adalimumab Induces Changes in the Microbiota of Crohn's Disease'. *Journal of Crohn's & Colitis* 9 (10): 899–906. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv119.

Byng-Maddick, Rachel, and Michael R. Ehrenstein. 2015. 'The Impact of Biological Therapy on Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis'. *Rheumatology* 54 (5): 768–75. https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu487.

Canfora, Emanuel E., Johan W. Jocken, and Ellen E. Blaak. 2015. 'Short-Chain Fatty Acids in Control of Body Weight and Insulin Sensitivity'. *Nature Reviews Endocrinology* 11 (10): 577–91. https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128.

Cao, Xuetao. 2016. 'Self-Regulation and Cross-Regulation of Pattern-Recognition Receptor Signalling in Health and Disease'. *Nature Reviews. Immunology* 16 (1): 35–50. https://doi.org/10.1038/nri.2015.8.

Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. 'An Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9): 3666–70.

Caruso, Roberta, Neil Warner, Naohiro Inohara, and Gabriel Núñez. 2014. 'NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease'. *Immunity* 41 (6): 898–908. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.010.

Caso, Javier R., Juan C. Leza, and Luis Menchén. 2008. 'The Effects of Physical and Psychological Stress on the Gastro-Intestinal Tract: Lessons from Animal Models'. *Current Molecular Medicine* 8 (4): 299–312.

Challa, Sreerupa, and Francis Ka-Ming Chan. 2010. 'Going up in Flames: Necrotic Cell Injury and Inflammatory Diseases'. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (19): 3241–53. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0413-8.

Chiu, Lynn, Thomas Bazin, Marie-Elise Truchetet, Thierry Schaeverbeke, Laurence Delhaes, and Thomas Pradeu. 2017. 'Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity'. *Frontiers in Immunology* 8 (December). https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01678.

Cho, Dong-Yeon, Yoo-Ah Kim, and Teresa M. Przytycka. 2012. 'Chapter 5: Network Biology Approach to Complex Diseases'. *PLoS Computational Biology* 8 (12): e1002820. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002820.

Cho, Ilseung, and Martin J. Blaser. 2012. 'The Human Microbiome: At the Interface of Health and Disease'. *Nature Reviews. Genetics* 13 (4): 260–70. https://doi.org/10.1038/nrg3182.

Cho, Ilseung, Shingo Yamanishi, Laura Cox, Barbara A. Methé, Jiri Zavadil, Kelvin Li, Zhan Gao, et al. 2012. 'Antibiotics in Early Life Alter the Murine Colonic Microbiome and Adiposity'. *Nature* 488 (7413): 621–26. https://doi.org/10.1038/nature11400.

Ciccia, Francesco, Aroldo Rizzo, and Giovanni Triolo. 2016. 'Subclinical Gut Inflammation in Ankylosing Spondylitis'. *Current Opinion in Rheumatology* 28 (1): 89–96. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000239.

Claesson, Marcus J., Ian B. Jeffery, Susana Conde, Susan E. Power, Eibhlís M. O'Connor, Siobhán Cusack, Hugh M. B. Harris, et al. 2012. 'Gut Microbiota Composition Correlates with Diet and Health in the Elderly'. *Nature* 488 (7410): 178–84. https://doi.org/10.1038/nature11319.

Corridoni, Daniele, Thomas Chapman, Tim Ambrose, and Alison Simmons. 2018. 'Emerging Mechanisms of Innate Immunity and Their Translational Potential in Inflammatory Bowel Disease'. *Frontiers in Medicine* 5: 32. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00032.

Costantino, Félicie, Alice Talpin, Roula Said-Nahal, Marcel Goldberg, Joseph Henny, Gilles Chiocchia, Henri-Jean Garchon, Marie Zins, and Maxime Breban. 2015. 'Prevalence of Spondyloarthritis in Reference to HLA-B27 in the French Population: Results of the GAZEL Cohort'. *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (4): 689–93. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204436.

Costello, E. K., K. Stagaman, L. Dethlefsen, B. J. M. Bohannan, and D. A. Relman. 2012. 'The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome'. *Science* 336 (6086): 1255–62. https://doi.org/10.1126/science.1224203.

Costello, Mary-Ellen, Francesco Ciccia, Dana Willner, Nicole Warrington, Philip C. Robinson, Brooke Gardiner, Mhairi Marshall, Tony J. Kenna, Giovanni Triolo, and Matthew A. Brown. 2014. 'Intestinal Dysbiosis in Ankylosing Spondylitis'. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, November. https://doi.org/10.1002/art.38967.

Costello, Mary-Ellen, Philip C. Robinson, Helen Benham, and Matthew A. Brown. 2015. 'The Intestinal Microbiome in Human Disease and How It Relates to Arthritis and Spondyloarthritis'. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, Infections and Musculoskeletal Conditions, 29 (2): 202–12. https://doi.org/10.1016/j.berh.2015.08.001.

Couturier-Maillard, Aurélie, Thomas Secher, Ateequr Rehman, Sylvain Normand, Adèle De Arcangelis, Robert Haesler, Ludovic Huot, et al. 2013. 'NOD2-Mediated Dysbiosis Predisposes Mice to Transmissible Colitis and Colorectal Cancer'. *The Journal of Clinical Investigation* 123 (2): 700–711. https://doi.org/10.1172/JCI62236.

Coyte, Katharine Z., Jonas Schluter, and Kevin R. Foster. 2015. 'The Ecology of the Microbiome: Networks, Competition, and Stability'. *Science (New York, N.Y.)* 350 (6261): 663–66. https://doi.org/10.1126/science.aad2602.

Cusick, Michael E., Niels Klitgord, Marc Vidal, and David E. Hill. 2005. 'Interactome: Gateway into Systems Biology'. *Human Molecular Genetics* 14 Spec No. 2 (October): R171-181. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi335.

Cuthbert, Richard J., Evangelos M. Fragkakis, Robert Dunsmuir, Zhi Li, Mark Coles, Helena Marzo-Ortega, Peter V. Giannoudis, Elena Jones, Yasser M. El-Sherbiny, and Dennis McGonagle. n.d. 'Brief Report: Group 3 Innate Lymphoid Cells in Human Enthesis'. *Arthritis & Rheumatology* 69 (9): 1816–22. https://doi.org/10.1002/art.40150.

Cypers, Heleen, Liesbet Van Praet, Gaëlle Varkas, and Dirk Elewaut. 2014. 'Relevance of the Gut/Joint Axis for the Management of Spondyloarthritis in Daily Clinical Practice'. *Current Opinion in Rheumatology* 26 (4): 371–76. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000070.

Dasgupta, Suryasarathi, Deniz Erturk-Hasdemir, Javier Ochoa-Reparaz, Hans-Christian Reinecker, and Dennis L. Kasper. 2014. 'Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Anti-Inflammatory Responses to a Gut Commensal Molecule via Both Innate and Adaptive Mechanisms'. *Cell Host & Microbe* 15 (4): 413–23. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.006.

David, Lawrence A., Corinne F. Maurice, Rachel N. Carmody, David B. Gootenberg, Julie E. Button, Benjamin E. Wolfe, Alisha V. Ling, et al. 2014. 'Diet Rapidly and Reproducibly Alters the Human Gut Microbiome'. *Nature* 505 (7484): 559–63. https://doi.org/10.1038/nature12820.

De La Cochetière, M. F., T. Durand, P. Lepage, A. Bourreille, J. P. Galmiche, and J. Doré. 2005. 'Resilience of the Dominant Human Fecal Microbiota upon Short-Course Antibiotic Challenge'. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (11): 5588–92. https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5588-5592.2005.

Dellabona, Paolo, Sergio Abrignani, and Giulia Casorati. 2014. 'INKT-Cell Help to B Cells: A Cooperative Job between Innate and Adaptive Immune Responses'. *European Journal of Immunology* 44 (8): 2230–37. https://doi.org/10.1002/eji.201344399.

Denis, M., D. Campbell, and E. O. Gregg. 1991. 'Interleukin-2 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Stimulate Growth of a Virulent Strain of Escherichia Coli'. *Infection and Immunity* 59 (5): 1853–56.

Devlin, A. Sloan, and Michael A. Fischbach. 2015. 'A Biosynthetic Pathway for a Prominent Class of Microbiota-Derived Bile Acids'. *Nature Chemical Biology* 11 (9): 685–90. https://doi.org/10.1038/nchembio.1864.

D'Haens, G. R., K. Geboes, M. Peeters, F. Baert, F. Penninckx, and P. Rutgeerts. 1998. 'Early Lesions of Recurrent Crohn's Disease Caused by Infusion of Intestinal Contents in Excluded Ileum'. *Gastroenterology* 114 (2): 262–67.

Dignass, Axel, Rami Eliakim, Fernando Magro, Christian Maaser, Yehuda Chowers, Karel Geboes, Gerassimos Mantzaris, et al. 2012. 'Second European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis Part 1: Definitions and Diagnosis'. *Journal of Crohn's & Colitis* 6 (10): 965–90. https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.09.003.

Doherty, Matthew K., Tao Ding, Charlie Koumpouras, Shannon E. Telesco, Calixte Monast, Anuk Das, Carrie Brodmerkel, and Patrick D. Schloss. 2018. 'Fecal Microbiota Signatures Are Associated with Response to Ustekinumab Therapy among Crohn's Disease Patients'. *MBio* 9 (2): e02120-17. https://doi.org/10.1128/mBio.02120-17.

Doria, A., M. Zen, S. Bettio, M. Gatto, N. Bassi, L. Nalotto, A. Ghirardello, L. Iaccarino, and L. Punzi. 2012. 'Autoinflammation and Autoimmunity: Bridging the Divide'. *Autoimmunity Reviews* 12 (1): 22–30. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.07.018.

Duboc, Henri, Sylvie Rajca, Dominique Rainteau, David Benarous, Marie-Anne Maubert, Elodie Quervain, Ginette Thomas, et al. 2013. 'Connecting Dysbiosis, Bile-Acid Dysmetabolism and Gut Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases'. *Gut* 62 (4): 531–39. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302578.

Ebihara, Takashi, Christina Song, Stacy H. Ryu, Beatrice Plougastel-Douglas, Liping Yang, Ditsa Levanon, Yoram Groner, et al. 2015. 'Runx3 Specifies Lineage Commitment of Innate Lymphoid Cells'. *Nature Immunology* 16 (11): 1124–33. https://doi.org/10.1038/ni.3272.

El Mezayen, Rabab, Mohamed El Gazzar, Michael C. Seeds, Charles E. McCall, Stephen C. Dreskin, and Mark R. Nicolls. 2007. 'Endogenous Signals Released from Necrotic Cells Augment Inflammatory Responses to Bacterial Endotoxin'. *Immunology Letters* 111 (1): 36–44. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.04.011.

Ellinghaus, David, Luke Jostins, Sarah L. Spain, Adrian Cortes, Jörn Bethune, Buhm Han, Yu Rang Park, et al. 2016. 'Analysis of Five Chronic Inflammatory Diseases Identifies 27 New Associations and Highlights Disease-Specific Patterns at Shared Loci'. *Nature Genetics* 48 (5): 510–18. https://doi.org/10.1038/ng.3528.

Enaud, Raphaël, Louise-Eva Vandenborght, Noémie Coron, Thomas Bazin, Renaud Prevel, Thierry Schaeverbeke, Patrick Berger, Michael Fayon, Thierry Lamireau, and Laurence Delhaes. 2018. 'The Mycobiome: A Neglected Component in the Microbiota-Gut-Brain Axis'. *Microorganisms* 6 (1). https://doi.org/10.3390/microorganisms6010022.

Erickson, Alison R., Brandi L. Cantarel, Regina Lamendella, Youssef Darzi, Emmanuel F. Mongodin, Chongle Pan, Manesh Shah, et al. 2012. 'Integrated Metagenomics/Metaproteomics Reveals Human Host-Microbiota Signatures of Crohn's Disease'. *PloS One* 7 (11): e49138. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049138.

Ermann, Joerg, Tracy Staton, Jonathan N. Glickman, Rene de Waal Malefyt, and Laurie H. Glimcher. 2014. 'Nod/Ripk2 Signaling in Dendritic Cells Activates IL-17A-Secreting Innate Lymphoid Cells and Drives Colitis in T-Bet-/-.Rag2-/- (TRUC) Mice'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (25): E2559-2566. https://doi.org/10.1073/pnas.1408540111.

Falony, Gwen, Marie Joossens, Sara Vieira-Silva, Jun Wang, Youssef Darzi, Karoline Faust, Alexander Kurilshikov, et al. 2016. 'Population-Level Analysis of Gut Microbiome Variation'. *Science (New York, N.Y.)* 352 (6285): 560–64. https://doi.org/10.1126/science.aad3503.

Fiocchi, Claudio. 2018. 'Inflammatory Bowel Disease: Complexity and Variability Need Integration'. *Frontiers in Medicine* 5 (March). https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00075.

Flamant, Mathurin, and Xavier Roblin. 2018. 'Inflammatory Bowel Disease: Towards a Personalized Medicine'. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 11: 1756283X17745029. https://doi.org/10.1177/1756283X17745029.

Flierl, Michael A., Daniel Rittirsch, Brian A. Nadeau, Anthony J. Chen, J. Vidya Sarma, Firas S. Zetoune, Stephanie R. McGuire, et al. 2007. 'Phagocyte-Derived Catecholamines Enhance Acute Inflammatory Injury'. *Nature* 449 (7163): 721–25. https://doi.org/10.1038/nature06185.

Flierl, Michael A., Daniel Rittirsch, Brian A. Nadeau, J. Vidya Sarma, Danielle E. Day, Alex B. Lentsch, Markus S. Huber-Lang, and Peter A. Ward. 2009. 'Upregulation of Phagocyte-Derived Catecholamines Augments the Acute Inflammatory Response'. *PloS One* 4 (2): e4414. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004414.

Fujimura, Kei E., Tine Demoor, Marcus Rauch, Ali A. Faruqi, Sihyug Jang, Christine C. Johnson, Homer A. Boushey, et al. 2014. 'House Dust Exposure Mediates Gut Microbiome Lactobacillus Enrichment and Airway Immune Defense against Allergens and Virus Infection'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2): 805–10. https://doi.org/10.1073/pnas.1310750111.

Fujimura, Kei E., Alexandra R. Sitarik, Suzanne Havstad, Din L. Lin, Sophia Levan, Douglas Fadrosh, Ariane R. Panzer, et al. 2016. 'Neonatal Gut Microbiota Associates with Childhood Multisensitized Atopy and T Cell Differentiation'. *Nature Medicine* 22 (10): 1187–91. https://doi.org/10.1038/nm.4176.

Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama. 2003. 'Increased Expression of Interleukin 17 in Inflammatory Bowel Disease'. *Gut* 52 (1): 65–70.

Furusawa, Yukihiro, Yuuki Obata, Shinji Fukuda, Takaho A. Endo, Gaku Nakato, Daisuke Takahashi, Yumiko Nakanishi, et al. 2013. 'Commensal Microbe-Derived Butyrate Induces the Differentiation of Colonic Regulatory T Cells'. *Nature* 504 (7480): 446–50. https://doi.org/10.1038/nature12721.

Gao, Jianxi, Yang-Yu Liu, Raissa M. D'Souza, and Albert-László Barabási. 2014. 'Target Control of Complex Networks'. *Nature Communications* 5 (November): 5415. https://doi.org/10.1038/ncomms6415.

Garrett, Wendy S., Graham M. Lord, Shivesh Punit, Geanncarlo Lugo-Villarino, Sarkis K. Mazmanian, Susumu Ito, Jonathan N. Glickman, and Laurie H. Glimcher. 2007. 'Communicable Ulcerative Colitis Induced by T-Bet Deficiency in the Innate Immune System'. *Cell* 131 (1): 33–45. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.017.

Garrity, George, ed. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2 : The Proteobacteria*. 2nd ed. Springer US. //www.springer.com/la/book/9780387950402.

Geng, X., L. Biancone, H. H. Dai, J. J. Lin, N. Yoshizaki, A. Dasgupta, F. Pallone, and K. M. Das. 1998. 'Tropomyosin Isoforms in Intestinal Mucosa: Production of Autoantibodies to Tropomyosin Isoforms in Ulcerative Colitis'. *Gastroenterology* 114 (5): 912–22.

Geremia, Alessandra, Paolo Biancheri, Philip Allan, Gino R. Corazza, and Antonio Di Sabatino. 2014. 'Innate and Adaptive Immunity in Inflammatory Bowel Disease'. *Autoimmunity Reviews* 13 (1): 3–10. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.004.

Ghorpade, Devram Sampat, Srini V. Kaveri, Jagadeesh Bayry, and Kithiganahalli Narayanaswamy Balaji. 2011. 'Cooperative Regulation of NOTCH1 Protein-Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signaling by NOD1, NOD2, and TLR2 Receptors Renders Enhanced Refractoriness to Transforming Growth Factor-Beta (TGF-Beta)- or Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4)-Mediated Impairment of Human Dendritic Cell Maturation'. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (36): 31347–60. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.232413.

Gill, Tejpal, Mark Asquith, James T. Rosenbaum, and Robert A. Colbert. 2015. 'The Intestinal Microbiome in Spondyloarthritis'. *Current Opinion in Rheumatology* 27 (4): 319–25. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000187.

Glucksam-Galnoy, Yifat, Roy Sananes, Nava Silberstein, Pnina Krief, Vladimir V. Kravchenko, Michael M. Meijler, and Tsaffrir Zor. 2013. 'The Bacterial Quorum-Sensing Signal Molecule N-3-Oxo-Dodecanoyl-L-Homoserine Lactone Reciprocally Modulates pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Activated Macrophages'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (1): 337–44. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300368.

Goodrich, Julia K., Jillian L. Waters, Angela C. Poole, Jessica L. Sutter, Omry Koren, Ran Blekhman, Michelle Beaumont, et al. 2014. 'Human Genetics Shape the Gut Microbiome'. *Cell* 159 (4): 789–99. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053.

Guerrero, Ricardo, Lynn Margulis, and Mercedes Berlanga. 2013. 'Symbiogenesis: The Holobiont as a Unit of Evolution'. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 16 (3): 133–43. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.188.

Gupta, Parul, Ravi Kumar Gupta, and Kusum Harjai. 2013. 'Quorum Sensing Signal Molecules Produced by Pseudomonas Aeruginosa Cause Inflammation and Escape Host Factors in Murine Model of Urinary Tract Infection'. *Inflammation* 36 (5): 1153–59. https://doi.org/10.1007/s10753-013-9650-y.

Haiser, Henry J., David B. Gootenberg, Kelly Chatman, Gopal Sirasani, Emily P. Balskus, and Peter J. Turnbaugh. 2013. 'Predicting and Manipulating Cardiac Drug Inactivation by the Human Gut Bacterium Eggerthella Lenta'. *Science (New York, N.Y.)* 341 (6143): 295–98. https://doi.org/10.1126/science.1235872.

Halstensen, T. S., K. M. Das, and P. Brandtzaeg. 1993. 'Epithelial Deposits of Immunoglobulin G1 and Activated Complement Colocalise with the M(r) 40 KD Putative Autoantigen in Ulcerative Colitis'. *Gut* 34 (5): 650–57.

Hamet, Pavel, and Johanne Tremblay. 2017. 'Artificial Intelligence in Medicine'. *Metabolism: Clinical and Experimental* 69S (April): S36–40. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.011.

Hand, Timothy W., Ivan Vujkovic-Cvijin, Vanessa K. Ridaura, and Yasmine Belkaid. 2016. 'Linking the Microbiota, Chronic Disease, and the Immune System'. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 27 (12): 831–43. https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.08.003.

Harrington, Laurie E., Robin D. Hatton, Paul R. Mangan, Henrietta Turner, Theresa L. Murphy, Kenneth M. Murphy, and Casey T. Weaver. 2005. 'Interleukin 17-Producing CD4+ Effector T Cells Develop via a Lineage Distinct from the T Helper Type 1 and 2 Lineages'. *Nature Immunology* 6 (11): 1123–32. https://doi.org/10.1038/ni1254.

Hartmann, Anton, and Adam Schikora. 2012. 'Quorum Sensing of Bacteria and Trans-Kingdom Interactions of N-Acyl Homoserine Lactones with Eukaryotes'. *Journal of Chemical Ecology* 38 (6): 704–13. https://doi.org/10.1007/s10886-012-0141-7.

Heintz-Buschart, Anna, and Paul Wilmes. 2017. 'Human Gut Microbiome: Function Matters'. *Trends in Microbiology*, November. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002.

'HLA-B27 and Risk of Ankylosing Spondylitis'. 1978. *British Medical Journal* 2 (6138): 650–51.

Hogan, J. S., D. A. Todhunter, K. L. Smith, P. S. Schoenberger, and L. M. Sordillo. 1993. 'Growth Responses of Coliform Bacteria to Recombinant Bovine Cytokines'. *Journal of Dairy Science* 76 (4): 978–82. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77425-1.

Holleran, Grainne, Loris Lopetuso, Valentina Petito, Cristina Graziani, Gianluca Ianiro, Deirdre McNamara, Antonio Gasbarrini, and Franco Scaldaferri. 2017. 'The Innate and Adaptive Immune System as Targets for Biologic Therapies in Inflammatory Bowel Disease'. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (10). https://doi.org/10.3390/ijms18102020.

Hong, Pei-Ying, Jennifer A. Croix, Eugene Greenberg, H. Rex Gaskins, and Roderick I. Mackie. 2011. 'Pyrosequencing-Based Analysis of the Mucosal Microbiota in Healthy Individuals Reveals Ubiquitous Bacterial Groups and Micro-Heterogeneity'. *PLoS ONE* 6 (9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025042.

Hooks, Katarzyna B., and Maureen A. O'Malley. 2017. 'Dysbiosis and Its Discontents'. *MBio* 8 (5). https://doi.org/10.1128/mBio.01492-17.

Horiuchi, Takahiko, Hiroki Mitoma, Shin-ichi Harashima, Hiroshi Tsukamoto, and Terufumi Shimoda. 2010. 'Transmembrane TNF-α: Structure, Function and Interaction with Anti-TNF Agents'.

Rheumatology (Oxford, England) 49 (7): 1215–28. https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031.

Hove, T. ten, C. van Montfrans, M. P. Peppelenbosch, and S. J. H. van Deventer. 2002. 'Infliximab Treatment Induces Apoptosis of Lamina Propria T Lymphocytes in Crohn's Disease'. *Gut* 50 (2): 206–11.

Hsiao, Ansel, A. M. Shamsir Ahmed, Sathish Subramanian, Nicholas W. Griffin, Lisa L. Drewry, William A. Petri, Rashidul Haque, Tahmeed Ahmed, and Jeffrey I. Gordon. 2014. 'Members of the Human Gut Microbiota Involved in Recovery from Vibrio Cholerae Infection'. *Nature* 515 (7527): 423–26. https://doi.org/10.1038/nature13738.

Hueber, Wolfgang, Bruce E. Sands, Steve Lewitzky, Marc Vandemeulebroecke, Walter Reinisch, Peter D. R. Higgins, Jan Wehkamp, et al. 2012. 'Secukinumab, a Human Anti-IL-17A Monoclonal Antibody, for Moderate to Severe Crohn's Disease: Unexpected Results of a Randomised, Double-Blind Placebo-Controlled Trial'. *Gut* 61 (12): 1693–1700. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301668.

Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cézard, J. Belaiche, S. Almer, et al. 2001. 'Association of NOD2 Leucine-Rich Repeat Variants with Susceptibility to Crohn's Disease'. *Nature* 411 (6837): 599–603. https://doi.org/10.1038/35079107.

Huibregtse, I. L., A. U. van Lent, and S. J. H. van Deventer. 2007. 'Immunopathogenesis of IBD: Insufficient Suppressor Function in the Gut?' *Gut* 56 (4): 584–92. https://doi.org/10.1136/gut.2006.103523.

Human Microbiome Project Consortium. 2012. 'Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome'. *Nature* 486 (7402): 207–14. https://doi.org/10.1038/nature11234.

Huseyin, Chloe E., Paul W. O'Toole, Paul D. Cotter, and Pauline D. Scanlan. 2017. 'Forgotten Fungi-the Gut Mycobiome in Human Health and Disease'. *FEMS Microbiology Reviews* 41 (4): 479–511. https://doi.org/10.1093/femsre/fuw047.

Ijssennagger, Noortje, Clara Belzer, Guido J. Hooiveld, Jan Dekker, Saskia W. C. van Mil, Michael Müller, Michiel Kleerebezem, and Roelof van der Meer. 2015. 'Gut Microbiota Facilitates Dietary Heme-Induced Epithelial Hyperproliferation by Opening the Mucus Barrier in Colon'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (32): 10038–43. https://doi.org/10.1073/pnas.1507645112.

Ina, K., J. Itoh, K. Fukushima, K. Kusugami, T. Yamaguchi, K. Kyokane, A. Imada, et al. 1999. 'Resistance of Crohn's Disease T Cells to Multiple Apoptotic Signals Is Associated with a Bcl-2/Bax Mucosal Imbalance'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (2): 1081–90.

Ito, Tomoki, Yui-Hsi Wang, Omar Duramad, Toshiyuki Hori, Guy J. Delespesse, Norihiko Watanabe, F. Xiao-Feng Qin, Zhengbin Yao, Wei Cao, and Yong-Jun Liu. 2005. 'TSLP-Activated Dendritic Cells Induce an Inflammatory T Helper Type 2 Cell Response through OX40 Ligand'. *The Journal of Experimental Medicine* 202 (9): 1213–23. https://doi.org/10.1084/jem.20051135.

Ivanov, Ivaylo I., Koji Atarashi, Nicolas Manel, Eoin L. Brodie, Tatsuichiro Shima, Ulas Karaoz, Dongguang Wei, et al. 2009. 'Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria'. *Cell* 139 (3): 485–98. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033.

Iyengar, Ravi. 2013. 'Complex Diseases Require Complex Therapies'. *EMBO Reports* 14 (12): 1039–42. https://doi.org/10.1038/embor.2013.177.

J. Stewart, Cynthia. 1984. 'The Reflective Practitioner: How Professionals Think in Action : Donald A. Schon, Basic Books, New York, 1983'. *Patient Education and Counseling* 5 (December). https://doi.org/10.1016/0738-3991(84)90022-3.

Janeway, Charles A., and Ruslan Medzhitov. 2002. 'Innate Immune Recognition'. *Annual Review of Immunology* 20: 197–216. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

Joffre, Olivier, Martijn A. Nolte, Roman Spörri, and Caetano Reis e Sousa. 2009. 'Inflammatory Signals in Dendritic Cell Activation and the Induction of Adaptive Immunity'. *Immunological Reviews* 227 (1): 234–47. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x.

Johansson, Malin E. V., Jenny K. Gustafsson, Jessica Holmén-Larsson, Karolina S. Jabbar, Lijun Xia, Hua Xu, Fayez K. Ghishan, et al. 2014. 'Bacteria Penetrate the Normally Impenetrable Inner Colon

Mucus Layer in Both Murine Colitis Models and Patients with Ulcerative Colitis'. *Gut* 63 (2): 281–91. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303207.

Johns, M. A., J. D. Sipe, L. B. Melton, T. B. Strom, and W. R. McCabe. 1988. 'Endotoxin-Associated Protein: Interleukin-1-like Activity on Serum Amyloid A Synthesis and T-Lymphocyte Activation'. *Infection and Immunity* 56 (6): 1593–1601.

Jones-Hall, Yava L., Ariangela Kozik, and Cindy Nakatsu. 2015. 'Ablation of Tumor Necrosis Factor Is Associated with Decreased Inflammation and Alterations of the Microbiota in a Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease'. *PloS One* 10 (3): e0119441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119441.

Kanangat, S., M. S. Bronze, G. U. Meduri, A. Postlethwaite, F. Stentz, E. Tolley, and D. Schaberg. 2001. 'Enhanced Extracellular Growth of Staphylococcus Aureus in the Presence of Selected Linear Peptide Fragments of Human Interleukin (IL)-1beta and IL-1 Receptor Antagonist'. *The Journal of Infectious Diseases* 183 (1): 65–69. https://doi.org/10.1086/317645.

Kanangat, S., G. U. Meduri, E. A. Tolley, D. R. Patterson, C. U. Meduri, C. Pak, J. P. Griffin, M. S. Bronze, and D. R. Schaberg. 1999. 'Effects of Cytokines and Endotoxin on the Intracellular Growth of Bacteria'. *Infection and Immunity* 67 (6): 2834–40.

Karavolos, Michail H., and C. M. Anjam Khan. 2014. 'Multidirectional Chemical Signalling between Mammalian Hosts, Resident Microbiota, and Invasive Pathogens: Neuroendocrine Hormone-Induced Changes in Bacterial Gene Expression'. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 817: 241–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_11.

Karavolos, Michail H., Klaus Winzer, Paul Williams, and C. M. Anjam Khan. 2013. 'Pathogen Espionage: Multiple Bacterial Adrenergic Sensors Eavesdrop on Host Communication Systems'. *Molecular Microbiology* 87 (3): 455–65. https://doi.org/10.1111/mmi.12110.

Kawasaki, Kiyoshi, Robert K. Ernst, and Samuel I. Miller. 2004. 'Deacylation and Palmitoylation of Lipid A by Salmonellae Outer Membrane Enzymes Modulate Host Signaling through Toll-like Receptor 4'. *Journal of Endotoxin Research* 10 (6): 439–44. https://doi.org/10.1179/096805104225006264.

Keubler, Lydia M., Manuela Buettner, Christine Häger, and André Bleich. 2015. 'A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10-Deficient Mouse'. *Inflammatory Bowel Diseases* 21 (8): 1967–75. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000468.

Kidd, Brian A., Lauren A. Peters, Eric E. Schadt, and Joel T. Dudley. 2014. 'Unifying Immunology with Informatics and Multiscale Biology'. *Nature Immunology* 15 (2): 118–27. https://doi.org/10.1038/ni.2787.

Kim, Myunghoo, Carolina Galan, Andrea A. Hill, Wan-Jung Wu, Hannah Fehlner-Peach, Hyo Won Song, Deborah Schady, et al. 2018. 'Critical Role for the Microbiota in CX3CR1+ Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses'. *Immunity* 49 (1): 151-163.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.009.

Knight, Rob, Alison Vrbanac, Bryn C. Taylor, Alexander Aksenov, Chris Callewaert, Justine Debelius, Antonio Gonzalez, et al. 2018. 'Best Practices for Analysing Microbiomes'. *Nature Reviews Microbiology* 16 (7): 410–22. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9.

Knights, Dan, Mark S. Silverberg, Rinse K. Weersma, Dirk Gevers, Gerard Dijkstra, Hailiang Huang, Andrea D. Tyler, et al. 2014. 'Complex Host Genetics Influence the Microbiome in Inflammatory Bowel Disease'. *Genome Medicine* 6 (12): 107. https://doi.org/10.1186/s13073-014-0107-1.

Kobayashi, Koichi S., Mathias Chamaillard, Yasunori Ogura, Octavian Henegariu, Naohiro Inohara, Gabriel Nuñez, and Richard A. Flavell. 2005. 'Nod2-Dependent Regulation of Innate and Adaptive Immunity in the Intestinal Tract'. *Science (New York, N.Y.)* 307 (5710): 731–34. https://doi.org/10.1126/science.1104911.

Kolb, David. 1984. *Experiential Learning: Experience As The Source Of Learning And Development*. Vol. 1.

Kolho, Kaija-Leena, Katri Korpela, Tytti Jaakkola, Madharasi V. A. Pichai, Erwin G. Zoetendal, Anne Salonen, and Willem M. de Vos. 2015. 'Fecal Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel

Disease and Its Relation to Inflammation'. *The American Journal of Gastroenterology* 110 (6): 921–30. https://doi.org/10.1038/ajg.2015.149.

Koren, Omry, Julia K. Goodrich, Tyler C. Cullender, Aymé Spor, Kirsi Laitinen, Helene Kling Bäckhed, Antonio Gonzalez, et al. 2012. 'Host Remodeling of the Gut Microbiome and Metabolic Changes during Pregnancy'. *Cell* 150 (3): 470–80. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.008.

Kruglov, Andrey A., Sergei I. Grivennikov, Dmitry V. Kuprash, Caroline Winsauer, Sandra Prepens, Gitta Maria Seleznik, Gerard Eberl, et al. 2013. 'Nonredundant Function of Soluble LTα3 Produced by Innate Lymphoid Cells in Intestinal Homeostasis'. *Science* 342 (6163): 1243–46. https://doi.org/10.1126/science.1243364.

Kullberg, Marika C., John F. Andersen, Peter L. Gorelick, Patricia Caspar, Sebastian Suerbaum, James G. Fox, Allen W. Cheever, Dragana Jankovic, and Alan Sher. 2003. 'Induction of Colitis by a CD4+ T Cell Clone Specific for a Bacterial Epitope'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26): 15830–35. https://doi.org/10.1073/pnas.2534546100.

Laland, Kevin, Blake Matthews, and Marcus W. Feldman. 2016. 'An Introduction to Niche Construction Theory'. *Evolutionary Ecology* 30: 191–202. https://doi.org/10.1007/s10682-016-9821-z.

Langille, Morgan G. I., Jesse Zaneveld, J. Gregory Caporaso, Daniel McDonald, Dan Knights, Joshua A. Reyes, Jose C. Clemente, et al. 2013. 'Predictive Functional Profiling of Microbial Communities Using 16S RRNA Marker Gene Sequences'. *Nature Biotechnology* 31 (9): 814–21. https://doi.org/10.1038/nbt.2676.

Lawrence, Toby. 2009. 'The Nuclear Factor NF-KappaB Pathway in Inflammation'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (6): a001651. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651.

Lee, Jin-Hwa, Lorenzo Del Sorbo, Aye Aye Khine, Joyce de Azavedo, Donald E. Low, David Bell, Stefan Uhlig, Arthur S. Slutsky, and Haibo Zhang. 2003. 'Modulation of Bacterial Growth by Tumor Necrosis Factor-Alpha in Vitro and in Vivo'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (12): 1462–70. https://doi.org/10.1164/rccm.200302-303OC.

Lee, Seon-Yeong, Seung Hoon Lee, Eun-Ji Yang, Eun-Kyung Kim, Jae-Kyung Kim, Dong-Yun Shin, and Mi-La Cho. 2015. 'Metformin Ameliorates Inflammatory Bowel Disease by Suppression of the STAT3 Signaling Pathway and Regulation of the between Th17/Treg Balance'. *PloS One* 10 (9): e0135858. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135858.

Lesouhaitier, Olivier, Wilfried Veron, Annelise Chapalain, Amar Madi, Anne-Sophie Blier, Audrey Dagorn, Nathalie Connil, Sylvie Chevalier, Nicole Orange, and Marc Feuilloley. 2009. 'Gram-Negative Bacterial Sensors for Eukaryotic Signal Molecules'. *Sensors (Basel, Switzerland)* 9 (9): 6967–90. https://doi.org/10.3390/s90906967.

Lin, Phoebe, Mary Bach, Mark Asquith, Aaron Y. Lee, Lakshmi Akileswaran, Patrick Stauffer, Sean Davin, et al. 2014. 'HLA-B27 and Human B2-Microglobulin Affect the Gut Microbiota of Transgenic Rats'. *PloS One* 9 (8): e105684. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105684.

Liu, Ming, Shanshan Yang, Chengkun Zheng, Xuesong Luo, Weicheng Bei, and Peng Cai. 2018. 'Binding to Type I Collagen Is Essential for the Infectivity of Vibrio Parahaemolyticus to Host Cells'. *Cellular Microbiology*, May, e12856. https://doi.org/10.1111/cmi.12856.

Loddo, Italia, and Claudio Romano. 2015. 'Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis'. *Frontiers in Immunology* 6: 551. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00551.

Lubberts, Erik, Marije I. Koenders, Birgitte Oppers-Walgreen, Liduine van den Bersselaar, Christina J. J. Coenen-de Roo, Leo A. B. Joosten, and Wim B. van den Berg. 2004. 'Treatment with a Neutralizing Anti-Murine Interleukin-17 Antibody after the Onset of Collagen-Induced Arthritis Reduces Joint Inflammation, Cartilage Destruction, and Bone Erosion'. *Arthritis and Rheumatism* 50 (2): 650–59. https://doi.org/10.1002/art.20001.

Lukas, C., M. Dougados, and B. Combe. 2016. 'Factors Associated with a Bad Functional Prognosis in Early Inflammatory Back Pain: Results from the DESIR Cohort'. *RMD Open* 2 (1): e000204. https://doi.org/10.1136/rmdopen-2015-000204.

Luo, Annie, Steven T. Leach, Romain Barres, Luke B. Hesson, Michael C. Grimm, and David Simar. 2017. 'The Microbiota and Epigenetic Regulation of T Helper 17/Regulatory T Cells: In Search of a Balanced Immune System'. *Frontiers in Immunology* 8: 417. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00417.

Luo, G., D. W. Niesel, R. A. Shaban, E. A. Grimm, and G. R. Klimpel. 1993. 'Tumor Necrosis Factor Alpha Binding to Bacteria: Evidence for a High-Affinity Receptor and Alteration of Bacterial Virulence Properties'. *Infection and Immunity* 61 (3): 830–35.

Lynch, Susan V., and Oluf Pedersen. 2016. 'The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease'. *The New England Journal of Medicine* 375 (24): 2369–79. https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266.

Lyte, M., and S. Ernst. 1992. 'Catecholamine Induced Growth of Gram Negative Bacteria'. *Life Sciences* 50 (3): 203–12.

Lyte, Mark. 2004. 'Microbial Endocrinology and Infectious Disease in the 21st Century'. *Trends in Microbiology* 12 (1): 14–20.

Machiels, Kathleen, Marie Joossens, João Sabino, Vicky De Preter, Ingrid Arijs, Venessa Eeckhaut, Vera Ballet, et al. 2014. 'A Decrease of the Butyrate-Producing Species Roseburia Hominis and Faecalibacterium Prausnitzii Defines Dysbiosis in Patients with Ulcerative Colitis'. *Gut* 63 (8): 1275–83. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304833.

Magnusson, Maria K., Hans Strid, Maria Sapnara, Anders Lasson, Antal Bajor, Kjell-Arne Ung, and Lena Öhman. 2016. 'Anti-TNF Therapy Response in Patients with Ulcerative Colitis Is Associated with Colonic Antimicrobial Peptide Expression and Microbiota Composition'. *Journal of Crohn's & Colitis* 10 (8): 943–52. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw051.

Mahdavi, Jafar, Pierre-Joseph Royer, Hong S. Sjölinder, Sheyda Azimi, Tim Self, Jeroen Stoof, Lee M. Wheldon, et al. 2013. 'Pro-Inflammatory Cytokines Can Act as Intracellular Modulators of Commensal Bacterial Virulence'. *Open Biology* 3 (10): 130048. https://doi.org/10.1098/rsob.130048.

Maldonado, M. A., V. Kakkanaiah, G. C. MacDonald, F. Chen, E. A. Reap, E. Balish, W. R. Farkas, et al. 1999. 'The Role of Environmental Antigens in the Spontaneous Development of Autoimmunity in MRL-Lpr Mice'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (11): 6322–30.

Manfredo Vieira, S., M. Hiltensperger, V. Kumar, D. Zegarra-Ruiz, C. Dehner, N. Khan, F. R. C. Costa, et al. 2018. 'Translocation of a Gut Pathobiont Drives Autoimmunity in Mice and Humans'. *Science (New York, N.Y.)* 359 (6380): 1156–61. https://doi.org/10.1126/science.aar7201.

Manthiram, Kalpana, Qing Zhou, Ivona Aksentijevich, and Daniel L. Kastner. 2017. 'The Monogenic Autoinflammatory Diseases Define New Pathways in Human Innate Immunity and Inflammation'. *Nature Immunology* 18 (8): 832–42. https://doi.org/10.1038/ni.3777.

Matsuda, Jennifer L., Thierry Mallevaey, James Scott-Browne, and Laurent Gapin. 2008. 'CD1d-Restricted INKT Cells, the "Swiss-Army Knife" of the Immune System'. *Current Opinion in Immunology* 20 (3): 358–68. https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.018.

Matzinger, Polly. 2002. 'The Danger Model: A Renewed Sense of Self'. *Science (New York, N.Y.)* 296 (5566): 301–5. https://doi.org/10.1126/science.1071059.

Maul, Jochen, Christoph Loddenkemper, Pamela Mundt, Erika Berg, Thomas Giese, Andreas Stallmach, Martin Zeitz, and Rainer Duchmann. 2005. 'Peripheral and Intestinal Regulatory CD4+ CD25(High) T Cells in Inflammatory Bowel Disease'. *Gastroenterology* 128 (7): 1868–78.

Maurice, Corinne Ferrier, Henry Joseph Haiser, and Peter James Turnbaugh. 2013. 'Xenobiotics Shape the Physiology and Gene Expression of the Active Human Gut Microbiome'. *Cell* 152 (1–2): 39–50. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.052.

Maxwell, Lara J., Jane Zochling, Annelies Boonen, Jasvinder A. Singh, Mirella M. S. Veras, Elizabeth Tanjong Ghogomu, Maria Benkhalti Jandu, Peter Tugwell, and George A. Wells. 2015. 'TNF-Alpha Inhibitors for Ankylosing Spondylitis'. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 4 (April): CD005468. https://doi.org/10.1002/14651858.CD005468.pub2.

Mayne, Christopher G., and Calvin B. Williams. 2013. 'Induced and Natural Regulatory T Cells in the Development of Inflammatory Bowel Disease'. *Inflammatory Bowel Diseases* 19 (8): 1772–88. https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281f5a3.

Mazmanian, Sarkis K., June L. Round, and Dennis L. Kasper. 2008a. 'A Microbial Symbiosis Factor Prevents Intestinal Inflammatory Disease'. *Nature* 453 (7195): 620–25. https://doi.org/10.1038/nature07008.

———. 2008b. 'A Microbial Symbiosis Factor Prevents Intestinal Inflammatory Disease'. *Nature* 453 (7195): 620–25. https://doi.org/10.1038/nature07008.

McDermott, M. F., I. Aksentijevich, J. Galon, E. M. McDermott, B. W. Ogunkolade, M. Centola, E. Mansfield, et al. 1999. 'Germline Mutations in the Extracellular Domains of the 55 KDa TNF Receptor, TNFR1, Define a Family of Dominantly Inherited Autoinflammatory Syndromes'. *Cell* 97 (1): 133–44.

McGeachy, Mandy J., and Stephen J. McSorley. 2012. 'Microbial-Induced Th17: Superhero or Supervillain?' *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (7): 3285–91. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201834.

McGonagle, Dennis, and Michael F. McDermott. 2006. 'A Proposed Classification of the Immunological Diseases'. *PLoS Medicine* 3 (8): e297. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030297.

Meduri, G. U., S. Kanangat, J. Stefan, E. Tolley, and D. Schaberg. 1999. 'Cytokines IL-1beta, IL-6, and TNF-Alpha Enhance in Vitro Growth of Bacteria'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160 (3): 961–67. https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.3.9807080.

Medzhitov, Ruslan. 2007. 'Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response'. *Nature* 449 (7164): 819–26. https://doi.org/10.1038/nature06246.

Mei, Yang, Faming Pan, Jing Gao, Rui Ge, Zhenhua Duan, Zhen Zeng, Fangfang Liao, et al. 2011. 'Increased Serum IL-17 and IL-23 in the Patient with Ankylosing Spondylitis'. *Clinical Rheumatology* 30 (2): 269–73. https://doi.org/10.1007/s10067-010-1647-4.

Minot, Samuel, Rohini Sinha, Jun Chen, Hongzhe Li, Sue A. Keilbaugh, Gary D. Wu, James D. Lewis, and Frederic D. Bushman. 2011. 'The Human Gut Virome: Inter-Individual Variation and Dynamic Response to Diet'. *Genome Research* 21 (10): 1616–25. https://doi.org/10.1101/gr.122705.111.

Mizgerd, Joseph P. 2003. 'Competing Benefits of Tumor Necrosis Factor-Alpha for Bacteria and for Host Defense'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (12): 1410–11. https://doi.org/10.1164/rccm.2310002.

Mizutani, Akiei, Victoria M. Shaheen, Hideo Yoshida, Jun Akaogi, Yoshiki Kuroda, Dina C. Nacionales, Yoshioki Yamasaki, et al. 2005. 'Pristane-Induced Autoimmunity in Germ-Free Mice'. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 114 (2): 110–18. https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.09.010.

Moltó, Anna, Simon Paternotte, Pascal Claudepierre, Maxime Breban, and Maxime Dougados. 2014. 'Effectiveness of Tumor Necrosis Factor α Blockers in Early Axial Spondyloarthritis: Data from the DESIR Cohort'. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (7): 1734–44. https://doi.org/10.1002/art.38613.

Moore, T. A., and T. J. Standiford. 2001. 'Cytokine Immunotherapy during Bacterial Pneumonia: From Benchtop to Bedside'. *Seminars in Respiratory Infections* 16 (1): 27–37.

Nakae, Susumu, Aya Nambu, Katsuko Sudo, and Yoichiro Iwakura. 2003. 'Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis in IL-17-Deficient Mice'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (11): 6173–77.

Nakata, N., T. Tobe, I. Fukuda, T. Suzuki, K. Komatsu, M. Yoshikawa, and C. Sasakawa. 1993. 'The Absence of a Surface Protease, OmpT, Determines the Intercellular Spreading Ability of Shigella: The Relationship between the OmpT and KcpA Loci'. *Molecular Microbiology* 9 (3): 459–68.

Nathan, Carl, and Aihao Ding. 2010. 'Nonresolving Inflammation'. *Cell* 140 (6): 871–82. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029.

Neal, C. P., P. P. Freestone, A. F. Maggs, R. D. Haigh, P. H. Williams, and M. Lyte. 2001. 'Catecholamine Inotropes as Growth Factors for Staphylococcus Epidermidis and Other Coagulase-Negative Staphylococci'. *FEMS Microbiology Letters* 194 (2): 163–69.

Nerich, Virginie, Elisabeth Monnet, Alain Weill, Nathalie Vallier, Vincent Vanbockstael, Guy-Robert Auleley, Corine Balaire, et al. 2010. 'Fine-Scale Geographic Variations of Inflammatory Bowel Disease in France: Correlation with Socioeconomic and House Equipment Variables'. *Inflammatory Bowel Diseases* 16 (5): 813–21. https://doi.org/10.1002/ibd.21122.

