



HAL
open science

Impact de la réponse IgA dans une nouvelle stratégie de vaccination muqueuse contre *Salmonella* et dans la régulation de la réponse adaptative

Rémi Gayet

► To cite this version:

Rémi Gayet. Impact de la réponse IgA dans une nouvelle stratégie de vaccination muqueuse contre *Salmonella* et dans la régulation de la réponse adaptative. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSES015 . tel-02172032

HAL Id: tel-02172032

<https://theses.hal.science/tel-02172032>

Submitted on 3 Jul 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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSES015

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
Université Jean-Monnet

Ecole Doctorale N° EDSIS488
(Ecole doctorale Science, Ingénierie, Santé)

Spécialité de doctorat : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Discipline : (Biologie, médecine et Santé)

Soutenue publiquement le 12/07/2018, par :

Rémi Gayet

Impact de la réponse IgA dans une nouvelle stratégie de vaccination muqueuse contre *Salmonella* et dans la régulation de la réponse adaptative

Devant le jury composé de :

Pr. BOURLET Thomas	Université Jean-Monnet/GIMAP-EA3064	Président
Dr DE LUCA Karelle	Université Claude Bernard Lyon 1/ Boehringer Ingelheim	Rapporteure
Dr DUBOIS Bertrand	Université Claude Bernard Lyon 1/ U1052	Rapporteur
Dr ANJUERE Fabienne	Université Nice-Sophia-Antipolis /UMR7275 (IPMC)	Examinatrice
Pr. PAUL Stéphane	Université Jean-Monnet/ GIMAP EA3064	Directeur de thèse
Dr CORTHESEY Blaise	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois/ Division of immunology and Allergy	Co-directeur de thèse

The definition of insanity is doing the same thing over and over and expecting different results.

– Albert Einstein

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Table des matières	ii
Remerciements.....	v
Abréviations.....	viii
Liste des illustrations	xi
Résumé	xv
Introduction.....	1
Chapitre I : Les immunoglobulines A, plaque tournante pleine de mystère de la réponse muqueuse	1
I/ Mécanismes de la réponse immunitaire muqueuse	1
II/ Production et localisation des IgA	10
III/ La fonction des IgA1 et IgA2 : Balance entre tolérance et inflammation....	20
Chapitre II : L'IgA : vecteur vaccinal muqueux.....	28
I/ Les différents vaccins muqueux	28
II/ L'IgA : Le moïse de la vaccination muqueuse ?	34
III/ Les IgM : vecteur vaccinal alternatif ou complémentaire des IgA.....	35
Chapitre III : Salmonella comme challenge pour la vaccination muqueuse .	37
I/ Différentes souches pour différentes pathologies	37
II/ La prise en charge des patients... ..	42
III/ Épidémiologie	45
IV/ L'apparition de souches multi-résistantes	51
Chapitre IV : Les obstacles à la vaccination contre Salmonella	55
I/ Différences entre ST et SNT	55

II/ Mode d'action de <i>Salmonella</i> lors de l'infection	57
III/ Réponse immunitaire contre <i>Salmonella</i> : L'importance des cytokines et des IgA	60
IV/ Échappement aux réponses immunitaires par <i>Salmonella</i>	63
V/ Choix des antigènes et de l'adjuvant : induire la réponse la plus adaptée	64
Objectifs et problématiques	67
Matériels et Méthodes	71
Chapitre V : L'impact de la structure des IgA sur leur capacité à activer la réponse immunitaire adaptative	85
Article et résumé	85
Conclusions et perspectives	123
Chapitre VI : Étude d'une nouvelle stratégie vaccinale contre <i>Salmonella</i>	126
Préambule	126
Article et résumé	130
Conclusions et perspectives	150
Discussion générale	156
Conclusion générale.....	163
Index	165
Annexe I : Revue sur <i>Salmonella</i>	165
Annexe II : Revue sur les MICI.....	192
Travaux annexes.....	199
Référence bibliographiqu	233

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les Docteurs Karelle De Luca et Bertrand Dubois d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci également au Docteur Fabienne Anjuere pour avoir pris le temps d'examiner mon mémoire de thèse. Merci au Professeur Thomas Bourlet pour la présidence de ce jury et pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du laboratoire GIMAP-EA3064 dont il est le Directeur.

Je remercie la région Rhône-Alpes, en particulier l'ARC1 pour m'avoir octroyé une bourse et donc permis le financement de ma thèse. Je remercie aussi Pfizer pour son soutien financier ayant permis d'initier mes travaux. Merci également à MSD qui a permis le financement de ma 4^{ème} année de thèse et donc de finaliser mes travaux. Enfin, je remercie l'Université de Lyon, l'Université Jean Monnet et l'école doctorale EDSIS 488 pour leur soutien logistique, leur suivi et la gestion administrative de ma thèse. Merci aussi au Plexan, notamment Priscilla et Ghislaine pour leur aide pour les phases animales.

Je remercie mon Directeur de thèse, le Docteur Stéphane Paul, pour ses conseils et la confiance qu'il m'a accordée durant mes 4 années de thèse ainsi que pour la valorisation de mes travaux de thèse qu'il a su apporter. Nos discussions m'ont conduit à grandir aussi bien professionnellement que personnellement. Je remercie également mon co-Directeur de thèse, le Docteur Blaise Corthésy, qui m'a accueilli plusieurs mois dans son laboratoire Division of immunology and Allergy de Lausanne. Nos échanges m'ont permis d'acquérir plus de maturité scientifique durant les années enrichissantes de ma thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Gilles Bioley qui, n'ayant aucune obligation d'apporter son aide, a rendu mon travail de thèse réalisable dans le temps imparti. Ses corrections, ses conseils techniques et scientifiques extrêmement pertinents et constructifs m'ont été d'une aide inestimable.

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes ayant contribué à ma formation avant la thèse et qui m'ont préparé à mon avenir professionnel. Je pense à mes maîtres de stage à savoir Hélène Valentin, Stéphanie Blandin, Marie-Cécile Michallet et Laurent Genestier mais j'ai aussi une pensée tout particulière pour Ludo, qui m'avait montré comment s'occuper d'un intestin de souris, comment prélever des plaques de Peyer, les ganglions mésentériques et avec qui j'avais beaucoup échangé dans la bonne humeur qu'il dégageait. La disparition de cette belle personne a été un tournant de ma thèse, me permettant de relativiser sur l'importance que l'on accorde à certaines choses. Merci aux personnes qui m'ont aidé durant ma thèse comme Justine en Suisse, Zhiguo pour le confocal, Mireille pour les puces à ARN, Christophe pour la thermophorèse.

Merci à tous les membres du laboratoire GIMAP-EA3064 qui ont su me dérider et rendre les moments difficiles plus légers à supporter. Merci à Charles-Antoine de m'avoir endurci, Marie-Ange pour son entièreté qui fait du bien, aux techniciennes sans qui ce travail rigoureux n'aurait pas été possible et aurait clairement eu moins de saveur : Fabienne pour sa gentillesse et son aide indéfectible et Blandine pour son énergie communicative (en plus d'être une bonne mère). Merci à Nico, Alex (le vrai), Amélie (I^{ère}), Sofiane, Adrien, Caroline, Perinne, Hind, Fabrice, Fedy, Amélie (II), Estelle, Sana, Jocelyn, Sophie, Alice, Sylvie, Paul, Olivier, Séverine et Benji la malice.

Merci à mes collègues de bureau qui ont supporté mes TOCs. Grâce à la pétillante Eva, j'ai pu apprécier les points cultures et créer un nouvel univers Science/Potter/Disney. Merci à Alex, pour sa bonne humeur en toute circonstance et nos parties de bad que je lui laissais gagner. Merci à Martichou pour ses phrases qui sont à chaque fois un enchantement et resteront à jamais gravées dans ma mémoire.

Un très grand merci à mes beaux-parents. Merci Didier pour votre générosité, votre altruisme et merci Marie-Pierre pour votre gentillesse et votre bienveillance, me permettant des week-ends de repos réparateur durant ma thèse par votre accueil chaleureux.