Nesbitt, Andrew, Gianluca Fossati, Marianne Bergin, Paul Stephens, Sue Stephens, Roly Foulkes, Derek Brown, Martyn Robinson, and Tim Bourne. 2007. 'Mechanism of Action of Certolizumab Pegol (CDP870): In Vitro Comparison with Other Anti-Tumor Necrosis Factor Alpha Agents'. *Inflammatory Bowel Diseases* 13 (11): 1323–32. https://doi.org/10.1002/ibd.20225.

Netea, M. G., L. J. van Tits, J. H. Curfs, F. Amiot, J. F. Meis, J. W. van der Meer, and B. J. Kullberg. 1999. 'Increased Susceptibility of TNF-Alpha Lymphotoxin-Alpha Double Knockout Mice to Systemic Candidiasis through Impaired Recruitment of Neutrophils and Phagocytosis of Candida Albicans'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (3): 1498–1505.

Neuman, Hadar, Justine W. Debelius, Rob Knight, and Omry Koren. 2015. 'Microbial Endocrinology: The Interplay between the Microbiota and the Endocrine System'. *FEMS Microbiology Reviews* 39 (4): 509–21. https://doi.org/10.1093/femsre/fuu010.

Nguyen, Hang Thi Thu, Guillaume Dalmasso, Stefan Müller, Jessica Carrière, Frank Seibold, and Arlette Darfeuille-Michaud. 2014. 'Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive Escherichia Coli Modulate Levels of MicroRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy'. *Gastroenterology* 146 (2): 508–19. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.021.

Noguera-Julian, Marc, Muntsa Rocafort, Yolanda Guillén, Javier Rivera, Maria Casadellà, Piotr Nowak, Falk Hildebrand, et al. 2016. 'Gut Microbiota Linked to Sexual Preference and HIV Infection'. *EBioMedicine* 5 (March): 135–46. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.01.032.

Nuij, Veerle, Gwenny M. Fuhler, Annemarie J. Edel, Rob J. T. Ouwendijk, Marno C. M. Rijk, Ruud Beukers, Rutger Quispel, et al. 2015. 'Benefit of Earlier Anti-TNF Treatment on IBD Disease Complications?' *Journal of Crohn's and Colitis* 9 (11): 997–1003. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv130.

Obermeyer, Ziad, and Ezekiel J. Emanuel. 2016. 'Predicting the Future - Big Data, Machine Learning, and Clinical Medicine'. *The New England Journal of Medicine* 375 (13): 1216–19. https://doi.org/10.1056/NEJMp1606181.

Obermeyer, Ziad, and Thomas H. Lee. 2017. 'Lost in Thought - The Limits of the Human Mind and the Future of Medicine'. *The New England Journal of Medicine* 377 (13): 1209–11. https://doi.org/10.1056/NEJMp1705348.

Ochman, Howard, and Nancy A. Moran. 2001. 'Genes Lost and Genes Found: Evolution of Bacterial Pathogenesis and Symbiosis'. *Science* 292 (5519): 1096–99. https://doi.org/10.1126/science.1058543.

O'Connor, William, Lauren A. Zenewicz, and Richard A. Flavell. 2010. 'The Dual Nature of T(H)17 Cells: Shifting the Focus to Function'. *Nature Immunology* 11 (6): 471–76. https://doi.org/10.1038/ni.1882.

O'Sullivan, Orla, Owen Cronin, Siobhan F. Clarke, Eileen F. Murphy, Micheal G. Molloy, Fergus Shanahan, and Paul D. Cotter. 2015. 'Exercise and the Microbiota'. *Gut Microbes* 6 (2): 131–36. https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1011875.

Ouyang, Wenjun, Jay K. Kolls, and Yan Zheng. 2008. 'The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation'. *Immunity* 28 (4): 454–67. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004.

Patten, Daniel A., and Andrew Collett. 2013. 'Exploring the Immunomodulatory Potential of Microbial-Associated Molecular Patterns Derived from the Enteric Bacterial Microbiota'. *Microbiology (Reading, England)* 159 (Pt 8): 1535–44. https://doi.org/10.1099/mic.0.064717-0.

Petersen, Charisse, and June L Round. 2014. 'Defining Dysbiosis and Its Influence on Host Immunity and Disease'. *Cellular Microbiology* 16 (7): 1024–33. https://doi.org/10.1111/cmi.12308.

Peyrin-Biroulet, Laurent, Erika Parmentier-Decrucq, Julien Branche, and Pierre Desreumaux. 2007. 'L'IL-23R, un nouveau gène de susceptibilité dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales'. *M/S. Médecine sciences [ISSN papier : 0767-0974 ; ISSN numérique : 1958-5381], 2007, Vol. 23, N° 3; p. 250-252*. https://doi.org/10.1051/medsci/2007233250.

Phillips, Robert. 2015. 'Rheumatoid Arthritis: Microbiome Reflects Status of RA and Response to Therapy'. *Nature Reviews. Rheumatology* 11 (9): 502. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.109.

Piccinini, A. M., and K. S. Midwood. 2010. 'DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling'. Research article. Mediators of Inflammation. 2010. https://doi.org/10.1155/2010/672395.

Pirzer, U., A. Schönhaar, B. Fleischer, E. Hermann, and K. H. Meyer zum Büschenfelde. 1991. 'Reactivity of Infiltrating T Lymphocytes with Microbial Antigens in Crohn's Disease'. *Lancet (London, England)* 338 (8777): 1238–39.

Plsek, Paul E, and Trisha Greenhalgh. 2001. 'The Challenge of Complexity in Health Care'. *BMJ : British Medical Journal* 323 (7313): 625–28.

Poll, T. van der, C. V. Keogh, W. A. Buurman, and S. F. Lowry. 1997. 'Passive Immunization against Tumor Necrosis Factor-Alpha Impairs Host Defense during Pneumococcal Pneumonia in Mice'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (2): 603–8. https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.2.9032201.

Porat, R., B. D. Clark, S. M. Wolff, and C. A. Dinarello. 1991. 'Enhancement of Growth of Virulent Strains of Escherichia Coli by Interleukin-1'. *Science (New York, N.Y.)* 254 (5030): 430–32.

Pradeu, Thomas, and Edwin L. Cooper. 2012. 'The Danger Theory: 20 Years Later'. *Frontiers in Immunology* 3 (September). https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00287.

Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, et al. 2010. 'A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing'. *Nature* 464 (7285): 59–65. https://doi.org/10.1038/nature08821.

Rajca, Sylvie, Virginie Grondin, Edouard Louis, Gwenola Vernier-Massouille, Jean-Charle Grimaud, Yoram Bouhnik, David Laharie, et al. 2014. 'Alterations in the Intestinal Microbiome (Dysbiosis) as a Predictor of Relapse after Infliximab Withdrawal in Crohn's Disease'. *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (6): 978–86. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000036.

Rao, Sheila, Alexandria M. Palaferri Schieber, Carolyn P. O'Connor, Mathias Leblanc, Daniela Michel, and Janelle S. Ayres. 2017. 'Pathogen-Mediated Inhibition of Anorexia Promotes Host Survival and Transmission'. *Cell* 168 (3): 503-516.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.006.

Rath, H. C., H. H. Herfarth, J. S. Ikeda, W. B. Grenther, T. E. Hamm, E. Balish, J. D. Taurog, R. E. Hammer, K. H. Wilson, and R. B. Sartor. 1996. 'Normal Luminal Bacteria, Especially Bacteroides Species, Mediate Chronic Colitis, Gastritis, and Arthritis in HLA-B27/Human Beta2 Microglobulin Transgenic Rats'. *The Journal of Clinical Investigation* 98 (4): 945–53. https://doi.org/10.1172/JCI118878.

Regueiro, Miguel, Brian G. Feagan, Bin Zou, Jewel Johanns, Marion A. Blank, Marc Chevrier, Scott Plevy, et al. 2016. 'Infliximab Reduces Endoscopic, but Not Clinical, Recurrence of Crohn's Disease After Ileocolonic Resection'. *Gastroenterology* 150 (7): 1568–78. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.072.

Reinhardt, Christoph, Mattias Bergentall, Thomas U. Greiner, Florence Schaffner, Gunnel Östergren-Lundén, Lars C. Petersen, Wolfram Ruf, and Fredrik Bäckhed. 2012. 'Tissue Factor and PAR1 Promote Microbiota-Induced Intestinal Vascular Remodelling'. *Nature* 483 (7391): 627–31. https://doi.org/10.1038/nature10893.

Reis e Sousa, Caetano. 2006. 'Dendritic Cells in a Mature Age'. *Nature Reviews. Immunology* 6 (6): 476–83. https://doi.org/10.1038/nri1845.

Ricciardelli, Ida, Keith J. Lindley, Marco Londei, and Sonia Quaratino. 2008. 'Anti Tumour Necrosis-Alpha Therapy Increases the Number of FOXP3 Regulatory T Cells in Children Affected by Crohn's Disease'. *Immunology* 125 (2): 178–83. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02839.x.

Ridaura, Vanessa K., Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey, Jiye Cheng, Alexis E. Duncan, Andrew L. Kau, Nicholas W. Griffin, et al. 2013. 'Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice'. *Science (New York, N.Y.)* 341 (6150): 1241214. https://doi.org/10.1126/science.1241214.

Roach, Daniel R., Andrew G. D. Bean, Caroline Demangel, Malcolm P. France, Helen Briscoe, and Warwick J. Britton. 2002. 'TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (9): 4620–27.

Rock, Kenneth L., Eicke Latz, Fernando Ontiveros, and Hajime Kono. 2010. 'The Sterile Inflammatory Response'. *Annual Review of Immunology* 28: 321–42. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101311.

Rose, N. R., and C. Bona. 1993. 'Defining Criteria for Autoimmune Diseases (Witebsky's Postulates Revisited)'. *Immunology Today* 14 (9): 426–30. https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90244-F.

Round, June L., and Sarkis K. Mazmanian. 2010. 'Inducible Foxp3+ Regulatory T-Cell Development by a Commensal Bacterium of the Intestinal Microbiota'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (27): 12204–9. https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107.

Routy, Bertrand, Emmanuelle Le Chatelier, Lisa Derosa, Connie P. M. Duong, Maryam Tidjani Alou, Romain Daillère, Aurélie Fluckiger, et al. 2018. 'Gut Microbiome Influences Efficacy of PD-1-Based Immunotherapy against Epithelial Tumors'. *Science (New York, N.Y.)* 359 (6371): 91–97. https://doi.org/10.1126/science.aan3706.

Rudwaleit, M., D. van der Heijde, R. Landewé, N. Akkoc, J. Brandt, C. T. Chou, M. Dougados, et al. 2011. 'The Assessment of SpondyloArthritis International Society Classification Criteria for Peripheral Spondyloarthritis and for Spondyloarthritis in General'. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70 (1): 25–31. https://doi.org/10.1136/ard.2010.133645.

Rudwaleit, M., D. van der Heijde, R. Landewé, J. Listing, N. Akkoc, J. Brandt, J. Braun, et al. 2009. 'The Development of Assessment of SpondyloArthritis International Society Classification Criteria for Axial Spondyloarthritis (Part II): Validation and Final Selection'. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68 (6): 777–83. https://doi.org/10.1136/ard.2009.108233.

Rutgeerts, P., G. Van Assche, and S. Vermeire. 2006. 'Review Article: Infliximab Therapy for Inflammatory Bowel Disease--Seven Years On'. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 23 (4): 451–63. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02786.x.

Sabbah, Ahmed, Te Hung Chang, Rosalinda Harnack, Victoria Frohlich, Kaoru Tominaga, Peter H. Dube, Yan Xiang, and Santanu Bose. 2009. 'Activation of Innate Immune Antiviral Responses by Nod2'. *Nature Immunology* 10 (10): 1073–80. https://doi.org/10.1038/ni.1782.

Salim, Sa'ad Y., and Johan D. Söderholm. 2011. 'Importance of Disrupted Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Diseases'. *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (1): 362–81. https://doi.org/10.1002/ibd.21403.

Sande, Marleen G. van de, and Dominique L. Baeten. 2016. 'Immunopathology of Synovitis: From Histology to Molecular Pathways'. *Rheumatology (Oxford, England)* 55 (4): 599–606. https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev330.

Scarpellini, Emidio, Gianluca Ianiro, Fabia Attili, Chiara Bassanelli, Adriano De Santis, and Antonio Gasbarrini. 2015. 'The Human Gut Microbiota and Virome: Potential Therapeutic Implications'. *Digestive and Liver Disease* 47 (12): 1007–12. https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.008.

Schiering, Chris, Thomas Krausgruber, Agnieszka Chomka, Anja Fröhlich, Krista Adelmann, Elizabeth A. Wohlfert, Johanna Pott, et al. 2014. 'The Alarmin IL-33 Promotes Regulatory T-Cell Function in the Intestine'. *Nature* 513 (7519): 564–68. https://doi.org/10.1038/nature13577.

Sedger, Lisa M., and Michael F. McDermott. 2014. 'TNF and TNF-Receptors: From Mediators of Cell Death and Inflammation to Therapeutic Giants - Past, Present and Future'. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25 (4): 453–72. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016.

Sender, Ron, Shai Fuchs, and Ron Milo. 2016a. 'Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans'. *Cell* 164 (3): 337–40. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013.

———. 2016b. 'Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body'. *PLoS Biology* 14 (8): e1002533. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533.

Serrero, M., J.-C. Grimaud, and L. Peyrin-Biroulet. 2017. 'Actualités thérapeutiques dans les MICI'. *Côlon & Rectum* 11 (3): 152–58. https://doi.org/10.1007/s11725-017-0727-x.

Shen, C., G. V. Assche, S. Colpaert, P. Maerten, K. Geboes, P. Rutgeerts, and J. L. Ceuppens. 2005. 'Adalimumab Induces Apoptosis of Human Monocytes: A Comparative Study with Infliximab and Etanercept'. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 21 (3): 251–58. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02309.x.

Sherlock, Jonathan P., Peter C. Taylor, and Christopher D. Buckley. 2015. 'The Biology of IL-23 and IL-17 and Their Therapeutic Targeting in Rheumatic Diseases'. *Current Opinion in Rheumatology* 27 (1): 71–75. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000132.

Shi, Yan, and Libing Mu. 2017. 'An Expanding Stage for Commensal Microbes in Host Immune Regulation'. *Cellular & Molecular Immunology*, January. https://doi.org/10.1038/cmi.2016.64.

Shivashankar, Raina, Edward V. Loftus, William J. Tremaine, W. Scott Harmsen, Alan R. Zinsmeister, and Eric L. Matteson. 2013. 'Incidence of Spondyloarthropathy in Patients with Ulcerative Colitis: A Population-Based Study'. *The Journal of Rheumatology* 40 (7): 1153–57. https://doi.org/10.3899/jrheum.121029.

Singh, Amit Kumar, Ramnath Misra, and Amita Aggarwal. 2011. 'Th-17 Associated Cytokines in Patients with Reactive Arthritis/Undifferentiated Spondyloarthropathy'. *Clinical Rheumatology* 30 (6): 771–76. https://doi.org/10.1007/s10067-010-1646-5.

Skindersoe, Mette E., Louise H. Zeuthen, Susanne Brix, Lisbeth N. Fink, James Lazenby, Christine Whittall, Paul Williams, et al. 2009. 'Pseudomonas Aeruginosa Quorum-Sensing Signal Molecules Interfere with Dendritic Cell-Induced T-Cell Proliferation'. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 55 (3): 335–45. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00533.x.

Slevin, Stephanie M., and Laurence J. Egan. 2015. 'New Insights into the Mechanisms of Action of Anti-Tumor Necrosis Factor-α Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease'. *Inflammatory Bowel Diseases* 21 (12): 2909–20. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000533.

Sloot, Kimberley W. J. van der, Marzyeh Amini, Vera Peters, Gerard Dijkstra, and Behrooz Z. Alizadeh. 2017. 'Inflammatory Bowel Diseases: Review of Known Environmental Protective and Risk Factors Involved'. *Inflammatory Bowel Diseases* 23 (9): 1499–1509. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001217.

Sokol, H, P Seksik, J P Furet, O Firmesse, I Nion-Larmurier, L Beaugerie, J Cosnes, G Corthier, P Marteau, and J Doré. 2009. 'Low Counts of Faecalibacterium Prausnitzii in Colitis Microbiota'. *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (8): 1183–89. https://doi.org/10.1002/ibd.20903.

Sokol, Harry, Valentin Leducq, Hugues Aschard, Hang-Phuong Pham, Sarah Jegou, Cecilia Landman, David Cohen, et al. 2016. 'Fungal Microbiota Dysbiosis in IBD'. *Gut*, February. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746.

Sokol, Harry, Bénédicte Pigneur, Laurie Watterlot, Omar Lakhdari, Luis G Bermúdez-Humarán, Jean-Jacques Gratadoux, Sébastien Blugeon, et al. 2008. '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 (43): 16731–36. https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105.
Sommer, Felix, and Fredrik Bäckhed. 2013. 'The Gut Microbiota--Masters of Host Development and Physiology'. *Nature Reviews. Microbiology* 11 (4): 227–38. https://doi.org/10.1038/nrmicro2974.
Souza, Heitor S. P. de, and Claudio Fiocchi. 2016. 'Immunopathogenesis of IBD: Current State of the Art'. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 13 (1): 13–27. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.186.
———. 2018. 'Network Medicine: A Mandatory Next Step for Inflammatory Bowel Disease'. *Inflammatory Bowel Diseases* 24 (4): 671–79. https://doi.org/10.1093/ibd/izx111.
Souza, Heitor S. P. de, Claudio Fiocchi, and Dimitrios Iliopoulos. 2017. 'The IBD Interactome: An Integrated View of Aetiology, Pathogenesis and Therapy'. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* advance online publication (August). https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.110.
Sperandio, Vanessa, Alfredo G. Torres, Bruce Jarvis, James P. Nataro, and James B. Kaper. 2003. 'Bacteria-Host Communication: The Language of Hormones'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15): 8951–56. https://doi.org/10.1073/pnas.1537100100.
'Spondyloarthrites'. n.d. Inserm. Accessed 11 July 2018. https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/spondyloarthrites.
Stebbings, S., K. Munro, M. A. Simon, G. Tannock, J. Highton, H. Harmsen, G. Welling, et al. 2002. 'Comparison of the Faecal Microflora of Patients with Ankylosing Spondylitis and Controls Using Molecular Methods of Analysis'. *Rheumatology (Oxford, England)* 41 (12): 1395–1401.
Stoll, Matthew L., Ranjit Kumar, Casey D. Morrow, Elliot J. Lefkowitz, Xiangqin Cui, Anna Genin, Randy Q. Cron, and Charles O. Elson. 2014. 'Altered Microbiota Associated with Abnormal Humoral Immune Responses to Commensal Organisms in Enthesitis-Related Arthritis'. *Arthritis Research & Therapy* 16 (6): 486. https://doi.org/10.1186/s13075-014-0486-0.
Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, et al. 2000. 'Complete Genome Sequence of Pseudomonas Aeruginosa PAO1, an Opportunistic Pathogen'. *Nature* 406 (6799): 959–64. https://doi.org/10.1038/35023079.
Subramanian, Naeha, Parizad Torabi-Parizi, Rachel A. Gottschalk, Ronald N. Germain, and Bhaskar Dutta. 2015. 'Network Representations of Immune System Complexity'. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 7 (1): 13–38. https://doi.org/10.1002/wsbm.1288.
Subramanian, Sathish, Sayeeda Huq, Tanya Yatsunenko, Rashidul Haque, Mustafa Mahfuz, Mohammed A. Alam, Amber Benezra, et al. 2014. 'Persistent Gut Microbiota Immaturity in Malnourished Bangladeshi Children'. *Nature* 510 (7505): 417–21. https://doi.org/10.1038/nature13421.
Sugihara, T., A. Kobori, H. Imaeda, T. Tsujikawa, K. Amagase, K. Takeuchi, Y. Fujiyama, and A. Andoh. 2010. 'The Increased Mucosal MRNA Expressions of Complement C3 and Interleukin-17 in Inflammatory Bowel Disease'. *Clinical and Experimental Immunology* 160 (3): 386–93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04093.x.
Sugimoto, Ken, Atsuhiro Ogawa, Emiko Mizoguchi, Yasuyo Shimomura, Akira Andoh, Atul K. Bhan, Richard S. Blumberg, Ramnik J. Xavier, and Atsushi Mizoguchi. 2008. 'IL-22 Ameliorates Intestinal Inflammation in a Mouse Model of Ulcerative Colitis'. *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2): 534–44. https://doi.org/10.1172/JCI33194.
Swearingen, Matthew C., Anice Sabag-Daigle, and Brian M. M. Ahmer. 2013. 'Are There Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines?' *Journal of Bacteriology* 195 (2): 173–79. https://doi.org/10.1128/JB.01341-12.
Takahashi, F., and K. M. Das. 1985. 'Isolation and Characterization of a Colonic Autoantigen Specifically Recognized by Colon Tissue-Bound Immunoglobulin G from Idiopathic Ulcerative

Colitis'. *The Journal of Clinical Investigation* 76 (1): 311–18. https://doi.org/10.1172/JCI111963.

Taurog, J. D., J. A. Richardson, J. T. Croft, W. A. Simmons, M. Zhou, J. L. Fernández-Sueiro, E. Balish, and R. E. Hammer. 1994. 'The Germfree State Prevents Development of Gut and Joint Inflammatory Disease in HLA-B27 Transgenic Rats'. *The Journal of Experimental Medicine* 180 (6): 2359–64.

Te Velde, Anje A., Tjitske Bezema, Antoine H. C. van Kampen, Aletta D. Kraneveld, Bert A. 't Hart, Henriët van Middendorp, Erik C. Hack, et al. 2016. 'Embracing Complexity beyond Systems Medicine: A New Approach to Chronic Immune Disorders'. *Frontiers in Immunology* 7: 587. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00587.

Telesford, Kiel M., Wang Yan, Javier Ochoa-Reparaz, Anudeep Pant, Christopher Kircher, Marc A. Christy, Sakhina Begum-Haque, Dennis L. Kasper, and Lloyd H. Kasper. 2015. 'A Commensal Symbiotic Factor Derived from Bacteroides Fragilis Promotes Human CD39(+)Foxp3(+) T Cells and Treg Function'. *Gut Microbes* 6 (4): 234–42. https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1056973.

Thaiss, Christoph A., David Zeevi, Maayan Levy, Gili Zilberman-Schapira, Jotham Suez, Anouk C. Tengeler, Lior Abramson, et al. 2014. 'Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis'. *Cell* 159 (3): 514–29. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.048.

Thomsen, Martin Christen Frølund, Henrik Hasman, Henrik Westh, Hülya Kaya, and Ole Lund. 2017. 'RUCS: Rapid Identification of PCR Primers for Unique Core Sequences'. *Bioinformatics* 33 (24): 3917–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx526.

Tito, Raul Y., Heleen Cypers, Marie Joossens, Gaëlle Varkas, Liesbet Van Praet, Elien Glorieus, Filip Van den Bosch, Martine De Vos, Jeroen Raes, and Dirk Elewaut. 2016. 'Dialister as Microbial Marker of Disease Activity in Spondyloarthritis'. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, July. https://doi.org/10.1002/art.39802.

Tremaroli, Valentina, Fredrik Karlsson, Malin Werling, Marcus Ståhlman, Petia Kovatcheva-Datchary, Torsten Olbers, Lars Fändriks, Carel W. le Roux, Jens Nielsen, and Fredrik Bäckhed. 2015. 'Roux-En-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation'. *Cell Metabolism* 22 (2): 228–38. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.009.

Trinchieri, Giorgio. 2007. 'Interleukin-10 Production by Effector T Cells: Th1 Cells Show Self Control'. *The Journal of Experimental Medicine* 204 (2): 239–43. https://doi.org/10.1084/jem.20070104.

Truchetet, Marie-Elise, and Thomas Pradeu. 2018. 'Re-Thinking Our Understanding of Immunity: Robustness in the Tissue Reconstruction System'. *Seminars in Immunology* 36 (April): 45–55. https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.013.

Turner, Jerrold R. 2009. 'Intestinal Mucosal Barrier Function in Health and Disease'. *Nature Reviews. Immunology* 9 (11): 799–809. https://doi.org/10.1038/nri2653.

Tveita, Anders A. 2010. 'The Danger Model in Deciphering Autoimmunity'. *Rheumatology (Oxford, England)* 49 (4): 632–39. https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq004.

Ueno, Aito, Louisa Jeffery, Taku Kobayashi, Toshifumi Hibi, Subrata Ghosh, and Humberto Jijon. 2017. 'Th17 Plasticity and Its Relevance to Inflammatory Bowel Disease'. *Journal of Autoimmunity*, December. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.004.

Valencia, Xavier, Geoffrey Stephens, Raphaela Goldbach-Mansky, Mildred Wilson, Ethan M. Shevach, and Peter E. Lipsky. 2006. 'TNF Downmodulates the Function of Human CD4+CD25hi T-Regulatory Cells'. *Blood* 108 (1): 253–61. https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4567.

Van Assche, Gert, Axel Dignass, Julian Panes, Laurent Beaugerie, John Karagiannis, Mathieu Allez, Thomas Ochsenkühn, et al. 2010. 'The Second European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease: Definitions and Diagnosis'. *Journal of Crohn's & Colitis* 4 (1): 7–27. https://doi.org/10.1016/j.crohns.2009.12.003.

Van den Brande, Jan M. H., Henri Braat, Gijs R. van den Brink, Henri H. Versteeg, Christiaan A. Bauer, Inge Hoedemaeker, Catherine van Montfrans, Daan W. Hommes, Maikel P. Peppelenbosch, and Sander J. H. van Deventer. 2003. 'Infliximab but Not Etanercept Induces Apoptosis in Lamina Propria T-Lymphocytes from Patients with Crohn's Disease'. *Gastroenterology* 124 (7): 1774–85.

Van Kaer, Luc, Vrajesh V. Parekh, and Lan Wu. 2011. 'Invariant Natural Killer T Cells: Bridging Innate and Adaptive Immunity'. *Cell and Tissue Research* 343 (1): 43–55. https://doi.org/10.1007/s00441-010-1023-3.

Vance, R. E. 2000. 'Cutting Edge: Cutting Edge Commentary: A Copernican Revolution? Doubts about the Danger Theory'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (4): 1725–28.

Vandeputte, Doris, Gwen Falony, Sara Vieira-Silva, Raul Y. Tito, Marie Joossens, and Jeroen Raes. 2015. 'Stool Consistency Is Strongly Associated with Gut Microbiota Richness and Composition, Enterotypes and Bacterial Growth Rates'. *Gut*, June, gutjnl-2015-309618. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309618.

Veltkamp, Claudia, Matthias Anstaett, Kristin Wahl, Sarah Möller, Saskia Gangl, Oliver Bachmann, Matthias Hardtke-Wolenski, et al. 2011. 'Apoptosis of Regulatory T Lymphocytes Is Increased in Chronic Inflammatory Bowel Disease and Reversed by Anti-TNFα Treatment'. *Gut* 60 (10): 1345–53. https://doi.org/10.1136/gut.2010.217117.

Ventham, Nicholas T., Nicholas A. Kennedy, Elaine R. Nimmo, and Jack Satsangi. 2013. 'Beyond Gene Discovery in Inflammatory Bowel Disease: The Emerging Role of Epigenetics'. *Gastroenterology* 145 (2): 293–308. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.050.

Vétizou, Marie, Jonathan M. Pitt, Romain Daillère, Patricia Lepage, Nadine Waldschmitt, Caroline Flament, Sylvie Rusakiewicz, et al. 2015. 'Anticancer Immunotherapy by CTLA-4 Blockade Relies on the Gut Microbiota'. *Science (New York, N.Y.)* 350 (6264): 1079–84. https://doi.org/10.1126/science.aad1329.

Vidal, Marc, Michael E. Cusick, and Albert-László Barabási. 2011. 'Interactome Networks and Human Disease'. *Cell* 144 (6): 986–98. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.016.

Vijay-Kumar, Matam, Jesse D. Aitken, Frederic A. Carvalho, Tyler C. Cullender, Simon Mwangi, Shanthi Srinivasan, Shanthi V. Sitaraman, Rob Knight, Ruth E. Ley, and Andrew T. Gewirtz. 2010. 'Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-like Receptor 5'. *Science (New York, N.Y.)* 328 (5975): 228–31. https://doi.org/10.1126/science.1179721.

Vinayagam, Arunachalam, Travis E. Gibson, Ho-Joon Lee, Bahar Yilmazel, Charles Roesel, Yanhui Hu, Young Kwon, et al. 2016. 'Controllability Analysis of the Directed Human Protein Interaction Network Identifies Disease Genes and Drug Targets'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (18): 4976–81. https://doi.org/10.1073/pnas.1603992113.

Vivier, Eric, David H. Raulet, Alessandro Moretta, Michael A. Caligiuri, Laurence Zitvogel, Lewis L. Lanier, Wayne M. Yokoyama, and Sophie Ugolini. 2011. 'Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells'. *Science (New York, N.Y.)* 331 (6013): 44–49. https://doi.org/10.1126/science.1198687.

Vollenhoven, R. F. van. n.d. 'Genotypes, Phenotypes and Treatment with Immunomodulators in the Rheumatic Diseases'. *Journal of Internal Medicine* 0 (0). Accessed 9 July 2018. https://doi.org/10.1111/joim.12800.

Vrieze, Anne, Els Van Nood, Frits Holleman, Jarkko Salojärvi, Ruud S. Kootte, Joep F. W. M. Bartelsman, Geesje M. Dallinga-Thie, et al. 2012. 'Transfer of Intestinal Microbiota from Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals with Metabolic Syndrome'. *Gastroenterology* 143 (4): 913-916.e7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.031.

Wang, Qun, Rachel M. McLoughlin, Brian A. Cobb, Marie Charrel-Dennis, Kathleen J. Zaleski, Douglas Golenbock, Arthur O. Tzianabos, and Dennis L. Kasper. 2006. 'A Bacterial Carbohydrate Links Innate and Adaptive Responses through Toll-like Receptor 2'. *The Journal of Experimental Medicine* 203 (13): 2853–63. https://doi.org/10.1084/jem.20062008.

Wang, Sen, Louis-Marie Charbonnier, Magali Noval Rivas, Peter Georgiev, Ning Li, Georg Gerber, Lynn Bry, and Talal A. Chatila. 2015. 'MyD88 Adaptor-Dependent Microbial Sensing by Regulatory T Cells Promotes Mucosal Tolerance and Enforces Commensalism'. *Immunity* 43 (2): 289–303. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.014.

Wen, Chengping, Zhijun Zheng, Tiejuan Shao, Lin Liu, Zhijun Xie, Emmanuelle Le Chatelier, Zhixing He, et al. 2017. 'Quantitative Metagenomics Reveals Unique Gut Microbiome Biomarkers in Ankylosing Spondylitis'. *Genome Biology* 18 (1): 142. https://doi.org/10.1186/s13059-017-1271-6.

Wen, Zhonghui, and Claudio Fiocchi. 2004. 'Inflammatory Bowel Disease: Autoimmune or Immune-Mediated Pathogenesis?' *Clinical & Developmental Immunology* 11 (3–4): 195–204.

Wu, Licheng, Oscar Estrada, Olga Zaborina, Manjeet Bains, Le Shen, Jonathan E. Kohler, Nachiket Patel, et al. 2005. 'Recognition of Host Immune Activation by Pseudomonas Aeruginosa'. *Science* 309 (5735): 774–77. https://doi.org/10.1126/science.1112422.

Wyatt, J., H. Vogelsang, W. Hübl, T. Waldhöer, and H. Lochs. 1993. 'Intestinal Permeability and the Prediction of Relapse in Crohn's Disease'. *Lancet (London, England)* 341 (8858): 1437–39.

Xue, Yansong, Hanying Zhang, Hui Wang, Jia Hu, Min Du, and Mei-Jun Zhu. 2014. 'Host Inflammatory Response Inhibits Escherichia Coli O157:H7 Adhesion to Gut Epithelium through Augmentation of Mucin Expression'. *Infection and Immunity* 82 (5): 1921–30. https://doi.org/10.1128/IAI.01589-13.

Xueyi, Li, Chen Lina, Wu Zhenbiao, Han Qing, Li Qiang, and Ping Zhu. 2013. 'Levels of Circulating Th17 Cells and Regulatory T Cells in Ankylosing Spondylitis Patients with an Inadequate Response to Anti-TNF-α Therapy'. *Journal of Clinical Immunology* 33 (1): 151–61. https://doi.org/10.1007/s10875-012-9774-0.

Yano, Jessica M., Kristie Yu, Gregory P. Donaldson, Gauri G. Shastri, Phoebe Ann, Liang Ma, Cathryn R. Nagler, Rustem F. Ismagilov, Sarkis K. Mazmanian, and Elaine Y. Hsiao. 2015. 'Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis'. *Cell* 161 (2): 264–76. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047.

Yatsunenko, Tanya, Federico E. Rey, Mark J. Manary, Indi Trehan, Maria Gloria Dominguez-Bello, Monica Contreras, Magda Magris, et al. 2012. 'Human Gut Microbiome Viewed across Age and Geography'. *Nature* 486 (7402): 222–27. https://doi.org/10.1038/nature11053.

Zaborina, Olga, Francois Lepine, Gaoping Xiao, Vesta Valuckaite, Yimei Chen, Terry Li, Mae Ciancio, et al. 2007. 'Dynorphin Activates Quorum Sensing Quinolone Signaling in Pseudomonas Aeruginosa'. *PLoS Pathogens* 3 (3): e35. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030035.

Zav'yalov, V. P., T. V. Chernovskaya, E. V. Navolotskaya, A. V. Karlyshev, S. MacIntyre, A. M. Vasiliev, and V. M. Abramov. 1995. 'Specific High Affinity Binding of Human Interleukin 1 Beta by Caf1A Usher Protein of Yersinia Pestis'. *FEBS Letters* 371 (1): 65–68.

Zeboulon-Ktorza, Nadine, Pierre Yves Boelle, Roula Said Nahal, Maria Antonietta D'agostino, Jean François Vibert, Clément Turbelin, Homa Madrakian, et al. 2013. 'Influence of Environmental Factors on Disease Activity in Spondyloarthritis: A Prospective Cohort Study'. *The Journal of Rheumatology* 40 (4): 469–75. https://doi.org/10.3899/jrheum.121081.

Zeevi, David, Tal Korem, Niv Zmora, David Israeli, Daphna Rothschild, Adina Weinberger, Orly Ben-Yacov, et al. 2015. 'Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses'. *Cell* 163 (5): 1079–94. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.001.

Zeng, Ling, Mary J. Lindstrom, and Judith A. Smith. 2011. 'Ankylosing Spondylitis Macrophage Production of Higher Levels of Interleukin-23 in Response to Lipopolysaccharide without Induction of a Significant Unfolded Protein Response'. *Arthritis and Rheumatism* 63 (12): 3807–17. https://doi.org/10.1002/art.30593.

Zhang, Ming, Kaiji Sun, Yujun Wu, Ying Yang, Patrick Tso, and Zhenlong Wu. 2017. 'Interactions between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel Disease'. *Frontiers in Immunology* 8: 942. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00942.

Zhernakova, Alexandra, Alexander Kurilshikov, Marc Jan Bonder, Ettje F. Tigchelaar, Melanie Schirmer, Tommi Vatanen, Zlatan Mujagic, et al. 2016. 'Population-Based Metagenomics

Analysis Reveals Markers for Gut Microbiome Composition and Diversity'. *Science (New York, N.Y.)* 352 (6285): 565–69. https://doi.org/10.1126/science.aad3369.

Zhong, Yifei, Anna Kinio, and Maya Saleh. 2013. 'Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases'. *Frontiers in Immunology* 4 (October): 333. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00333.

Zhou, Lixing, Mingming Zhang, Yuming Wang, Robert Gregory Dorfman, Hang Liu, Ting Yu, Xiaotian Chen, et al. 2018. 'Faecalibacterium Prausnitzii Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1'. *Inflammatory Bowel Diseases*, May. https://doi.org/10.1093/ibd/izy182.

Zhou, Youlian, Zhenjiang Zech Xu, Yan He, Yunsheng Yang, Le Liu, Qianyun Lin, Yuqiang Nie, et al. 2018. 'Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction'. *MSystems* 3 (1). https://doi.org/10.1128/mSystems.00188-17.

Annexes

Protocole de recherche clinique : microbiote bactérien et fungique de patients atteints de MICI et/ou de spondyloarthrite avant et après traitement par anti-TNFα (*nota bene* : Thomas Bazin n'est plus investigateur principal en raison de son détachement du CHU de Bordeaux le 1er novembre 2018, mais il reste le principal organisateur de l'étude).

Microbiote intestinal de patients présentant une maladie inflammatoire chronique de l'intestin et/ou une spondyloarthrite : caractérisation et impact d'un traitement par anti-TNF alpha

Etude MIST

CHUBX 2017/28

PROTOCOLE DE RECHERCHE INTERVENTIONNELLE IMPLIQUANT LA PERSONNE HUMAINE

(recherche de catégorie 2)

Version n°2.0 du 25/10/2018

Numéro ID-RCB : 2017-A02681-52

Cette recherche interventionnelle a obtenu le financement de MSD et de l'appel d'offres interne 2017 du CHU de Bordeaux

Promoteur:

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12 rue Dubernat
33 400 Talence
FRANCE

Investigateur principal :

Dr Pauline Rivière
Service d'Hépato-gastroentérologie
CHU de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque
Centre Médico-Chirurgical Magellan
Avenue Magellan 33604 PESSAC Cedex
Tel : 07 86 95 93 57
Fax : 05 57 65 64 45
Courriel : pauline.riviere@chu-bordeaux.fr

Centre de Méthodologie et de Gestion des données :

Pr Rodolphe Thiébaut
Inserm U897, CIC-EC7
Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche clinique et épidémiologique du CHU de Bordeaux - Université Victor Segalen Bordeaux 2
146 Rue Léo Saignat
33076 Bordeaux cedex, France
Courriel : rodolphe.thiebaut@isped.u-bordeaux2.fr
Tel : 33 (0) 5 57 57 45 21

Ce protocole a été conçu et rédigé à partir de la version 3.0 du 01/02/2017 du protocole-type du GIRCI SOHO

HISTORIQUE DES MISES A JOUR DU PROTOCOLE

VERSION	DATE	RAISON DE LA MISE A JOUR
1.0	04/10/2017	Soumission au CPP
2.0	25/10/2018	Modification n°1

PAGE DE SIGNATURE DU PROTOCOLE

Microbiote intestinal de patients présentant une maladie inflammatoire chronique de l'intestin et/ou une spondyloarthrite : caractérisation et impact d'un traitement par anti-TNF alpha

Etude MIST

CHUBX 2017/28

Promoteur

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12, rue Dubernat
33400 Talence

à Bordeaux, le 25/10/2018

Le Directeur Général du CHU de Bordeaux
P. VIGOUROUX
Par délégation, le Directeur de la Recherche Clinique et de l'Innovation,
J. BELCASTRO

Investigateur principal

Dr Pauline RIVIERE
Service d'Hépato-gastroentérologie
CHU de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque
Centre Médico-Chirurgical Magellan
Avenue Magellan 33604 PESSAC Cedex
Tel : 07 86 95 93 57
Fax : 05 57 65 64 45
Courriel : pauline.riviere@chu-bordeaux.fr

à Bordeaux, le 25/10/2018

SOMMAIRE

1. RESUME DE LA RECHERCHE **10**

ABSTRACT **14**

2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE **17**

2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES 17
2.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE 19
2.3. JUSTIFICATION DES CHOIX METHODOLOGIQUES 19
2.4. RAPPORT BENEFICE / RISQUE 19
2.5. RETOMBEES ATTENDUES 20
2.6. JUSTIFICATION DU FAIBLE NIVEAU D'INTERVENTION 20

3. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE **20**

3.1. OBJECTIF PRINCIPAL 20
3.2. OBJECTIFS SECONDAIRES 20

4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE **20**

5. CRITERES D'ÉLIGIBILITE **21**

5.1. CRITERES D'INCLUSION 21
5.2. CRITERES DE NON INCLUSION 21
5.3. FAISABILITE ET MODALITES DE RECRUTEMENT 21

6. PROCEDURE(S) DE LA RECHERCHE **22**

6.1. METHODES D'ETUDE DU MICROBIOTE INTESTINAL : 22
6.2. ENDOSCOPIE ET HISTOLOGIE - ETUDE ANCILLAIRE SUR PATIENTS ATTEINTS DE RCH22
6.3. CELLULES IMMUNITAIRES CIRCULANTES 22

7. TRAITEMENTS ASSOCIES **23**

7.1. TRAITEMENTS ASSOCIES AUTORISES 23
7.1.1. Médicaments auxiliaires *23*
7.1.2. Autres traitements/procédures *23*
7.2. TRAITEMENTS/PROCEDURES ASSOCIE(E)S INTERDIT(E)S 23

8. CRITERES DE JUGEMENT **24**

8.1. CRITERE DE JUGEMENT PRINICIPAL 24
8.2. CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES 24
8.3. SCHEMA DE LA RECHERCHE 25

9. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE **25**

9.1. CALENDRIER DE LA RECHERCHE 25
9.2. TABLEAU RECAPITULATIF DU SUIVI PARTICIPANT 25
9.3. VISITE DE PRE-INCLUSION 26
9.3.1. Recueil du consentement *26*
9.3.2. Déroulement de la visite *26*
9.4. VISITE D'INCLUSION 26
9.5. VISITE DE SUIVI (M3) 27
9.6. ABANDON ET RETRAIT DE CONSENTEMENT 27
9.7. REGLES D'ARRET DE LA RECHERCHE 27
9.8. DEVIATIONS AU PROTOCOLE 28
9.8.1. Participant perdu de vue *28*
9.8.2. Participant inclus à tort *28*
9.9. CONTRAINTES LIEES A LA RECHERCHE ET INDEMNISATION EVENTUELLE DES PARTICIPANTS 28
9.10. CIRCUIT DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES 28

9.11. COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES 29
10. GESTION DES ÉVÉNEMENTS INDÉSIRABLES 29
11. ASPECTS STATISTIQUES 29
11.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE 29
11.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES 30
11.2.1. Stratégie d'analyse 30
11.2.2. Méthodes statistiques employées 30
11.2.3. Logiciels utilises 30
11.3. PLAN D'ANALYSE 30
11.3.1. Description des inclusions et du suivi 30
11.3.2. Patients inclus dans l'analyse 30
11.3.3. Caractéristiques des patients à l'inclusion 31
11.3.4. Critère de jugement principal 31
11.3.5. Critères de jugements secondaires 31
12. SURVEILLANCE DE LA RECHERCHE 33
12.1. CONSEIL SCIENTIFIQUE 33
12.1.1. Composition 33
12.1.2. Rythme des réunions 33
12.1.3. Rôle 33
13. DROITS D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE 34
13.1. ACCES AUX DONNEES 34
13.2. DONNEES SOURCES 34
13.3. CONFIDENTIALITE DES DONNEES 34
14. CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE 35
14.1. CONSIGNES POUR LE RECUEIL DES DONNEES 35
14.2. CONTROLE DE QUALITE 35
14.3. GESTION DES DONNEES 35
14.3.1. Logiciel et hébergement des données 35
14.3.1.1. Logiciel utilisé 35
14.3.1.2. Hébergement des données 35
14.3.1.3. Sécurité des données 35
14.3.2. Création du cahier d'observation 35
14.3.3. Saisie des données 35
14.3.4. Droit d'accès 36
14.3.5. Rôles 36
14.3.6. Codage des données 36
14.3.7. Contrôles des données 36
14.3.8. Réconciliation des bases EI/EIG 36
14.3.9. Gel de la base de données 36
14.3.10. Transfert des données 36
14.3.11. Archivage de la base de données 36
14.3.12. Management de la qualité 36
14.4. AUDIT ET INSPECTION 37
15. CONSIDERATIONS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES 38
15.1. CONFORMITE AUX TEXTES DE REFERENCE 38
16. CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE 39
17. RAPPORT FINAL 39
18. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION 40

18.1. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 40
18.2. COMMUNICATION DES RESULTATS AUX PARTICIPANTS 40
18.3. CESSION DES DONNEES 40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 41
ANNEXES 44
ANNEXE 3 : SCORE D'HARVEY-BRADSHAW 47
ANNEXE 4 : SCORE BASDAI 48
ANNEXE 5 : SCORE ASDAS 49
ANNEXE 6 : ECHELLE DE BRISTOL 50

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	**Acide désoxyribonucléique**
AMM :	**Autorisation de Mise sur le Marché**
ARC :	**Attaché de Recherché Clinique**
ASAS :	**Assessment of SpondyloArthritis**
ASDAS :	**Ankylosing Spondylarthritis Disease Activity Score**
BASDAI :	**Bath Ankylosing Spondyloarthritis Disease Activity Index**
CDAI :	**Crohn's Disease Activity Index**
CHU :	**Centre Hospitalier Universitaire**
CMG :	**Centre de Méthodologie et de Gestion des données**
CO :	**Cahier d'observation**
CPP :	**Comité de Protection des Personnes**
CRB :	**Centre de Ressources Biologiques**
CRB-BBS :	**Centre de Ressources Biologiques Plurithématique - Bordeaux Biothèques Santé**
CRP :	**C-reactive protein**
CREDIM :	**Centre de Recherche et Développement en Informatique Médicale**
CS :	**Conseil Scientifique**
ECCO :	**European Crohn's and Colitis Organisation**
EDTA :	**Ethylène diamine tétraacétique**
EI :	**Evénement indésirable**
EIG :	**Evénement indésirable Grave**
EMA :	**European Medicines Agency**
GRIC :	**Groupe de Recherche Immunologie Clinique**
ICH :	**International Conference on Harmonisation**
INRA :	**Institut National de la Recherche Agronomique**
J :	**jour**
M :	**mois**
MC :	**Maladie de Crohn**
MICI :	**Maladies Inflammatoires de l'Intestin**
MR :	**Méthodologie de Référence**
PBMC :	**Peripheral Blood Mononuclear Cell**
PCR :	**Polymerase Chain Reaction**
RAS :	**Rapport Annuel de Sécurité**
RCH :	**Rectocolite Hémoragique**
SA :	**spondylarthrite ankylosante**
SpA :	**Spondyloarthrite**
TNF :	**Tumor Necrosis Factor**
UCEIS :	**Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity**
ZIBR :	**Zero Inflated Beta Regression**