Merci à mes amis Nico, Claire, Julie, Marine qui m'ont soutenu et donné des instants d'accalmie. En particulier, merci à toi P.H., ma fricassée d'abats d'agneau au miel qui a toujours été là quand j'en avais besoin. En plus, en tant qu'ami/frère, tu vas me permettre de faire le lien avec le paragraphe « famille », ça c'est de la qualité !

Merci à ma famille. Mes grands-mères qui sont remplies d'amour et une grosse pensée pour mon grand-père qui restera un modèle. Je remercie ma soeurette tout simplement d'être comme elle est, c'est comme ça que je l'aime. Merci à toi mon papa poule qui m'aide à être meilleur chaque jour. Merci à toi, La Mère, la seule la vraie, entité toute puissante qui garde un œil protecteur et bienveillant sur ses ouailles. Des parents présents, aimants à qui je dois d'être ce que je suis aujourd'hui : j'espère que vous serez aussi fier de moi que je suis fier d'être votre fils.

Et je dédie ma thèse à ma petite femme chérie. Tout le travail que j'ai pu réaliser, je l'ai fait par amour de la science mais surtout pour toi ma puce, pour nous garantir un avenir serein, dans lequel nous pourrions élever nos petits pucerons. Même si on pourrait penser que je suis exempt de tout défaut, c'est loin d'être vrai. Tu es bien placée pour le savoir et je suis plus qu'heureux d'avoir quelqu'un à mes côtés qui m'aime et me supporte à n'importe quel moment.

ABBREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
Ag	Antigène
AMIS	Antibodies-mediated immuno-selection
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CD	Cluster of differentiation
Cellule M	Cellule Microfoldée
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CXCL	C-X-C chemokine ligand
CXCR	C-X-C chemokine receptor
DC	Cellules dendritiques
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
FAE	Épithélium associé au follicule
FcαRI	Fc fragment of IgA receptor I
GALT	Tissu lymphoïde associé au tube digestif
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
IEC	Cellules épithéliales intestinales
IFN	Interféron
Ig (SIg)	Immunoglobuline (sécrétoire)
IL	Interleukine
ILC	Innate Lymphoid cells
ITAM	Motif d'Activation des récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine
LB et LT	Lymphocyte B et T
LPS	Lipopolysaccharide
LTh	Lymphocyte T helper
LTreg	Lymphocyte T régulateur
m/dIgA	IgA Monomérique/dimérique
MALT	Tissu lymphoïde des muqueuses
MDR	Souche multi-résistante
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MLN	Ganglions mésentériques
MV	Vaccin multivalent
NALT	Tissu lymphoïde nasal

NET	Neutrophil extracellular traps
NFκB	Nuclear Factor κ B
NS	Non stimulé
Omp	Outer membrane protein
OMV	Vésicules de membrane externe
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBMC	Cellule mononucléée sanguine périphérique
PMB	Polymyxine B
PP	Plaque de Peyer
PRR	Pattern recognition receptors
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT	Température ambiante
S. X	<i>Salmonella enterica</i> sous-espèce <i>enterica</i> sérovar X