PRINCIPAUX CORRESPONDANTS

Investigateur principal
Dr Pauline Rivière
Service d'Hépato-gastroentérologie
CHU de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque
Centre Médico-Chirurgical Magellan
Avenue Magellan 33604 PESSAC Cedex
Tel : 07 86 95 93 57
Fax : 05 57 65 64 45
Courriel : pauline.riviere@chu-bordeaux.fr

Responsable scientifique
Dr Thomas BAZIN
Chef de Clinique Assistant
Service d'Hépato-gastroentérologie et endoscopies digestives
Hôpital Européen Georges Pompidou -AP-HP
20, Rue Leblanc
75015 PARIS
Courriel : thomasbazin@club-internet.fr

Attaché(e) de Recherche Clinique
Amandine MOURTHE et Aurore MATHIAS
Service d'Hépato-gastroentérologie
CHU de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque
Centre Médico-Chirurgical Magellan
Avenue Magellan 33604 PESSAC Cedex
Tel : 05 57 62 34 41
Fax : 05 57 62 34 77
Courriel : amandine.mourthe@chu-bordeaux.fr
aurore.mathias@chu-bordeaux.fr

Steeve BROUSSEAU
Service de Rhumatologie
CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33076 BORDEAUX
tél : 05 56 79 55 45
fax : 05 56 79 60 84
Courriel : steeve.brousseau@chu-bordeaux.fr

Promoteur
Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux
12 rue Dubernat
33 400 Talence
FRANCE

Responsable de la recherche au niveau du promoteur
Jonathan BELCASTRO - Directeur de la Recherche Clinique et de l'Innovation
Dr Anne GIMBERT - Responsable « Promotion interne »
Tél : 05 57 82 08 34 – Fax : 05 56 79 49 26
Courriel : anne.gimbert@chu-bordeaux.fr

Responsable d'Etudes Cliniques
Laetitia LACAZE-BUZY
Tél: 05 57 82 11 34-Fax: 05 56 79 49 26
Courriel: laetitia.lacaze-buzy@chu-bordeaux.fr

Centre de Méthodologie et de Gestion des données
Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche clinique et épidémiologique du CHU de Bordeaux
146 rue Léo Saignat, case n°75
33076 Bordeaux Cedex -France
Tél. : 05 57 57 11 29 - Fax : 05 57 57 15 78
Coordination méthodologique
Pr Rodolphe THIEBAUT
Courriel : rodolphe.thiebaut@u-bordeaux.fr
- Statisticienne
Hélène Savel
Courriel : helene.savel@u-bordeaux.fr
- Data Manager
Jérôme Galet
Courriel : jerome.galet@u-bordeaux.fr
- Secrétaire
Gwendoline GUNSTER
Courriel : gwendoline.gunster@u-bordeaux.fr

Laboratoires d'analyses
Groupe de Recherche Immunologie Clinique (GRIC)
Dr Isabelle PELLEGRIN
Laboratoire d'immunologie de l'hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba-Léon
33000 Bordeaux
Tél. : 33 (0) 5 56 79 56 79
Courriel : isabelle.pellegrin@chu-bordeaux.fr

Service d'anatomo-pathologie
Dr Geneviève BELLANNEE
Praticien Hospitalier
Service d'anatomo-pathologie
CHU de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque
Avenue Magellan 33600 PESSAC

Centre de Ressources Biologiques Bordeaux Biothèques Santé
Dr Isabelle PELLEGRIN
Hôpital du Tondu
Groupe hospitalier Pellegrin - CHU de Bordeaux
33076 Bordeaux Cedex
Tél : 05 57 82 11 50 Fax : 05 56 79 56 45
Courriel : isabelle.pellegrin@chu-bordeaux.fr

1. RESUME DE LA RECHERCHE

PROMOTEUR	CHU de Bordeaux
INVESTIGATEUR PRINCIPAL	**Dr Pauline Rivière** Service d'Hépato-gastroentérologie CHU de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque Centre Médico-Chirurgical Magellan Avenue Magellan 33604 PESSAC Cedex Tel : 07 86 95 93 57 Fax : 05 57 65 64 45 Courriel : pauline.riviere@chu-bordeaux.fr
TITRE ET ACRONYME	Microbiote intestinal de patients présentant une maladie inflammatoire chronique de l'intestin et/ou une spondyloarthrite : caractérisation et impact d'un traitement par anti-TNF alpha – étude MIST
TITRE SIMPLIFIE	Microbiote intestinal et maladies inflammatoires rhumatologiques et digestives
JUSTIFICATION / CONTEXTE	Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et les spondyloarthrites (SpA) sont des maladies courantes, fréquemment associées. Le microbiote intestinal joue un rôle important dans les MICI ; il est suspecté d'intervenir également dans la physiopathologie des SpA. Les anti-TNF alpha sont des médicaments sûrs et efficaces dans le traitement de ces maladies. Leur mécanisme d'action n'est pas clairement compris. Une meilleure connaissance de la physiopathologie de ces pathologies et de l'action des anti-TNF alpha est essentielle pour une prise en charge optimisée. Notre hypothèse est que l'efficacité des anti-TNF alpha dans les SpA et dans les MICI est au moins en partie liée à la restauration de l'homéostasie à l'interface entre la muqueuse digestive et le microbiote intestinal, soit par une action primaire sur l'épithélium digestif, soit par une action directe sur le microbiote intestinal.
OBJECTIFS	**Objectif principal** : Comparer la composition du microbiote fécal avant (J0) et 3 mois après l'initiation d'un traitement par anti-TNF alpha. **Objectifs secondaires :** 1) Comparer le microbiote fécal à J0 et à M3 entre les patients répondeurs et non-répondeurs au traitement anti-TNF alpha. 2) Estimer l'association entre les modifications du microbiote intestinal entre J0 et M3, les profils de composés organiques volatils (COVs), la réponse clinique et le ratio Th17/Treg 3) Au sein des groupes RCH : estimer l'association entre les modifications du microbiote intestinal fécal entre J0 et M3 et les modifications endoscopiques et l'histologie digestive, selon le traitement (anti-TNF alpha ou autre traitement) 4) Identifier les modifications du microbiote avant/après traitement spécifiques du traitement anti-TNF alpha.

SCHEMA DE LA RECHERCHE	Étude de cohorte observationnelle prospective monocentrique de type exposé/non exposé de patients atteints de Rectocolite Hémorragique, Maladie de Crohn ou Spondyloarthrite traités ou non par anti-TNF alpha.

CRITERES D'INCLUSION	• Patients âgés de plus de 18 ans
	• Patients présentant une des pathologies suivantes :
	  ○ Rectocolite hémorragique (RCH) répondant aux critères ECCO
	  ○ Maladie de Crohn (MC) répondant aux critères ECCO
	  ○ Spondyloarthrite (SpA) axiale pure ou axiale et périphérique répondant aux critères ASAS
	• Patients naïfs d'anti-TNF alpha, justifiant la mise en route :
	  ○ Soit de ce type de traitement selon les critères en vigueur (recommandations ECCO pour les MICI, recommandations de la Société Française de Rhumatologie de prise en charge des spondyloarthrites),
	  ○ Soit d'un autre type de traitement pour le groupe miroir (témoins).
	• Personne affiliée ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale.
	• Consentement libre, éclairé et écrit signé par le participant et l'investigateur (au plus tard le jour de l'inclusion et avant tout examen nécessité par la recherche).

CRITERES DE NON INCLUSION	• Patient présentant une autre maladie inflammatoire qu'une RCH, une MC ou une SpA • Antécédent de résection intestinale ou de stomie digestive • Prise d'antibiotiques dans les trois mois précédant le recueil de selles • Patients présentant une contre-indication au traitement • Refus de participer à cette étude à la lecture de la note d'information • Femmes enceintes ou allaitantes
PROCEDURES DE LA RECHERCHE	• Procédure thérapeutique : le traitement anti-TNF alpha (ou autre dans le groupe miroir) sera instauré conformément aux recommandations des sociétés savantes concernées. • La composition du microbiote fécal sera analysée par séquençage des régions 16S (composition bactérienne) et ITS2 (composition fungique), ainsi que par PCR quantitative ciblant l'ordre des *Burkholderiales*. • Les profils de COVs seront réalisés par spectrométrie de masse sur échantillons respiratoires. • Le ratio en lymphocytes circulants Th17/Treg sera obtenu par cytométrie de flux sur sang frais. • Dans les groupes RCH, une endoscopie (coloscopie à J0, rectosigmoïdoscopie à M3) permettra d'obtenir un score de sévérité endoscopique ainsi qu'une analyse histologique de la muqueuse digestive par la réalisation de biopsies. Ces procédures seront réalisées dans le cadre des soins courants.
CRITERES DE JUGEMENT	**Le critère de jugement principal** est l'évolution du profil de microbiote fécal mesuré à J0 et M3.

	Les critères de jugement secondaires : - microbiote intestinal à J0 et M3 - réponse clinique (score d'Harvey-Bradshaw pour les MC, score de Mayo pour les RCH, score BASDAI ou ASDAS pour les SpA) évaluée à M3 - profils de COVs à J0 et M3 - lymphocytes circulants (ratio lymphocytes Th17/Treg) à J0 et M3 - pour les RCH : o aspect endoscopique (score UCEIS) o histologie digestive (score de Riley modifié)
TAILLE D'ETUDE	La capacité de recrutement des centres permettra l'inclusion de 36 patients (12 MC, 12 RCH, 12 SpA) ayant une initiation de traitement anti-TNF alpha. Cependant dans cette population, nous estimons que sur les 36 patients inclus seulement 10 par groupe pourraient recevoir l'intégralité du traitement et seront donc analysables. L'analyse de ces 30 patients permettra de répondre à l'objectif principal (cf détails de l'estimation de la taille d'étude partie 11.1). De plus, afin d'avoir 30 patients témoins analysables (ayant reçu l'intégralité des 3 mois de traitement), 36 patients (12 MC, 12 RCH, 12 SpA) traités par un autre traitement que l'anti-TNF alpha seront inclus afin de pouvoir identifier les nœuds taxonomiques modifiés spécifiquement par le traitement anti-TNF alpha.
NOMBRE PREVU DE CENTRES	1 (CHU de Bordeaux) : • service de rhumatologie de l'hôpital Pellegrin • service d'hépato-gastroentérologie de l'hôpital Haut-Lévêque
DUREE DE LA RECHERCHE	Durée de la période d'inclusion = 21 mois Durée de participation de chaque participant = 3 mois Durée totale de la recherche = 24 mois
ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	L'objectif principal est de comparer la composition du microbiote fécal avant et 3 mois après l'initiation du traitement par anti TNF alpha. Dans un premier temps, la diversité Béta qui permet de comparer la variation de composition entre plusieurs communautés sera étudiée à l'aide de différentes mesures de dissimilarité comme la distance de Jaccard et la distance Unifrac. A partir de ces distances, des analyses exploratoires telles que PCoA (ou MDS) ou des analyses de clustering seront effectuées. Puis, une analyse à l'aide la méthode PERMANOVA sera présentée. Dans un second temps, pour chaque nœud de l'arbre phylogénétique, la comparaison se fera à l'aide du modèle ZIBR (two-part Zero Inflated Beta Regression model with random effects) (1). La multiplicité des tests sera prise en compte en ajustant la p-value à l'aide du False Discovery Rate (Benjamini et Hochberg).

RETOMBEES ATTENDUES	Nous nous attendons à observer dans cette étude exploratoire une modification de la composition du microbiote fécal après 3 mois de traitement par anti-TNF alpha. Chez les patients, la réponse clinique devrait être associée à des caractéristiques et/ou à des modifications quantitatives et qualitatives particulières du microbiote intestinal, des profils de COVs, du ratio Th17/Treg et de l'aspect endoscopique et de l'histologie digestive dans les groupes RCH. En cas de confirmation des résultats par des études de plus grande échelle (études de cohorte nationales), cette étude pourrait ouvrir la voie à une identification de patients potentiellement répondeurs à un traitement par anti-TNF alpha selon leur profil de microbiote intestinal initial (avant traitement).

ABSTRACT

This research has been registered in http://www.clinicaltrials.gov/

Characterization of the intestinal microbiota in patients with inflammatory bowel disease and/or spondyloarthritis and study of the impact of an anti-TNF alpha therapy

CHU of Bordeaux, France, is the sponsor of this research.

This research will be conducted with the support of CHU de Bordeaux.

- **Background:**

Spondyloarthritis and inflammatory bowel diseases are common diseases, frequently met together in overlap syndroms. Their physiopathology remains puzzling. A strong role of gut microbiota has been recently put forward to explain the development of inflammatory bowel diseases, and is suspected to play an important role in rheumatoid diseases. Anti-TNF alpha are effective and safe drugs in the treatment of both digestive and rheumatoid inflammatory diseases. The way they work is unclear, and the clinical response to this treatment is variable. A better understanding of the pathophysiology of inflammatory bowel diseases and of the action of anti-TNF alpha is essential to an optimized care.
Our hypothesis is that the efficacy of anti-TNF alpha in spondyloarthritis and in inflammatory bowel diseases is at least partly due to its restoring action of homeostasis at the interface between gastrointestinal mucosa and intestinal microbiota, either by primary action on the digestive epithelium, allowing it to regain its control and tolerance functions toward mucosal microbiota, either by direct action on the intestinal microbiota, *via* an inter-reigns regulation.

- **Purpose:**

The main objective of our study is to assess quantitative and qualitative changes in fecal microbiota before (D0) and 3 months after initiation of anti-TNF alpha.

- **Detailed description:**

We propose to conduct an exploratory study, on 10 spondyloarthritis and 20 inflammatory bowel diseases patients (10 Crohn's disease and 10 ulcerative colitis), in which a first anti-TNF alpha treatment is indicated. At D0 and M3, intestinal microbiota will be studied by DNA16S sequencing and qPCR, *via* a stool sampling. Volatile Organic Compounds (VOCs) profile will be obtained by mass spectrometry. Blood lymphocytes profile will be obtained by flux cytometry. In addition, a colonoscopy will be performed at D0 for RCH patients, with an endoscopic and histological assessment. A second short colonoscopy will be performed for RCH patients at M3. At each time, clinical assessment will be performed.
A mirror group of 10 spondyloarthritis and 20 inflammatory bowel diseases patients (10 Crohn's disease and 10 ulcerative colitis), in which an "all but anti-TNF alpha or biotherapy" treatment is indicated will be included to distinguish the specific effects on microbiota of anti-TNF alpha.
12 patients by group will be included at D0 by anticipating that some patients will stop their treatment between D0 and M3, and consequently will be excluded from M3 sampling and from final analysis. Final analysis will be performed on 10 patients by group.

- **Primary outcome:** The comparison of microbiota profiles before (D0) and after (M3) anti-TNF alpha treatment
- **Secondary outcomes:**
  - To look for microbiota characteristic at D0 that could predict clinical response at M3
  - To measure the association between microbiota modifications at M3, clinical response (Harvey-Bradshaw index for Crohn's disease, Mayo score for ulcerative colitis, BASDAI or ASDAS for spondyloarthritis), VOCs profile and blood lymphocytes profile (balance Th17/Treg)
  - For ulcerative colitis patients only: to measure the association between fecal microbiota modifications after three months and endoscopic and histologic modifications.
  - To look for specific microbiota modifications induced by anti-TNF alpha treatment.
- **Study design:** Monocentric, prospective, observational study

- **Eligibility criteria:**

Patient inclusion criteria:

- Patients aged over 18 years
- Patients with the following conditions :
  - Ulcerative colitis (UC) fulfilling the ECCO criteria
  - Crohn's disease (CD) fulfilling the ECCO criteria
  - Axial or peripheral spondyloarthritis (SpA) fulfilling the ASAS criteria
- Patients naïve to anti-TNF alpha, justifying the initiation of an anti-TNF alpha treatment according to current guidelines (ECCO IBD recommendations, the recommendations of the French Society of Rheumatology for SpA)
- Patients agreeing to sign the informed consent

Criteria for non-inclusion:

- Patient with an inflammatory disease other than UC, CD or SpA
- History of bowel resection or digestive stoma
- Taking antibiotics in the three months preceding the stool collection
- Patients with contraindication to treatment
- Pregnancy or breast feeding

- **Interventions:**
  - Therapeutic procedure

The choice of anti-TNF alpha and dosage will be at the discretion of the clinician, in accordance with standard practices. The possible combination with other treatments: immunosuppressant, corticosteroids, non steroidal anti-inflammatory drugs, will also be left free at the discretion of the clinician, and notified for the analysis of results. For mirror groups, the new treatment should not have been prescribed in the last three months before inclusion.

  - Study of the intestinal microbiota

The intestinal microbiota will be evaluated by the study of the fecal microbiota. The stool samples at day 0 and M3 will be frozen at -80°C until 24 hours after collection or shipped in special OMNIGene Gut® preservation kit from DNA Genotek (2). The clinical activity data will be identified at the time of sampling. In addition, a detailed food questionnaire on the seven days before the collection and a Bristol scale will be completed by all patients and controls. The horary of stool sampling will be recorded. The analysis of microbiota will be performed according to the following method : extraction of the DNA contained in feces according to a standardized method including a mechanic lysis, amplification of DNA16S according to a previously described method (3), sequencing of amplicons by sequencer 2nd generation Illumina MiSeq, bioinformatic analysis for taxonomic assignment of sequences obtained, by comparison with the Greengenes database containing a taxonomic classification of over 406000 bacterial sequences. This method allows a qualitative and quantitative analysis. A mycobiotal analysis will be performed after amplification of ITS2 region.
Moreover, quantitative PCR will be performed with specific primers targeting major species of *Burkholderiales* order, as this order shown in an exploratory study to be predictive of clinical response.

  - VOCs profile

VOCs profiles, measured by GC-MS, will be obtained at D0 and M3, using ReCIVA® (Owlstone Medical) sampler.

  - Circulatory immune cells

Flow cytometry analysis of fresh blood samples will characterize immune circulatory cells and especially Th17 and Treg lymphocytes.

- Endoscopy and histology (substudy)

A colonoscopy will be performed at day 0 for all patients with UC, as part of routine care, with 10 biopsies of 5 systematic sites to histological analysis in case of healthy mucosa, with targeted biopsies in case of endoscopic lesions. The specimens for histological and immunohistochemical analysis will be fixed immediately in a formalin solution at 10% and sent to pathology.
A second endoscopy (proctosigmoidoscopy) will be performed at three months as part of routine care (assessment of mucosal healing) for these same groups.
The endoscopic activity score will be the UCEIS. The histological activity score will be Riley score. The type of bowel preparation will be notified at each time.

- **Number of subjects:** 30 patients treated by TNF alpha inhibitors (10 spondyloarthritis, 10 Crohn's disease and 10 ulcerative colitis) and 30 patients treated by all but TNF alpha inhibitors (mirror group)
- **Statistical analysis:** The main objective is to compare the composition of the faecal microbiota before and 3 months after initiation of treatment with anti-TNF alpha.

  First, the Beta diversity which allows to compare the variation of composition between several communities will be studied using different dissimilarity measures such as the Jaccard distance and the Unifrac distance. From these distances, exploratory analyzes such as PCoA (or MDS) or clustering analyzes will be carried out. Then, an analysis using the PERMANOVA method will be presented.

  Secondly, for each node of the phylogenetic tree, the comparison will be made using the model ZIBR (two-part Zero Inflated Beta Regression model with random effects). The multiplicity of tests will be taken into account by adjusting the p.value using the False Discovery Rate (Benjamini and Hochberg).
- **Key-words:** Microbiota, spondyloarthritis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, anti-TNF alpha, inflammation

2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE

2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont représentées par la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Les MICI sont associées dans 30 à 40% des cas à des manifestations inflammatoires extra-digestives, par ordre de fréquence les pathologies rhumatismales inflammatoires, ophtalmologiques et dermatologiques (4). La prévalence des MICI est estimée en France à 0,2% de la population.

Les spondyloarthropathies (SpA) comprennent la spondylarthrite ankylosante (SA), les arthrites associés aux MICI, l'arthrite psoriasique, l'arthrite réactionnelle, la spondyloarthrite juvénile, le syndrome SAPHO. Leur prévalence globale est estimée à 0,35%.

Environ 20% des patients atteints de MC présentent des manifestations de SA, tandis que 5 à 6% des patients avec SA souffrent également d'une MICI. Des lésions iléales ou coliques endoscopiques sont détectées chez 30 à 45% de ces patients, et des lésions histologiques chez 60% de ces patients (5). En outre, une rémission clinique de la SA est toujours associé à une normalisation de l'histologie digestive, tandis que la persistance des symptômes rhumatismaux est majoritairement associée à la persistance d'une inflammation intestinale (6).

Ces éléments sont en faveur d'un lien étroit entre la physiopathologie des atteintes intestinales et articulaires, qui pourrait être expliqué par le rôle crucial de la flore digestive.

La flore digestive, ou microbiote intestinal, est l'ensemble des organismes vivants présents dans le tractus digestif. L'implication du microbiote intestinal dans les maladies non seulement digestives mais aussi extra-digestives a été mis en évidence dans les deux dernières décennies (7).

Si l'on sait que l'origine des MICI est multifactorielle, leur physiopathologie résultant d'une interaction entre les facteurs environnementaux (y compris le tabac), des facteurs génétiques et une dysrégulation du système immunitaire, il est maintenant clairement établi que des changements significatifs du microbiote intestinal sont associés à ces maladies (8,9). Ces changements, appelés dysbiose, sont caractérisés par un déséquilibre entre les populations bactériennes dans le microbiote intestinal. Cette dysbiose, particulièrement étudiée dans la MC, est caractérisée par une perte de la diversité et un déficit en certaines espèces du phylum des *Firmicutes*, en particulier *Faecalibacterium prausnitzii* de la famille des *Clostridiaceae*, qui se sont révélées avoir un potentiel anti-inflammatoire, et une augmentation d'autres espèces, en particulier des *Enterobacteriaceae*, en particulier *Escherichia coli,* y compris *E. coli* adhérente invasive, qui possède une action pro-inflammatoire (10).
Une étude a récemment montré que de faibles concentrations en *F. prausnitzii* sont corrélées avec une récidive précoce de MC après interruption du traitement par anti-TNF alpha (11).
De plus, outre la dysbiose bactérienne, une étude récente a montré qu'il existait chez des patients atteints de MC une dysbiose fungique caractérisée par des altérations en terme de biodiversité et de composition, suggérant un rôle du microbiote fungique dans la physiopathologie de la MC (12).
Les données concernant la RCH sont parcellaires et ont été obtenues à partir de cohortes plus réduites. Une étude en PCR quantitative a retrouvé une plus faible abondance de *Roseburia hominis* et de *Faecalibacterium prausnitzii* chez des patients atteints de RCH comparés à des sujets contrôles (13). Les COVs représentent un biomarqueur totalement non invasif innovant. Leurs profils sont corrélés à l'existence d'une maladie inflammatoire ou de plusieurs types de cancers. Ils permettent également de distinguer des MICI en poussée et en rémission (14).