SED	Dôme sous épithélial
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNT	<i>Salmonella</i> non typhoïdiques
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
SseB	Secretion system effector B
ST	<i>Salmonella</i> typhoïdiques
TD	Voie thymo-dépendante
TI	Voie thymo-indépendante
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TXSS	Système de sécrétion de type X
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Fonction des cellules composant la muqueuse intestinale.	2
Figure 2: Le rôle des follicules lymphoïdes isolés (ILF) reste peu connu mais il est lié à la production d'immunoglobulines.	4
Figure 3: Les plaques de Peyer sont les sites inducteurs principaux de la réponse immunitaire muqueuse après l'entrée d'un antigène.	5
Figure 4: Différentes populations de DC pour différentes voies d'activation de la réponse immunitaire.	8
Figure 5: Les IgA1 et IgA2 présentent des profils de glycosylation différents.	12
Figure 6: Résumé de la mise en place de la réponse humorale à IgA thymo-dépendante dans la muqueuse intestinale.	14
Figure 7: L'activation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'Ig.	15
Figure 8: Les quatre principaux récepteurs aux IgA.	20
Figure 9: Modèle de réponse inflammatoire soulignant la coopération entre les TLR et le FcαRI.	22
Figure 10: Modèle de réponse des IgA sécrétoires aux agents pathogènes ou commensaux.	25
Figure 11: Rôle protecteur des neutrophiles dans la fonction des IgA.	27
Figure 12: Résumé des fonctions protectrices des IgA dans la muqueuse intestinale.	28
Figure 13: Les différentes voies d'administration muqueuses et leurs sites immunitaires inducteurs associés.	33
Figure 14: Distribution des cas de fièvre typhoïde dans le monde en 2014.	47
Figure 15: Les Salmonella typhoïdiques représentent 1% de la mortalité mondiale en 2012, sans distinction entre les sexes.	47
Figure 16: Les 20 sérovars de Salmonella non-typhoïdiques les plus communs sont capables d'infecter un grand nombre d'espèce animale (2006).	49

Figure 17: Distribution des cas de gastroentérites induites par les Salmonella invasives non-typhoïdiques dans le monde en 2014.....	50
Figure 18 : Plusieurs pays sont concernés par l'apparition de souches de Salmonella typhoïdiques MDR.	53
Figure 19: Le microbiote intestinal est modifié durant une infection par S. Typhimurium chez la souris.	59
Figure 20: A l'image de S. Typhimurium, la famille Salmonella exprime de nombreux facteurs permettant leur interaction avec les cellules cibles.	60
Figure 21: Les mécanismes principaux de l'immunité protectrice des muqueuses.	62
Figure 22: Salmonella inhibe la plupart des fonctions effectrices normalement induites par les cellules de l'immunité innée (gauche) mais aussi adaptative (droite) lors de l'infection par la bactérie.	63
Figure 23: Schéma bilan des principaux objectifs de cette thèse.....	70
Figure 24: Identification des cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC) par cytométrie en flux.....	76
Figure 25: Identification des sous population de DC intestinales de souris par cytométrie en flux.	77
Figure 26: Stratégie de fenêtrage de la population des cellules de langerhans en cytométrie en flux.....	78
Figure 27 : Western blot confirmant la digestion enzymatique des IgA par la papaine.	80
Figure 28: Modélisation théorique de la courbe de croissance de Salmonella enterica Typhimurium SL1344.	82
Figure 29: Purification des protéines SseB et OmpC.....	127
Figure 30: L'infection de souris par S. Typhimurium induit les mêmes effets que celle de l'Homme par S. Typhi.	129

Figure 31: La complexation de Salmonella avec des IgA spécifiques de la bactérie limite l'infection de cellules intestinales humaines.....	151
Figure 32: L'activation des cellules par SseB nécessite l'expression des TLR4 et 2..	153
Figure 33: SIgA-SseB active des cellules dendritiques humaines.....	155
Table 1: Récapitulatif des cellules, récepteurs et facteurs solubles impliqués dans la commutation isotypique des LB vers des LB IgA⁺ dans les muqueuses.....	17
Table 2: Répartition des isotypes et isoforms des IgA en fonction de leur localisation	18
Table 3: Vaccins muqueux licenciés en 2017.....	30
Table 4 : De nombreuses souches de Salmonella non-typhoïdiques ont été reportées avec des multi-résistances aux antibiotiques en Afrique, notamment au Nigéria en 2016.	52
Table 5: Les MDR des Salmonella typhoïdiques ne possèdent pas forcément le même profil de résistance pour des pays situés dans une même zone géographique, ici en Asie du Sud-Est.	53
Table 6: Principaux vaccins contre S. Typhi en développement en 2014.....	65
Table 7: Principaux vaccins contre S. Typhimurium en développement en 2014.	65
Table 8: Entérotoxines utilisées comme adjuvants muqueux et leurs effets.....	66
Table 9: Fiche de suivi clinique appliquée aux souris infectées par S. Typhimurium.	83
Table 10: Récapitulatif des expériences d'immunisation chez la souris avec les candidats vaccins.....	152