La physiopathologie des SpA est encore imparfaitement comprise. Il est connu depuis plusieurs décennies que le HLA-B27, allèle normal du complexe majeur d'histocompatibilité présent dans 6-8% de la population expose à un risque relatif de 200 de développer une SA, avec une incidence de 90% chez les patients présentant une SA (15). Le rôle du HLA-B27 n'est pas encore clairement compris. Il a été suggéré que l'analogie avec certains épitopes bactériens (mimétisme moléculaire) pourrait faciliter, à l'occasion d'une

infection bactérienne ou d'une modification de la flore commensale, une rupture de la tolérance au soi. Des études plus récentes ont souligné dans des modèles animaux que l'HLA-B27 pourrait sélectionner un microbiote intestinal particulier qui prédisposerait à l'inflammation digestive (16).

Dans la physiopathologie de la SpA, l'implication du microbiote intestinal, qui joue un rôle majeur dans l'éducation du système immunitaire, est fortement suggéré par plusieurs études chez les animaux. Des rats transgéniques pour HLA-B27 développent un large spectre de symptômes auto-immuns comme une arthrite périphérique et axiale, et une colite. Lorsque ces mêmes rats sont élevés dans un environnement stérile (animaux axéniques), ils ne développent ni arthrite ni colite (17). Fait intéressant, un phénotype inflammatoire est restauré par la réintroduction des bactéries commensales dans l'alimentation de ces animaux axéniques, en particulier avec un cocktail contenant des *Bacteroides* et *Lactobacillus* (18).

Seules quelques études ont exploré le microbiote intestinal dans la SA. Une prévalence plus grande de bactéries réduisant les sulphates a été retrouvée dans les selles de patients présentant une SA (19). Une étude récente a montré que le microbiote de l'iléon terminal chez les patients atteints de SA différait significativement de celui des sujets sains, avec une augmentation de cinq familles bactériennes (*Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Rikenellaceae, Porphyromonadaceae* et *Bacteroidaceae*) et une diminution de deux familles (*Veillonellaceae* et *Prevotellaceae*) (20).

Le microbiote intestinal est susceptible de modifier l'équilibre entre les populations de lymphocytes T régulateurs et Th17 circulants (ratio Th17/Treg), *via* des mécanismes épigénétiques. Cette rupture d'équilibre a été clairement associée au développement et à la progression de pathologies inflammatoires non seulement du tractus digestif mais également à l'échelle systémique (21) et pourrait représenter le chaînon manquant entre modifications du microbiote intestinal et maladies inflammatoires rhumatismales (22).

Les traitements anti-TNF alpha ont révolutionné le traitement des maladies inflammatoires chroniques dans les années 2000, changeant drastiquement l'évolution de ces pathologies tout en présentant un excellent profil de sécurité (23). Il existe cependant des patients qui ne répondent pas cliniquement à ces molécules, sans qu'aucune prédiction de la réponse ou de la non-réponse ne soit possible avant initiation du traitement. Ainsi dans les MICI, une résistance primaire à un traitement anti-TNF alpha est observée chez 10 à 40 % des malades, et près de 40 % des patients ayant obtenu une réponse initiale perdent la réponse au cours de la première année de traitement (24). Dans les SpA, la non-réponse aux anti-TNF alpha est moins bien documentée ; la réponse n'était que de 31% (critère ASAS 40) dans une cohorte nationale (25).

Nous connaissons l'efficacité de ces traitements sur la cicatrisation de la muqueuse digestive, permettant la restauration d'une structure normale de l'épithélium digestif, qui peut alors à nouveau assurer ses fonctions de barrière et de régulation du microbiote luminal nécessaires à l'homéostasie digestive (26).

Ainsi, ces molécules pourraient indirectement changer la composition du microbiote intestinal. Une étude dans la MC a montré des changements de composition du microbiote après traitement par un anti-TNF alpha (l'adalimumab), avec une augmentation de nœuds taxonomiques (*Firmicutes*, *Bacteroides* et *Actinobacteria*) et une diminution des *E. coli* après traitement (27). Dans la RCH, la réponse clinique à trois mois était corrélée dans une étude récente à une concentration supérieure en *Faecalibacterium prausnitzii* avant l'instauration du traitement. De plus, dans cette même étude l'abondance en *F. prausnitzii* augmentait pendant le traitement chez les répondeurs (28). Dans une étude pédiatrique, le traitement de MICI par anti-TNF alpha augmentait à 6 semaines la diversité chez les répondeurs ; de plus les patients répondeurs présentaient avant l'instauration du traitement une plus grande abondance en bactéries des genres *Bifidobacterium*, *Clostridium colinum*, *Eubacterium rectale*, Clostridiales incultivables et *Vibrio*, ainsi qu'une plus faible abondance en *Streptococcus mitis* (29).

Une action directe sur le microbiote intestinal, *via* une régulation inter-règnes, est suggérée par plusieurs études (30,31). Cette régulation inter-règnes a été récemment mise en évidence, avec l'identification de récepteurs bactériens adrénergiques chez des pathogènes, permettant une reconnaissance des hormones neuro-endocrines de l'hôte et une adaptation physiologique bactérienne en fonction de la condition de l'organisme humain (32,33). L'existence d'un récepteur membranaire bactérien au TNF alpha a été anciennement suspectée, particulièrement chez les bactéries gram negatives (34) ; dans cette étude la présence de TNF alpha semblait augmenter la virulence de *Shigella flexneri.* Des études *in vitro* sont

cependant nécessaires pour tester les effets du TNF alpha et des anti-TNF alpha utilisés en pratique clinique sur des bactéries commensales du tube digestif.

Nous avons mené une étude exploratoire, dans les services de rhumatologie de l'hôpital Pellegrin et de l'hôpitale Cochin (AP-HP) sur 19 patients atteints de SpA nécessitant l'introduction d'anti-TNF alpha. L'étude du microbiote fécal a été réalisée par séquençage haut débit après amplification de la région codant pour l'ARN16 bactérien, à la Plateforme de Génomique Fonctionnelle. L'assignation taxonomique et l'analyse bioinformatique ont été réalisées au Centre de Bioinformatique de Bordeaux (CBiB, équipe de Macha Nikolski).
Nous avons montré une diversité microbienne réduite chez les non-répondeurs avant l'introduction d'un traitement par anti-TNF alpha, qui se corrigeait après trois mois de traitement. Nous avons également identifié un nœud taxonomique particulier, l'ordre des *Burkholderiales*, dont l'abondance était augmentée avant le début du traitement chez les futurs répondeurs. Par ailleurs, la composition du microbiote des non-répondeurs était caractérisée par une plus grande instabilité dans le temps.

Il n'existe pas d'étude en cours concernant les effets des anti-TNF alpha sur le microbiote intestinal selon le site www.clinicaltrials.gov.

2.2. HYPOTHESES DE LA RECHERCHE

Notre hypothèse est que l'efficacité des anti-TNF alpha dans les SpA et dans les MICI est au moins en partie liée à son action de restauration de l'homéostasie au niveau de l'interface entre muqueuse digestive et microbiote intestinal, soit par une action primaire sur l'épithélium digestif, lui permettant de retrouver ses fonctions de contrôle et de tolérance vis-à-vis du microbiote muqueux, soit par une action directe sur le microbiote intestinal, suggérée par plusieurs études.
Nous nous attendons à observer dans cette étude exploratoire une modification de la composition du microbiote fécal après 3 mois de traitement par anti-TNF alpha.
Chez les patients, la réponse clinique devrait être corrélée à des caractéritiques et/ou des modifications de la composition du microbiote fécal.

2.3. JUSTIFICATION DES CHOIX METHODOLOGIQUES

Il s'agit d'une étude de cohorte observationnelle prospective monocentrique de type exposé/non exposé de patients atteints de RCH, MC ou SpA traités ou non par anti-TNF alpha. Le fait que l'étude du microbiote intestinal à partir d'échantillons de selles est totalement non-invasive justifie l'aspect non-interventionnel (catégorie 2 de la loi Jardé).
Par ailleurs, afin de pouvoir identifier les modifications du microbiote fécal spécifiques au traitement anti-TNF alpha, en plus de l'inclusion de 30 patients (10 MC, 10 RCH, 10 SpA) ayant une indication à l'initiation à l'anti-TNF alpha, un groupe témoin de 30 patients (10 MC, 10 RCH, 10 SpA) ayant une indication à l'initiation d'un autre traitement que l'anti-TNF alpha sera inclu dans l'étude. Il s'agit d'une étude exploratoire dans laquelle nous recherchons des modifications importantes du microbiote expliquant les effectifs assez faibles mais avec un schéma d'étude permettant un contraste important entre patients traités par anti-TNF et témoins.
De plus, les patients atteints de RCH bénéficiant d'une endoscopie à J0 (évaluation des lésions) et à M3 (évaluation de la cicatrisation muqueuse) dans le cadre des soins courants, nous disposerons sans intervention de biopsies permettant une analyse de l'histologie muqueuse dans ce sous-groupe de patients.

2.4. RAPPORT BENEFICE / RISQUE

Il n'existe pas de bénéfice individuel direct lié à cette recherche.
Il n'existe aucun risque prévisible lié à cette recherche, les prélèvements de selles étant totalement anodins. Le prélèvement de deux tubes de sang supplémentaires ne causera aucune gêne car un prélèvement sanguin sera de toute façon réalisé dans le cadre des soins courants dans le même temps.
Les seules contraintes sont donc liées aux deux prélèvements de selles par patient, qui ne nécessitent cependant aucun déplacement supplémentaire.
Le rapport bénéfice/risque est donc excellent et permet de proposer ce protocole aux patients.

2.5. RETOMBEES ATTENDUES

Les résultats de cette étude devront être confirmés par des projets de plus grande échelle, régionaux ou nationaux. Une implication des réseaux européens comme le GETAID pour les MICI serait également envisageable.
En cas d'identification de nouveaux marqueurs microbiotaux à J0 potentiellement prédictifs de la réponse clinique à M3, la recherche de ces marqueurs microbiotaux particuliers par PCR quantitative ciblée sur les marqueurs identifiés permettrait, après vérification du caractère prédictif des données produites, la réalisation d'un test simple avec une réduction drastique des coûts et une utilisation aisée en pratique clinique quotidienne.
En cas de consolidation de nos résultats, cette étude pourrait ainsi ouvrir la voie à une identification de patients potentiellement répondeurs ou non-répondeurs à un traitement par anti-TNF alpha selon leur profil de microbiote intestinal et ainsi permettre au clinicien de choisir d'emblée le traitement le plus adapté, en évitant par exemple aux patients potentiellement non-répondeurs une perte de temps avant soulagement de leurs symptômes, ainsi qu'un coût inutile pour le système de santé. Ceci est impossible avec les différents moyens dont nous disposons actuellement.
Cette possibilité de prise en charge personnalisée basée sur des biomarqueurs simples suivrait l'évolution nécessaire des pratiques médicales.

2.6. JUSTIFICATION DU FAIBLE NIVEAU D'INTERVENTION

La procédure à l'étude dans cette recherche ne comporte que des risques et des contraintes minimes. En effet, seuls deux tubes de sang supplémentaires et le recueil de selles sont prévus spécifiquement dans le cadre de cette recherche. Par ailleurs, cette recherche n'occasionne pas de déplacement supplémentaire des participants.

3. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

3.1. OBJECTIF PRINCIPAL

Comparer le microbiote fécal avant (J0) et 3 mois après l'initiation de l'anti-TNF alpha.

3.2. OBJECTIFS SECONDAIRES

1) Comparer le microbiote fécal à J0 et à M3 entre les patients répondeurs et non-répondeurs au traitement anti-TNF alpha.
2) Estimer l'association entre les modifications du microbiote intestinal entre J0 et M3, la réponse clinique, les profils de COVs et le ratio Th17/Treg
3) Au sein des groupes RCH : estimer l'association entre les modifications du microbiote intestinal fécal entre J0 et M3 et les modifications endoscopiques et l'histologie digestive, selon le traitement (anti-TNF alpha ou autre traitement)
4) Identifier les modifications du microbiote avant/après traitement spécifiques du traitement anti-TNF-alpha.

4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE

Il s'agit d'une étude de cohorte observationnelle prospective, monocentrique de type exposé/non exposé de patients atteints de RCH, MC ou SpA traités ou non par anti-TNF alpha.

5. CRITERES D'ÉLIGIBILITE

5.1. CRITERES D'INCLUSION

- Patients âgés de plus de 18 ans
- Patients présentant une des pathologies suivantes :
  - RCH répondant aux critères ECCO
  - MC répondant aux critères ECCO
  - Spondyloarthrite axiale seule ou axiale et périphérique répondant aux critères ASAS
- Patients naïfs d'anti-TNF, justifiant la mise en route :
  - Soit d'un traitement anti-TNF selon les critères en vigueur (recommandations ECCO pour les MICI, recommandations de la Société Française de Rhumatologie de prise en charge des spondyloarthrites),
  - Soit d'un autre type de traitement hormis une biothérapie pour le groupe miroir.
- Personne affiliée ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale.
- Consentement libre, éclairé et écrit signé par le participant et l'investigateur (au plus tard le jour de l'inclusion et avant tout examen nécessité par la recherche).

5.2. CRITERES DE NON INCLUSION

- Patient présentant une autre maladie inflammatoire qu'une RCH, une maladie de Crohn ou une spondyloarthrite
- Antécédent de résection intestinale ou de stomie digestive
- Prise d'antibiotiques dans les trois mois précédant le recueil de selles
- Patients présentant une contre-indication au traitement
- Refus de participer à cette étude à la lecture de la note d'information
- Femmes enceintes ou allaitantes

5.3. FAISABILITE ET MODALITES DE RECRUTEMENT

Le recrutement sera effectué soit en consultation, soit en hôpital de jour.
Les praticiens au contact des patients proposeront systématiquement aux patients répondant aux critères d'inclusion de participer à l'étude.

Les inclusions seront réalisées soit dans le service de Rhumatologie de l'hôpital Pellegrin, soit dans le service d'Hépato-gastroentérologie de l'hôpital Haut-Lévêque.

Après analyse rétrospective des files actives de patients sur les deux dernières années dans les deux sites, le recrutement minimal concernant les premières prescriptions d'anti-TNF alpha est d'environ deux patients par mois en rhumatologie, six patients par an atteints de MC et huit atteints de RCH par an.
Nous estimons pouvoir inclure 2 patients par mois au minimum dans chaque service.

Nous inclurons à J0 12 patients par groupe. Les analyses à M3 ne seront réalisées que chez les patients chez lesquels le traitement à l'étude sera poursuivi jusqu'à M3. Les analyses finales ne seront réalisées que chez les 10 premiers patients par groupe ayant complété leur suivi.

6. PROCEDURE(S) DE LA RECHERCHE

6.1. METHODES D'ETUDE DU MICROBIOTE INTESTINAL :

Le microbiote intestinal sera évalué par l'étude du microbiote fécal. Les prélèvements de selles à J0 et à M3 seront congelés à -80°C au plus tard 24h après le recueil, ou conservés à température ambiante et envoyés par courrier au Centre de Ressources Biologiques dans un milieu adapté et validé pour l'étude du microbiote (OMNIGene Gut® (2) de DNA Genotek). Les données cliniques d'activité seront relevées au moment du prélèvement. De plus, un questionnaire alimentaire détaillé sur les sept jours précédant le recueil sera rempli par tous les patients et témoins (en annexe) afin en particulier d'éliminer un biais lié à un changement de régime alimentaire.

De même, une score de consistance des selles sera réalisé (échelle de Bristol en annexe) et l'heure du recueil des selles sera notifié afin de maîtriser les biais de composition du microbiote liés à la consistance des selles (35) et au rythme circadien.

L'analyse du microbiote sera réalisée selon le procédé suivant : extraction de l'ADN contenu dans les fèces selon une méthode standardisée comprenant une étape de lyse mécanique (BeadBeater), amplification de l'ADN16S selon une méthode précédemment décrite (3), séquençage des amplicons par séquenceur 2ème génération Illumina MiSeq, analyse bioinformatique pour assignation taxonomique des séquences obtenues, par comparaison avec la base de données Greengenes, contenant une classification taxonomique de plus de 406000 séquences bactériennes. Une caractérisation du mycobiome sera également réalisée, à partir de l'amplification de la région ITS2 selon une méthode précédemment décrite (36).

Il s'agit d'une méthode d'analyse qualitative (composition à l'échelle des phyla, classes, ordres, familles, genres et espèces) et quantitative (relative), validée dans l'étude de la composition et de la diversité des communautés microbiennes (37).

Une PCR quantitative sur l'ordre des *Burkholderiales* (identifié comme marqueur prédictif de réponse clinique dans notre étude exploratoire) sera réalisée à l'aide d'amorces spécifiques des espèces majoritaires de cet ordre, selon la méthode décrite par l'INRA (38).

6.2. ENDOSCOPIE ET HISTOLOGIE - ETUDE ANCILLAIRE SUR PATIENTS ATTEINTS DE RCH

Une étude ancillaire sera réalisée à partir des prélèvements issus des patients atteints de RCH.

- Une endoscopie sera réalisée à J0 pour tous les patients atteints de RCH (groupes I et It), dans le cadre des soins courants, avec 10 biopsies étagées sur 5 sites systématiques pour analyse histologique en cas de muqueuse saine, plus des biopsies ciblées en cas de lésions endoscopiques. Les prélèvements destinés à l'analyse histologique seront fixés immédiatement dans une solution de formol à 10% et envoyés en anatomo-pathologie. Une seconde endoscopie (rectosigmoïdoscopie) sera réalisée à trois mois dans le cadre des soins courants (évaluation de la cicatrisation muqueuse) pour ces mêmes groupes.
- Le score d'activité endoscopique sera l'UCEIS.
- Le score d'activité histologique sera le score de Riley.
- Le type de préparation colique sera notifié à chaque examen.

6.3. CELLULES IMMUNITAIRES CIRCULANTES

L'immunophénotypage sera réalisé sur sang frais à partir d'un tube EDTA par technique de cytométrie de flux au GRIC (Groupe de Recherche en Immunologie Clinique, Claire Larmonier), avec typage des lymphocytes Th17 et Treg.

Le deuxième tube EDTA sera envoyé au CRB. Une préparation de type Ficoll permettra d'une part une analyse ultérieure des PBMC et d'autre part la réalisation d'aliquots de plasma pour analyses ultérieures, en cas de questions scientifiques émergentes.

6.4. PROFILS DE COVS

Les échantillons d'air expiré seront recueillis à J0 et à M3 à l'aide d'un appareil de type ReCIVA® (Owlstone Medical). La durée de recueil des échantillons est comprise entre 1 et 10 minutes selon le gabarit du patient. L'analyse des profils de COVs sera réalisée par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie gazeuse.
Cet examen est optionnel. Il sera proposé en fonction des disponibles de l'appareil dans les services.

7. TRAITEMENTS ASSOCIES

7.1. TRAITEMENTS ASSOCIES AUTORISES

7.1.1. MEDICAMENTS AUXILIAIRES

Le choix de l'anti-TNF et la posologie seront laissés à l'appréciation du clinicien, dans le respect des AMM, en accord avec les pratiques courantes.

7.1.2. AUTRES TRAITEMENTS/PROCEDURES

La prescription conjointe ou exclusive d'autres traitements : immunosuppresseur, corticoïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens, à l'exception des biothérapies, sera également laissée libre, à l'appréciation du clinicien, et notifiée dans le cahier d'observation afin d'être pris en compte pour l'analyse des résultats. Pour les groupes miroir, le nouveau traitement instauré devra ne pas avoir été reçu par les patients dans les 3 mois précédant l'inclusion.

7.2. TRAITEMENTS/PROCEDURES ASSOCIE(E)S INTERDIT(E)S

Toute antibiothérapie systémique dans les trois mois précédant l'inclusion ou pendant la durée d'inclusion sera un motif d'exclusion du protocole, en raison des modifications drastiques du microbiote intestinal lié à l'utilisation d'antibiotiques. De même, la prise de prébiotiques ou probiotiques médicamenteux (non alimentaires) sera interdite.

8. CRITERES DE JUGEMENT

8.1. CRITERE DE JUGEMENT PRINICIPAL

Le critère de jugement principal sera le profil de microbiote fécal à J0 et M3 obtenu d'après la méthode décrite dans le paragraphe 6.1.

8.2. CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES

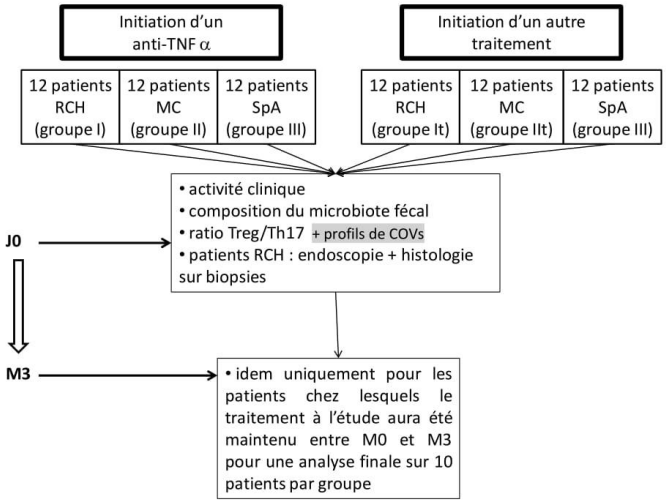
- Réponse clinique
  - score d'Harvey-Bradshaw pour les MC (39) (en annexe) :
    - la réponse clinique étant définie par une baisse d'au moins 3 points entre J0 et M3,
    - la rémission clinique par un score inférieur ou égal à 4.
  - score de Mayo pour les RCH (40) (en annexe) :
    - la réponse clinique étant définie par une baisse d'au moins 2,5 points entre J0 et M3,
    - la rémission clinique par un score inférieur à 2,5.
  - score BASDAI (en annexe) pour les SpA axiales pures et score ASDAS (en annexe) toutes les formes cliniques de SpA (41)) :
    - les non-répondeurs étant définis par une baisse du score ASDAS inférieure ou égale à 1,
    - les répondeurs partiels par une baisse supérieure ou égale à 1,1 et inférieure à 2,
    - les répondeurs par une baisse supérieure ou égale à 2.

- Profils de COVs à J0 et M3

- Ratio lymphocytes Th17/Treg circulants
  - ratios entre J0 et M3 et concentration sanguine absolue en lymphocytes Treg et Th17 entre J0 et M3

- Pour l'analyse dans le sous-groupe RCH
  - aspect endoscopique (score UCEIS (42) à J0 et M3)
  - histologie digestive (score de Riley modifié (43) à J0 et M3)

8.3. SCHEMA DE LA RECHERCHE



9. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE

9.1. Calendrier de la recherche

- Durée de la période d'inclusion = 21 mois
- Durée de participation de chaque participant = 3 mois
- Durée totale de la recherche = 24 mois

9.2. Tableau recapitulatif du suivi participant

	Pré-inclusion	Inclusion J0	Visite M3 (+/- 15 jours)
Information sur le projet de recherche (R)	✓		
Recueil du consentement éclairé (R)	✓		
Vérification des critères d'inclusion (R)	✓	✓	
Examen clinique[1] (S)		✓	✓
Biologie suivi standard[2] (S)		✓	✓
Microbiote intestinal (R)		✓	✓
Profil de COVs (R)[3]		✓	✓
Ratio Th17/Treg circulants (R)		✓	✓
Echelle de Bristol et heure du recueil		✓	✓
Questionnaire alimentaire (R)		✓	✓
Score UCEIS (RCH) (R)		✓	✓
Score de Riley modifié (RCH) (R)		✓	✓

(S)Examen effectué dans le cadre du soin (R)Examen effectué dans le cadre de la recherche
1Examen clinique comprenant notamment la calcul des scores d'activité
2 (NFS, ionogramme sanguin, CRP, bilan hépatique)
3 Cet examen est optionnel. Il sera proposé en fonction des disponibles de l'appareil dans les services.

9.3. VISITE DE PRE-INCLUSION

9.3.1. RECUEIL DU CONSENTEMENT

Lors de la visite de pré-inclusion, l'investigateur informe le participant et répond à toutes ses questions concernant l'objectif, la nature des contraintes, les risques prévisibles et les bénéfices attendus de la recherche. Il précise également les droits du participant dans le cadre d'une recherche impliquant la personne humaine et vérifie les critères d'éligibilité.

Dans le cas de la constitution d'une collection biologique et de sa conservation à l'issue de la recherche, l'investigateur informe le participant de la conservation à des fins scientifiques, de ses prélèvements et recueille son consentement et le documente dans le dossier source.

Un exemplaire de la note d'information est alors remis au participant par l'investigateur.

Après cette séance d'information, le participant dispose d'un délai de réflexion. L'investigateur est responsable de l'obtention du consentement éclairé écrit du participant. Le formulaire de consentement doit être signé AVANT LA REALISATION DE TOUT EXAMEN CLINIQUE OU PARACLINIQUE NECESSITE PAR LA RECHERCHE.

Si le participant donne son accord de participation, ce dernier et l'investigateur inscrivent leurs noms et prénoms en clair, datent et signent le formulaire de consentement en deux exemplaires originaux.

Les différents exemplaires de la note d'information et du formulaire de consentement sont alors répartis comme suit :

- Un exemplaire original de la note d'information et du consentement signé est remis au participant.
- L'autre exemplaire original est conservé par l'investigateur (même en cas de déménagement du participant pendant la durée de la recherche) dans un lieu sûr inaccessible à des tiers.

Tout amendement qui modifie la prise en charge des participants ou les bénéfices, risques et contraintes de la recherche fait l'objet d'un nouveau document d'information. L'information des personnes concernées suit la même procédure que celle précitée.

9.3.2. DEROULEMENT DE LA VISITE

Le médecin investigateur pratiquera un interrogatoire et un examen clinique rentrant dans le cadre des soins courants, comprenant en particulier la recherche de contre-indication au traitement immuno-suppresseur justifiant ainsi l'inclusion dans l'étude.

Il remettra également au patient un pot de coproculture permettant la réalisation du prélèvement de selles la veille de la réalisation de la visite d'inclusion. Ce prélèvement sera récupéré par le médecin investigateur le jour de la visite d'inclusion.

9.4. VISITE D'INCLUSION

Le médecin investigateur pratiquera un interrogatoire et un examen clinique rentrant dans le cadre des soins courants, comprenant en particulier la recherche de contre-indication au traitement immuno-suppresseur, le calcul du score d'activité, et le statut tabagique.

Un auto-questionnaire alimentaire rétrospectif portant sur les sept jours précédant le prélèvement de selles (en annexe) sera complété par le patient.

Les examens biologiques incluront :

- Un prélèvement biologique dans le cadre de la prise en charge habituelle : NFS, ionogramme sanguin, CRP, bilan hépatique (bilirubine totale, ASAT, ALAT, PAL, gGT)

- Un prélèvement biologique dans le cadre de la recherche : 2 tubes de sang frais sur tube EDTA de 7mL pour immunophénotypage sur sang frais (1 tube) et préparation de type Ficoll-Paque (1 tube).
- Un prélèvement de selles pour analyse du microbiote fécal.

Pour les services disposant de l'appareil, un profil COVs sera réalisé.

9.5. VISITE DE SUIVI (M3)

Une visite de suivi à M3 se fera dans le cadre de la prise en charge habituelle. Il n'y aura pas de visite supplémentaire dans le cadre de la recherche.

Lors de cette visite, un examen clinique complet, un bilan biologique incluant les examens décrits à la visite d'inclusion et un questionnaire alimentaire seront réalisés.

9.6. ABANDON ET RETRAIT DE CONSENTEMENT

Le participant qui souhaite abandonner ou retirer son consentement de participation à la recherche (comme il est en droit de le faire à tout moment) n'est plus suivi dans le cadre du protocole, mais doit faire l'objet de la meilleure prise en charge possible compte tenu de son état de santé et de l'état des connaissances du moment.

Un **abandon** est une décision d'un participant inclus de faire valoir son droit d'interrompre sa participation à une recherche, à tout moment au cours du suivi, sans qu'il n'encoure aucun préjudice de ce fait et sans avoir à se justifier.

Un **retrait de consentement** est une décision d'un participant de revenir sur sa décision de participer à une recherche et de faire valoir son droit d'annuler son consentement éclairé, à tout moment au cours du suivi et sans qu'il n'encoure aucun préjudice de ce fait et sans avoir à se justifier.

L'investigateur doit identifier la cause de l'abandon/du retrati et évalue s'il est possible de recueillir la variable sur laquelle porte le critère de jugement principal au moment de l'abandon/du retrait. Les abandons/retraits doivent être notifiés rapidement au centre investigateur coordonnateur, au promoteur et au centre de méthodologie et de gestion des données. Les raisons et la date d'abandon/de retrait doivent être documentées dans le cahier d'observation et dans le dossier médical du participant.

9.7. REGLES D'ARRET DE LA RECHERCHE

Fin de la recherche ou arrêt prévu de la recherche : terme de la participation de la dernière personne qui se prête à la recherche aussi appelé dernière visite du dernier participant inclus dans la recherche (toute autre définition doit être mentionnée dans le protocole).

Lorsque la recherche a atteint son terme prévu (arrêt prévu), la fin de la recherche doit être déclarée à l'ANSM et au CPP dans un délai de 90 jours.

Arrêt anticipé de la recherche : la recherche clinique est arrêté (définitivement) de façon anticipée. C'est le cas, notamment, lorsque le promoteur décide :

- de ne pas commencer la recherche malgré l'obtention de l'autorisation de l'ANSM et de l'avis favorable d'un CPP ;
- de ne pas reprendre la recherche après l'avoir interrompu temporairement ou après sa suspension par l'ANSM.

Lorsque la recherche est arrêtée (définitivement) de façon anticipée, la fin de la recherche doit être déclarée à l'ANSM dans un délai de 15 jours en indiquant les raisons qui motivent cet arrêt.

Arrêt temporaire de la recherche : l'arrêt temporaire d'une recherche clinique consiste en :

- l'arrêt de l'inclusion de nouvelles personnes dans cette recherche;

- et/ou l'arrêt de l'administration du produit testé, le cas échéant, à tout ou partie des personnes déjà incluses dans la recherche ;

- et/ou l'arrêt de la pratique des actes prévus par le protocole de la recherche.

Toute décision du promoteur d'interrompre temporairement la recherche doit faire l'objet d'une information immédiate à l'ANSM et au CPP concerné et dans un second temps et dans un délai maximum de 15 jours calendaires suivant la date de cette interruption, d'une demande d'autorisation de modification substantielle concernant cet arrêt temporaire soumise à l'ANSM et d'une demande d'avis au CPP concerné.

9.8. DEVIATIONS AU PROTOCOLE

Les déviations peuvent concerner tous les aspects d'un protocole de recherche : processus d'inclusion, suivi, mesure des critères de jugement, traitements. Toutes doivent être documentées par l'investigateur et discutées en Conseil Scientifique.

Seuls les abandons entraînent un arrêt du suivi. Même en cas de déviation au protocole, le suivi du participant doit être mené jusqu'au terme prévu dans le protocole.

9.8.1. PARTICIPANT PERDU DE VUE

Un participant est considéré comme perdu de vue quand il arrête le suivi prévu dans le cadre du protocole sans raison connue de l'investigateur, de sorte que le recueil des données ne peut pas être effectué comme prévu.
Les participants perdus de vue doivent faire l'objet d'une recherche active de la part de l'investigateur.

9.8.2. PARTICIPANT INCLUS A TORT

Un participant est considéré comme inclus à tort lorsqu'il a effectivement été inclus dans la recherche alors qu'il ne vérifiait pas tous les critères d'éligibilité. Les participants inclus à tort doivent faire l'objet d'une discussion en Conseil Scientifique. Ils doivent continuer à être suivis comme prévu par le protocole jusqu'à ce qu'une décision soit prise par le Conseil Scientifique.

9.9. CONTRAINTES LIEES A LA RECHERCHE ET INDEMNISATION EVENTUELLE DES PARTICIPANTS

Les contraintes liées à cette recherche sont principalement dues à la prise de sang supplémentaire permettant de constituer la collection d'échantillons biologiques. La douleur associée à la réalisation de ce prélèvement pourra notamment être atténuée par la pose d'un patch anti-douleur avant le geste sur la zone de prélèvement.

Le participant à la recherche ne pourra pas participer simultanément à une autre recherche interventionnelle.

Aucune indemnisation éventuelle n'est prévue pour les participants à cet essai.

9.10. CIRCUIT DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

Les différents bilans biologiques réalisés à J0 et M3 sont récapitulés dans le « tableau récapitulatif du suivi participant » (§ 9.2) et comprennent :

- 1 tube EDTA supplémentaire de sang frais sera acheminé en urgence au GRIC à température ambiante (entre 15 et 25°C) pour immunophénotypage sur sang frais à l'adresse suivante (envoi possible seulement du lundi au jeudi inclu) :

GRIC – Groupe de recherche en immunologie clinique
Service d'immunologie - Immunogénétique
Pôle de biologie et de pathologie
Groupe hospitalier Pellegrin - CHU de Bordeaux - 33076 Bordeaux Cedex
Tél : 05-57-82-14-68 (poste direct : 21 468) - Fax : 05.56.79.56.45

- 1 tube EDTA supplémentaire de sang frais sera acheminé au CRB à température ambiante (entre 15 et 25°C) pour préparation de type Ficoll à l'adresse suivante :

Centre de ressources biologiques
Groupe hospitalier Pellegrin - CHU de Bordeaux - 33076 Bordeaux Cedex
Tél : 05-57-82-12-00

- Les échantillons de selles (J0 et M3) seront acheminés directement du lieu de prélèvement hospitalier jusqu'au CRB par transport agréé, à 4°C, dans un délai maximum de 24h après le recueil, ou acheminés par voie postale à température ambiante conservés dans un kit spécifique (OMNIGene Gut®) en cas d'impossibilité de prélèvement hospitalier.
- Les échantillons d'air expiré (J0 et M3) seront acheminés directement du lieu de prélèvement jusqu'à la compagnie Owlstone Medical (Cambridge, Royaume-Uni) pour analyse, à température ambiante par voie postale.

9.11. COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

L'objectif de la constitution des collections d'échantillons biologiques est à but de recherche ultérieure. La constitution d'une plasmathèque, d'une sérothèque et d'une cellulothèque sera réalisée dans le cadre de ce protocole aux visites J0 et M3.

Les échantillons conservés seront (par patient) :
- 2 échantillons de selles
- 1 aliquot de PBMC résultant de la préparation au Ficoll
- 1 aliquot de plasma résultant de la préparation au Ficoll
- blocs de paraffine incluant les biopsies réalisées lors des endoscopies pour les RCH (nombre variable selon l'étendue des lésions)

Les biopsies coliques réalisées dans le cadre des soins courants seront archivées au laboratoire d'anatomo-pathologie de Haut-Lévêque pour analyse ultérieure, sans anonymisation spécifique (étiquette SIGMA).

L'ensemble des prélèvements (à l'exception des biopsies) seront conservés au Centre de Ressources Biologiques Plurithématique - Bordeaux Biothèques Santé (CRB-P BBS) localisé à l'hôpital du tondu, Groupe hospitalier Pellegrin - CHU de Bordeaux - 33076 Bordeaux Cedex.

Le porteur de la collection sera le Docteur Pauline Rivière.

Il est prévu de détruire les prélèvements après 5 années de conservation à l'issue de la recherche.

10. GESTION DES ÉVÉNEMENTS INDÉSIRABLES

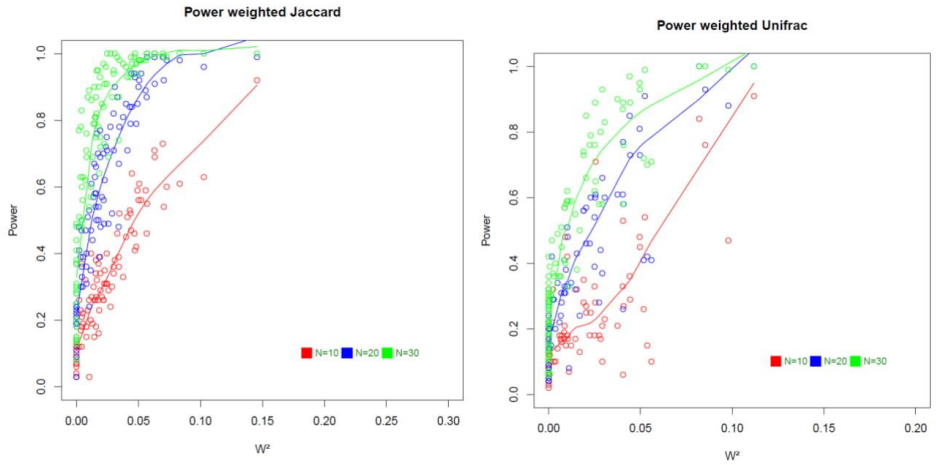
Les effets ou de la procédure concernée (pharmacovigilance, matériovigilance, hémovigilance…).

Aucun effets indésirables/incidents n'est à prévoir lors de cette étude.

11. ASPECTS STATISTIQUES

11.1. CALCUL DE LA TAILLE D'ETUDE

L'objectif principal est de comparer la composition du microbiote fécal avant (J0) et 3 mois après l'initiation de traitement par anti-TNF alpha. La capacité de recrutement des centres permettra l'inclusion de 36 patients (12 MC, 12 RCH, 12 SpA) ayant une indication d'initiation de traitement anti-TNF alpha. Cependant, dans cette population, nous estimons que sur les 36 patients inclus seulement 10 par groupe pourraient recevoir l'intégralité du traitement entre J0 et M3 et seront donc analysables. Avec les données de l'étude pilote sur les SpA, l'inclusion de 30 patients permettra, selon la méthode PERMANOVA (44), pour une puissance de 80% d'obtenir un w^2 d'au moins 0.2 (weighted Jaccard, ne prenant en compte que l'abondance) et d'au moins 0.04 (weighted Unifrac, prenant en compte l'abondance et l'arbre phylogénétique). w^2 étant l'estimation non-biaisée de R^2 (rapport de la variabilité inter-groupe/ variabilité totale).
De plus, afin d'avoir 30 patients témoins analysables (ayant reçu l'intégralité des 3 mois de traitement) 36 patients (12 MC, 12 RCH, 12 SpA) traités avec un autre traitement que l'anti-TNF alpha seront inclus afin de pouvoir identifier les nœuds taxonomiques modifiés spécifiquement par le traitement anti-TNF alpha.



11.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES

11.2.1. STRATEGIE D'ANALYSE

Les données seront analysées par le biostatisticien du Centre de Méthodologie et de Gestion des données, l'Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche Clinique et Epidémiologique du CHU de Bordeaux (USMR).

Les analyses se feront sur données disponibles c'est-à-dire sans imputation des données manquantes.

Toutes les estimations seront effectuées au risque d'erreur de première espèce $\alpha = 5\%$.

11.2.2. METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES

Les variables qualitatives seront décrites en termes d'effectif, de pourcentage et d'intervalle de confiance à 95% selon la loi binomiale exacte.

Les variables quantitatives seront décrites en termes d'effectif, moyenne, écart-type et intervalle de confiance à 95% de la moyenne, médiane, minimum, maximum, 1er et 3ème quartile.

On essaiera autant que possible d'associer une représentation graphique aux analyses.

11.2.3. LOGICIELS UTILISES

Les analyses seront réalisées avec le logiciel SAS® (version n°9.3 et versions ultérieures) et le logiciel R®.

11.3. PLAN D'ANALYSE

11.3.1. DESCRIPTION DES INCLUSIONS ET DU SUIVI

Le nombre de patients inclus, la courbe des inclusions (évolution du nombre des patients inclus entre la première et la dernière inclusion) seront présentés.

11.3.2. PATIENTS INCLUS DANS L'ANALYSE

Ne pourront être exclus de l'analyse que les patients qui présentent au moins une des conditions suivantes :

- patients inclus à tort pour consentement non signé ;
- patients inclus à tort pour critère(s) majeur(s) d'éligibilité non respecté(s) ;
- patients ayant retiré leur consentement.

Cette décision d'exclusion sera prise par le Conseil Scientifique après documentation de l'observation par le Centre de Méthodologie et de Gestion des données.

En dehors de ces exclusions, les patients décédés, perdus de vue ou ayant abandonné la recherche seront tous inclus dans l'analyse.

11.3.3. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS A L'INCLUSION

Les patients seront décrits selon les variables suivantes :

- respect des critères d'éligibilité ;
- caractéristiques épidémiologiques ;
- caractéristiques cliniques ;
- caractéristiques biologiques.

Une description des violations du protocole et des patients répartis selon ces violations sera faite.

Une description des causes de décès et d'abandon sera faite et les patients décédés, perdus de vue ou ayant abandonné la recherche seront décrits et comparés aux autres patients.

11.3.4. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

L'analyse de la composition du microbiote sera effectuée pour chaque patient en réalisant une assignation taxonomique à l'aide du logiciel TANGO (version 1.0). Les reads seront d'abord mappés sur les séquences 16S de référence contenues dans la base de données GreenGenes (release 10022015). Les échantillons ayant un nombre insuffisant de reads mappés ne seront pas pris en compte dans l'analyse.

Pour chaque échantillon, nous disposerons d'un arbre phylogénétique dont les nœuds taxonomiques seront étiquetés par les comptes de reads assignés à ce nœud. Une matrice d'occurrence sera alors construite à partir des résultats d'assignation de chaque échantillon selon le principe suivant : si n reads sont assignés à un nœud N, le nœud N-1 dans l'arbre phylogénétique voit son compte augmenté de n. Le nombre d'assignations au nœud racine (taxon Bacteria) correspondra donc au nombre total de reads mappés sur les séquences de référence de l'échantillon. Les comptes seront ensuite normalisés par le nombre total de reads.

La diversité Alpha qui mesure la richesse de l'échantillon sera estimée pour chaque échantillon à l'aide des indices de Shannon ou Simpson. La comparaison de l'ensemble des indices entre J0 et M3 sera réalisée à l'aide d'un t-test.

L'objectif principal est de comparer la composition du microbiote fécal avant et 3 mois après l'initiation du traitement par anti TNF alpha.

Dans un premier temps, la diversité Béta qui permet de comparer la variation de composition entre plusieurs communautés sera étudiée à l'aide de différentes mesures de dissimilarités comme la distance de Jaccard et la distance Unifrac. A partir de ces distances, des analyses exploratoires telles que PCoA (ou MDS) ou des analyses de clustering seront effectuées. Puis, une analyse à l'aide la méthode PERMANOVA sera présentée.

Dans un second temps, pour chaque nœud de l'arbre phylogénétique, la comparaison se fera à l'aide du modèle ZIBR (two-part Zero Inflated Beta Regression model with random effects) (1). La multiplicité des tests sera prise en compte en ajustant la p.value à l'aide du False Discovery Rate (Benjamini et Hochberg).

De plus, l'analyse décrite précédement sera aussi réalisée au sein de chaque sous-groupe (MC, RCH, SpA).

11.3.5. CRITERES DE JUGEMENTS SECONDAIRES

1) Une comparaison du microbiote fécal à J0 d'une part puis à M3 d'autre part entre les patients traités par anti-TNF alpha et les patients recevant un autre traitement sera réalisée à l'aide de la méthode ALDEx2, ANOVA-like Differential Expression tool for compositional data (45).
   Les résultats ainsi obtenus seront comparés à ceux issus d'une méthode de sélection de variables (46).

2) Pour chaque nœud taxonomique ayant eu une modification significative entre J0 et M3 , l'association entre la modification de ce noeud entre J0 et M3 et la réponse clinique d'une part puis le ratio Th17/Treg et les profils de COVs d'autre part sera modélisée à l'aide du modèle

ZIBR. La multiplicité des tests sera prise en compte en ajustant la p.value à l'aide du False Discovery Rate (Benjamini et Hochberg).

3) Au sein du groupe RCH et au sein de chaque traitement (anti-TNF alpha ou autre traitement), pour chaque nœud taxonomique ayant eu une modification significative entre J0 et M3, l'association entre les modifications du microbiote intestinal fécal et :

   - les aspects endoscopiques,
   - l'histologie digestive

   sera modélisée à l'aide du modèle ZIBR. La multiplicité des tests sera prise en compte en ajustant la p.value à l'aide du False Discovery Rate (Benjamini et Hochberg).

4) Afin d'identifier les modifications du microbiote fécal avant/après traitement spécifiques de l'anti-TNF alpha, la même analyse que celle décrite pour l'objectif principal ainsi que l'analyse en sous-groupe de l'évolution de chaque nœud taxonomique seront réalisées sur les microbiotes des patients ayant pris un autre traitement que l'anti-TNF alpha.

Un plan d'analyse statistique détaillé sera défini et fera l'objet d'une validation par le Conseil Scientifique de l'étude ainsi que toutes modifications ultérieures.

12. SURVEILLANCE DE LA RECHERCHE

12.1. CONSEIL SCIENTIFIQUE

12.1.1. COMPOSITION

Il est composé des personnes suivantes : Dr Pauline Rivière (Présidente), Dr Thomas Bazin, les investigateurs des centres associés, le Pr Frank Zerbib, le Pr David Laharie, le Pr Thierry Schaeverbeke, le Dr Isabelle Pellegrin (CRB), le Dr Geneviève Bellannée (anatomo-pathologiste à l'hôpital Haut-Lévêque), le Dr Claire Larmonier (GRIC), le Dr Thomas Barnetche (bioexpert), le Dr Macha Nikolski (bioinformatique), le Pr Rodolphe Thiébaut (méthodologiste), Hélène Savel (statisticienne) et d'un représentant du Promoteur.

12.1.2. RYTHME DES REUNIONS

Le Conseil Scientifique de la recherche se réunit selon les besoins de l'étude et au moins une fois par an pendant la durée de l'étude.

12.1.3. ROLE

- Il a pour mission de prendre toute décision importante à la demande de l'investigateur principal concernant la bonne marche de la recherche et le respect du protocole.
- Il vérifie le respect de l'éthique.
- Il s'informe auprès du Centre de Méthodologie et de Gestion des données et du centre investigateur coordonnateur de la recherche de l'état d'avancement de la recherche, des problèmes éventuels et des résultats disponibles.
- Il décide de toute modification pertinente du protocole nécessaire à la poursuite de la recherche, notamment :
    - les mesures permettant de faciliter le recrutement dans la recherche,
    - les modifications au protocole avant leur présentation au CPP
    - les décisions d'ouvrir ou de fermer des sites participant à la recherche,
    - les mesures qui assurent aux personnes participant à la recherche la meilleure sécurité (dont modification des documents d'information et de recueil de consentement),
    - la discussion des résultats et la stratégie de publication de ces résultats.
- Le Conseil Scientifique peut proposer de prolonger ou d'interrompre la recherche en cas de rythme d'inclusion trop lent, d'un trop grand nombre de perdus de vue, de violations majeures du protocole ou bien pour des raisons médicales et/ou administratives. Il précise les modalités éventuelles du suivi prolongé des participants inclus dans la recherche.
- S'il est proposé de réaliser de nouvelles recherches biologiques à partir du matériel de la recherche par les personnes y participant et lorsqu'elles n'ont pas été prévues par le protocole, le Conseil Scientifique les étudie et définit les conditions d'information des participants, d'accès aux données et les règles de publication des résultats.
- A l'issue de la réunion, le président du Conseil Scientifique doit informer le Promoteur des décisions arrêtées. Les décisions concernant une modification majeure ou une modification de budget doivent être approuvées par le Promoteur.

13. DROITS D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE

13.1. ACCES AUX DONNEES

L'acceptation de la participation au protocole implique que les investigateurs mettront à disposition les documents et données individuelles strictement nécessaires au suivi, au contrôle qualité et à l'audit de la recherche, à la disposition des personnes ayant un accès à ces documents conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

13.2. DONNEES SOURCES

Ensemble des informations figurant dans des documents originaux, ou dans des copies authentifiées de ces documents, relatif aux examens cliniques, aux observations ou à d'autres activités menées dans le cadre d'une recherche et nécessaires à la reconstitution et à l'évaluation de la recherche. Les documents dans lesquels les données sources sont enregistrées sont appelés les documents sources.

13.3. CONFIDENTIALITE DES DONNEES

Conformément aux dispositions législatives en vigueur, les personnes ayant un accès direct aux données source prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux recherches, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel.

Pendant la recherche ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises au promoteur par les investigateurs (ou tout autre intervenant spécialisé) seront rendues anonymes. Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse.

Chaque participant se verra attribuer un code confidentiel d'identification, composé du numéro de centre investigateur (2 chiffres) et d'un numéro de patient (2 chiffres) et d'un code lettre (4 lettres) anonyme.

Le promoteur s'assurera que chaque personne qui se prête à la recherche a donné son consentement pour l'accès aux données individuelles la concernant et strictement nécessaires au contrôle de qualité de la recherche.

14. CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE

14.1. CONSIGNES POUR LE RECUEIL DES DONNEES

Toutes les informations requises par le protocole doivent être consignées sur les cahiers d'observation papier ou électronique, et une explication doit être apportée pour chaque donnée manquante. Les données doivent être recueillies au fur et à mesure qu'elles sont obtenues, et transcrites dans ces cahiers de façon nette et lisible.

Les données sont recueillies sur un cahier d'observation papier.

14.2. CONTROLE DE QUALITE

Un attaché de recherche clinique mandaté par le Promoteur visite de façon régulière chaque centre investigateur, lors de la mise en place de la recherche, une ou plusieurs fois en cours de recherche selon le rythme des inclusions et en fin de recherche. Lors de ces visites, et conformément au plan de monitorage, les éléments suivants seront revus :

- consentement éclairé,
- respect du protocole de la recherche, des procédures qui y sont
- qualité des données recueillies dans le cahier d'observation : complétude, exactitude, données manquantes, cohérence des données avec les documents sources (dossiers médicaux, carnets de rendez-vous, originaux des résultats de laboratoire, etc,…),
- gestion des prélèvements.

Toute visite fera l'objet d'un rapport de monitorage par compte-rendu écrit.

14.3. GESTION DES DONNEES

14.3.1. LOGICIEL ET HEBERGEMENT DES DONNEES

14.3.1.1. LOGICIEL UTILISE

Les logiciels utilisés pour la gestion des données sont SQL server et SAS.

14.3.1.2. HEBERGEMENT DES DONNEES

Les données sont stockées sur un serveur dédié, géré par le CREDIM (**Centre de Recherche et Développement en Informatique Médicale**), prestataire informatique dédié. Le logiciel utilisé est SQL server.

14.3.1.3. SECURITE DES DONNEES

Le serveur se trouve dans une pièce dédiée, sans fenêtre. L'entrée dans le local sécurisé se fait au moyen d'un badge. Les portes du service sont sécurisées et fermées à clé le soir. Aucun ordinateur n'est en accès libre, l'authentification sur domaine est obligatoire.

La gestion des droits d'accès est gérée par le CREDIM conjointement avec le CMG pour les études du service.

14.3.2. CREATION DU CAHIER D'OBSERVATION

Le Cahier d'Observation (CO) est initié par l'équipe investigatrice via le CO standard présent sur le SharePoint du CHU de Bordeaux. Des échanges par mail ou des réunions physiques sont ensuite réalisés pour amener le CO en version validée (1.0). Cette validation est réalisée par le Data Manager une fois que l'équipe projet USMR (Biostatisticien, Méthodologiste et Data Manager) et l'équipe investigatrice sont en accord.

14.3.3. SAISIE DES DONNEES

La saisie des données dans le CO est sous la responsabilité de l'investigateur du centre. Le codage des champs nécessaires à la future saisie est réalisé par l'ARC du service. La saisie informatique des données est réalisée en double saisie sans codage ni interprétation des informations. La première saisie est réalisée avec le logiciel EpiData, la seconde saisie avec confrontation est effectuée avec un logiciel nommé DBS par un opérateur différent. La double saisie est réalisée par l'atelier de dactylo-codage de l'Université de Bordeaux.

14.3.4. DROIT D'ACCES

Seuls les gestionnaires de la base, l'équipe projet du CMG et les auditeurs ont des droits d'accès directs à la base de données.

14.3.5. ROLES

L'équipe investigatrice est responsable des modifications sur les données. Aucun membre de l'équipe projet du CMG ne peut se substituer à elle pour la réalisation des corrections de données. Elle est également en charge du codage des événements indésirables et des traitements, sous responsabilité de l'investigateur. Le Data Manager est responsable de la gestion des demandes de correction, qu'il doit relancer régulièrement.

14.3.6. CODAGE DES DONNEES

Les traitements prescrits et les événements cliniques sont codés dans le CO afin de pouvoir effectuer le contrôle et l'analyse des données.

Les dictionnaires suivants sont utilisés pour le codage des termes médicaux :

- MedDRA (version en cours, niveau LLT) FR/US
- ATC

14.3.7. CONTROLES DES DONNEES

Des contrôles sont programmés afin de vérifier la cohérence et la complétude des données saisies dans la base de données. La liste des contrôles à mettre en place est définie conjointement entre l'investigateur coordonnateur et le CMG, dans le plan de validation des données de l'étude.

Les demandes de corrections sont réalisées et gérées par le Data Manager via le logiciel SAS. Elles sont transmises au centre investigateur via CIRRUS, plateforme d'échange de fichiers sécurisée. L'équipe investigatrice fait les corrections nécessaires à la résolution des demandes de corrections. Un rendez-vous est pris entre le Data Manager et l'ARC coordonnateur pour la réservation du poste de monitorage au sein du CMG qui est dédié exclusivement à la gestion des corrections.

14.3.8. RECONCILIATION DES BASES EI/EIG

Si nécessaire, le croisement des bases est effectué par l'Unité de Vigilance du CHU de Bordeaux selon la procédure en vigueur. Les réconciliations sont effectuées régulièrement selon un rythme défini par le Comité Indépendant de Surveillance. Le Data Manager est responsable de la transmission de la table des évènements indésirables à l'Unité de Vigilance. Les données sont exportées sous forme de fichier Excel qui est déposé sur la plateforme sécurisée CIRRUS.

14.3.9. GEL DE LA BASE DE DONNEES

La base de données sera gelée à la demande pour une analyse intermédiaire ou bien pour l'analyse finale. Le gel des données est réalisé conformément à la procédure en vigueur au CMG.

14.3.10. TRANSFERT DES DONNEES

Si nécessaire, le transfert de données peut être envisagé. Les transferts de données (envoi, réception) sont réalisés conformément à la procédure en vigueur au CMG et selon les formats souhaités en fonction des contraintes existantes. Pour des raisons de sécurité, les fichiers de données sont anonymisés puis transférés via la plateforme sécurisée CIRRUS.

14.3.11. ARCHIVAGE DE LA BASE DE DONNEES

L'archivage de la base de données est sous la responsabilité du promoteur de l'étude. Les données de l'étude restent stockées dans le serveur du CREDIM et une copie physique est conservée par le promoteur pour un délai en accord avec la réglementation en vigueur.

14.3.12. MANAGEMENT DE LA QUALITE

Les activités de l'équipe projet du CMG sont intégrées au système de management de la qualité du CMG. La gestion des non-conformités est assurée conformément à la procédure en vigueur au CMG.

14.4. AUDIT ET INSPECTION

Un audit peut être réalisé à tout moment par des personnes mandatées par le promoteur et indépendantes des personnes menant la recherche. Il a pour objectif de vérifier la sécurité des participants et le respect de leurs droits, le respect de la réglementation applicable et la fiabilité des données.

Une inspection peut également être diligentée par une autorité compétente (ANSM pour la France ou EMA dans le cadre d'un essai européen par exemple).

L'audit, aussi bien que l'inspection, pourront s'appliquer à tous les stades de la recherche, du développement du protocole à la publication des résultats et au classement des données utilisées ou produites dans le cadre de la recherche.

Les investigateurs acceptent de se conformer aux exigences du promoteur en ce qui concerne un audit et à l'autorité compétente pour une inspection de la recherche.

15. CONSIDERATIONS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES

15.1. CONFORMITE AUX TEXTES DE REFERENCE

Le promoteur et l'(es) investigateur(s) s'engagent à ce que cette recherche soit réalisée en conformité avec la loi n°2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine, ainsi qu'en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques (I.C.H. version 4 du 9 novembre 2016 et décision du 24 novembre 2006) et la déclaration d'Helsinki (qui peut être retrouvée dans sa version intégrale sur le site http://www.wma.net).

La recherche est conduite conformément au présent protocole. Hormis dans les situations d'urgence nécessitant la mise en place d'actes thérapeutiques précis, l'(es) investigateur(s) s'engage(nt) à respecter le protocole en tous points en particulier en ce qui concerne le recueil du consentement et la notification et le suivi des événements indésirables graves.

Cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP).

Le CHU de Bordeaux, promoteur de cette recherche, a souscrit un contrat d'assurance en responsabilité civile auprès de Gerling-Biomedicinsure conformément aux dispositions du code de la santé publique.

Les données enregistrées à l'occasion de cette recherche font l'objet d'un traitement informatisé au Centre de Méthodologie et de Gestion des données dans le respect de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés modifiée par la loi 2004-801 du 6 août 2004.

Cette recherche entre dans le cadre de la « Méthodologie de référence » (MR-001) en application des dispositions de l'article 54 alinéa 5 de la loi du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'information, aux fichiers et aux libertés. Ce changement a été homologué par décision du 5 janvier 2006, mise à jour le 21 juillet 2016. au Centre de Méthodologie et de Gestion des données a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de référence ».

Cette recherche est enregistrée sur le site http://clinicaltrials.gov/

Après la recherche, la conservation de la collection d'échantillons biologiques sera déclarée au ministre chargé de la recherche et au directeur de l'Agence Régionale de Santé (et soumise au CPP pour avis si changement de finalité de recherche).

MODIFICATIONS AU PROTOCOLE

Toute modification substantielle, c'est à dire toute modification de nature à avoir un impact significatif sur la protection des personnes, sur les conditions de validité et sur les résultats de la recherche, sur la qualité et la sécurité des produits expérimentés, sur l'interprétation des documents scientifiques qui viennent appuyer le déroulement de la recherche ou sur les modalités de conduite de celle-ci, fait l'objet d'un amendement écrit qui est soumis au promoteur ; celui-ci doit obtenir, préalablement à sa mise en œuvre, un avis favorable du CPP.

Les modifications non substantielles, c'est à dire celles n'ayant pas d'impact significatif sur quelque aspect de la recherche que ce soit, sont communiquées au CPP à titre d'information.

Toutes les modifications sont validées par le promoteur, et par tous les intervenants de la recherche concernés, avant soumission au CPP. Cette validation peut nécessiter la réunion du CS.

Toutes les modifications au protocole doivent être portées à la connaissance de tous les investigateurs qui participent à la recherche. Les investigateurs s'engagent à en respecter le contenu.

Toute modification qui modifie la prise en charge des participants ou les bénéfices, risques et contraintes de la recherche fait l'objet d'une nouvelle note d'information et d'un nouveau formulaire de consentement dont le recueil suit la même procédure que celle précitée.

16. CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

Les documents suivants relatifs à cette recherche sont archivés conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques et à la réglementation en vigueur :

- pour une durée de 15 ans suivant la fin de la recherche

- Le protocole et les modifications éventuelles au protocole
- Les cahiers d'observation (copies)
- Les dossiers source des participants ayant donné un consentement
- Tous les autres documents et courriers relatifs à la recherche

- pour une durée de 30 ans suivant la fin de la recherche

- L'exemplaire original des consentements éclairés signés des participants
- Les documents relatifs aux événements indésirables graves

Tous ces documents sont sous la responsabilité de l'investigateur pendant la durée réglementaire d'archivage.

Aucun déplacement ou destruction ne pourra être effectué sans l'accord du promoteur. Au terme de la durée réglementaire d'archivage, le promoteur sera consulté pour destruction. Toutes les données, tous les documents et rapports pourront faire l'objet d'audit ou d'inspection.

17. RAPPORT FINAL

Dans un délai d'un an suivant la fin de la recherche ou son interruption, un rapport final sera établi et signé par le promoteur et l'investigateur. Ce rapport sera tenu à la disposition de l'autorité compétente. Le promoteur transmettra à l'ANSM et au CPP les résultats de la recherche sous forme d'un résumé du rapport final dans un délai d'un an après la fin de la recherche.

18. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

18.1. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

L'analyse des données fournies par les centres investigateurs est réalisée par le Centre de Méthodologie et de Gestion des données. Cette analyse donne lieu à un rapport écrit qui est soumis au promoteur, qui transmettra au Comité de Protection des Personnes et à l'autorité compétente.

Toute communication écrite ou orale des résultats de la recherche doit recevoir l'accord préalable de l'investigateur coordonnateur et, le cas échéant, de tout comité constitué pour la recherche.

L'investigateur coordonnateur/principal s'engage à mettre à disposition du public les résultats de la recherche aussi bien négatifs et non concluants que positifs.

La publication des résultats principaux mentionne le nom du promoteur, de tous les investigateurs ayant inclus ou suivi des participants dans la recherche, des méthodologistes, biostatisticiens et data managers ayant participé à la recherche, des membres du(des) comité(s) constitué(s) pour la recherche et la participation éventuelle du laboratoire pharmaceutique et la source de financement. Il sera tenu compte des règles internationales d'écriture et de publication (The Uniform Requirements for Manuscripts de l'ICMJE, avril 2010).

18.2. COMMUNICATION DES RESULTATS AUX PARTICIPANTS

Conformément à la loi n°2002-303 du 4 mars 2002, les participants sont informés, à leur demande, des résultats globaux de la recherche.

18.3. CESSION DES DONNEES

La gestion des données est assurée par le Centre de Méthodologie et de Gestion des données. Les conditions de cession de tout ou partie de la base de données de la recherche sont décidées par le promoteur de la recherche et font l'objet d'un contrat écrit.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Chen EZ, Li H. A two-part mixed-effects model for analyzing longitudinal microbiome compositional data. Bioinforma Oxf Engl. 1 sept 2016;32(17):2611‑7.

2. Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Debelius J, Morton JT, Hyde E, et al. Correcting for Microbial Blooms in Fecal Samples during Room-Temperature Shipping. mSystems. avr 2017;2(2).

3. Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. Nucleic Acids Res. déc 2010;38(22):e200.

4. Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver. juill 2008;40 Suppl 2:S253-259.

5. Ciccia F, Rizzo A, Triolo G. Subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis. Curr Opin Rheumatol. janv 2016;28(1):89‑96.

6. Cypers H, Van Praet L, Varkas G, Elewaut D. Relevance of the gut/joint axis for the management of spondyloarthritis in daily clinical practice. Curr Opin Rheumatol. juill 2014;26(4):371‑6.

7. Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. Nat Med. 6 oct 2016;22(10):1079‑89.

8. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. Inflamm Bowel Dis. août 2009;15(8):1183‑9.

9. Duboc H, Rajca S, Rainteau D, Benarous D, Maubert M-A, Quervain E, et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. Gut. avr 2013;62(4):531‑9.

10. Nguyen HTT, Dalmasso G, Müller S, Carrière J, Seibold F, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent invasive Escherichia coli modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. Gastroenterology. févr 2014;146(2):508‑19.

11. Rajca S, Grondin V, Louis E, Vernier-Massouille G, Grimaud J-C, Bouhnik Y, et al. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. juin 2014;20(6):978‑86.

12. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham H-P, Jegou S, Landman C, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. Gut. 3 févr 2016;

13. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, et al. A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. Gut. août 2014;63(8):1275‑83.

14. Markar SR, Wiggins T, Kumar S, Hanna GB. Exhaled breath analysis for the diagnosis and assessment of endoluminal gastrointestinal diseases. J Clin Gastroenterol. janv 2015;49(1):1‑8.

15. HLA-B27 and risk of ankylosing spondylitis. Br Med J. 2 sept 1978;2(6138):650‑1.

16. Lin P, Bach M, Asquith M, Lee AY, Akileswaran L, Stauffer P, et al. HLA-B27 and human β2-microglobulin affect the gut microbiota of transgenic rats. PloS One. 2014;9(8):e105684.

17. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. J Exp Med. 1 déc 1994;180(6):2359‑64.

18. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE, Balish E, et al. Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. J Clin Invest. 15 août 1996;98(4):945‑53.

19. Stebbings S, Munro K, Simon MA, Tannock G, Highton J, Harmsen H, et al. Comparison of the faecal microflora of patients with ankylosing spondylitis and controls using molecular methods of analysis. Rheumatol Oxf Engl. déc 2002;41(12):1395‑401.

20. Costello M-E, Ciccia F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, et al. Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ. 21 nov 2014;

21. Luo A, Leach ST, Barres R, Hesson LB, Grimm MC, Simar D. The Microbiota and Epigenetic Regulation of T Helper 17/Regulatory T Cells: In Search of a Balanced Immune System. Front Immunol. 2017;8:417.

22. Xueyi L, Lina C, Zhenbiao W, Qing H, Qiang L, Zhu P. Levels of circulating Th17 cells and regulatory T cells in ankylosing spondylitis patients with an inadequate response to anti-TNF-α therapy. J Clin Immunol. janv 2013;33(1):151‑61.

23. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. Cytokine Growth Factor Rev. août 2014;25(4):453‑72.

24. Allez M, Karmiris K, Louis E, Van Assche G, Ben-Horin S, Klein A, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: definitions, frequency and pharmacological aspects. J Crohns Colitis. oct 2010;4(4):355‑66.

25. Moltó A, Paternotte S, Claudepierre P, Breban M, Dougados M. Effectiveness of tumor necrosis factor α blockers in early axial spondyloarthritis: data from the DESIR cohort. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ. juill 2014;66(7):1734‑44.

26. Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, Hiele MI, Schaible TF, Shealy D, et al. Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. Gastroenterology. janv 1999;116(1):22‑8.

27. Busquets D, Mas-de-Xaxars T, López-Siles M, Martínez-Medina M, Bahí A, Sàbat M, et al. Anti-tumour Necrosis Factor Treatment with Adalimumab Induces Changes in the Microbiota of Crohn's Disease. J Crohns Colitis. oct 2015;9(10):899‑906.

28. Magnusson MK, Strid H, Sapnara M, Lasson A, Bajor A, Ung K-A, et al. Anti-TNF Therapy Response in Patients with Ulcerative Colitis Is Associated with Colonic Antimicrobial Peptide Expression and Microbiota Composition. J Crohns Colitis. août 2016;10(8):943‑52.

29. Kolho K-L, Korpela K, Jaakkola T, Pichai MVA, Zoetendal EG, Salonen A, et al. Fecal Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease and Its Relation to Inflammation. Am J Gastroenterol. juin 2015;110(6):921‑30.

30. Lesouhaitier O, Veron W, Chapalain A, Madi A, Blier A-S, Dagorn A, et al. Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. Sensors. 2009;9(9):6967‑90.

31. Hughes DT, Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nat Rev Microbiol. févr 2008;6(2):111‑20.

32. Karavolos MH, Winzer K, Williams P, Khan CMA. Pathogen espionage: multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. Mol Microbiol. févr 2013;87(3):455‑65.

33. Karavolos MH, Khan CMA. Multidirectional chemical signalling between Mammalian hosts, resident microbiota, and invasive pathogens: neuroendocrine hormone-induced changes in bacterial gene expression. Adv Exp Med Biol. 2014;817:241‑53.

34. Luo G, Niesel DW, Shaban RA, Grimm EA, Klimpel GR. Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. Infect Immun. mars 1993;61(3):830‑5.

35. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. Gut. janv 2016;65(1):57‑62.

36. Soeta N, Terashima M, Gotoh M, Mori S, Nishiyama K, Ishioka K, et al. An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. J Med Microbiol. août 2009;58(Pt 8):1037‑44.

37. Sinclair L, Osman OA, Bertilsson S, Eiler A. Microbial Community Composition and Diversity via 16S rRNA Gene Amplicons: Evaluating the Illumina Platform. PLoS ONE [Internet]. 3 févr 2015 [cité 14 avr 2016];10(2). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4315398/

38. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 28 oct 2008;105(43):16731‑6.

39. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. avr 2010;8(4):357‑63.

40. Lewis JD, Chuai S, Nessel L, Lichtenstein GR, Aberra FN, Ellenberg JH. Use of the Non-invasive Components of the Mayo Score to Assess Clinical Response in Ulcerative Colitis. Inflamm Bowel Dis. déc 2008;14(12):1660‑6.

41. Braun J, Kiltz U, Baraliakos X, van der Heijde D. Optimisation of rheumatology assessments - the actual situation in axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis. Clin Exp Rheumatol. oct 2014;32(5 Suppl 85):S-96-104.

42. Colombel J-F, Ordás I, Ullman T, Rutgeerts P, Chai A, O'Byrne S, et al. Agreement Between Rectosigmoidoscopy and Colonoscopy Analyses of Disease Activity and Healing in Patients With Ulcerative Colitis. Gastroenterology. févr 2016;150(2):389-395.e3.

43. Mosli MH, Feagan BG, Zou G, Sandborn WJ, D'Haens G, Khanna R, et al. Reproducibility of histological assessments of disease activity in UC. Gut. nov 2015;64(11):1765‑73.

44. Kelly BJ, Gross R, Bittinger K, Sherrill-Mix S, Lewis JD, Collman RG, et al. Power and sample-size estimation for microbiome studies using pairwise distances and PERMANOVA. Bioinforma Oxf Engl. 1 août 2015;31(15):2461‑8.

45. Fernandes AD, Reid JN, Macklaim JM, McMurrough TA, Edgell DR, Gloor GB. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. Microbiome. 2014;2:15.

46. Shankar J, Szpakowski S, Solis NV, Mounaud S, Liu H, Losada L, et al. A systematic evaluation of high-dimensional, ensemble-based regression for exploring large model spaces in microbiome analyses. BMC Bioinformatics. 1 févr 2015;16:31.