RESUME

Les entérobactéries *Salmonella* espèce *enterica* sous-espèce *enterica* sont divisées en plusieurs sérovars dont les quatre principaux sont Typhimurium, Enteritidis, Typhi et Paratyphi. Ces sérovars sont responsables soit de gastroentérites soit de fièvres typhoïdes, à raison de plus de 90 millions de cas et 400 000 décès par an. Bien que des traitements antibiotiques existent, l'apparition de souches multi-résistantes les rend peu à peu caduques. La vaccination prophylactique contre des pathogènes responsables de maladies entériques est à ce jour peu utilisée du fait de la faible efficacité d'une vaccination parentérale et des limitations induites par les contraintes d'une administration par voie orale. Cette dernière nécessite en effet l'utilisation d'une grande quantité d'antigènes et/ou de processus protégeant les antigènes des conditions destructrices du tractus digestif. L'environnement intestinal est aussi caractérisé par une balance entre tolérance immunitaire et réaction inflammatoire régulée en partie par les immunoglobulines (Ig) M et surtout par les IgA sécrétoires. Alors que les IgM sont principalement retrouvées sous forme pentamérique, les IgA des sécrétions muqueuses sont dimériques. Elles sont aussi rencontrées dans le sérum, alors présentes sous forme monomérique. Les IgA sont des anticorps pour lesquels deux isotypes ont été décrits chez l'Homme: IgA1 et IgA2.

Le premier but de ce travail de thèse a été d'explorer les fonctions des différents isotypes et isoformes des IgA humaines. Nous avons ainsi pu confirmer le rôle anti-inflammatoire des IgA1 monomériques. Par ailleurs, nos travaux ont mis en évidence un fort potentiel anti-inflammatoire des IgA1 dimériques à l'inverse des IgA2 dimériques qui induisent une réponse pro-inflammatoire. Enfin, nous avons souligné pour la première fois un processus de régulation de l'expression des récepteurs aux IgA par les IgA elles-mêmes

ainsi qu'un axe IgA/lymphocytes T CD8 cytotoxiques qui pourrait être impliqué dans l'homéostasie de l'intestin IgA-dépendante.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse a consisté à mettre en place un vaccin multivalent composé d'antigènes de *Salmonella* liés à des IgA sécrétoires. Le principe étant de transporter des antigènes partagés par différents sérovars le long du tractus gastro-intestinal et de les délivrer spécifiquement par voie orale au système immunitaire muqueux afin d'induire une protection. Cette étude a mis en évidence une très faible immunogénicité induite par le passage des IgA couplées à la protéine SseB au niveau intestinal chez la souris. En revanche, une solide réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique à SseB a été identifiée après vaccination intra-nasale aussi bien dans le compartiment systémique que muqueux. Par ailleurs, une plus forte sécrétion d'anticorps spécifiques et de cytokines ainsi qu'une plus forte prolifération de lymphocytes T a été observée en couplant à la fois les antigènes OmpC et SseB sur l'IgA sous forme de vaccin multivalent. Ces données suggèrent donc l'utilisation de l'IgA comme vecteur vaccinal nasal pour un vaccin multivalent muqueux. Enfin, une meilleure réponse vaccinale ayant été observée avec une IgM comme vecteur vaccinal, cela suggère que cette dernière pourrait être encore plus efficace.

Ce travail de thèse ouvre de nouvelles perspectives pour la mise en place de vaccins muqueux et pour l'utilisation d'anticorps comme vecteurs. Notamment, la réponse recherchée pourrait être induite en fonction de l'isoforme ou de l'isotype de l'anticorps utilisé. Enfin, cette variation de réponse suivant la conformation de l'IgA pourrait apporter de nombreuses réponses quant à leurs rôles dans les muqueuses.

INTRODUCTION

*Chapitre I : Les immunoglobulines A, plaque tournante
pleine de mystère de la réponse muqueuse*

I/ MECANISMES DE LA REPOSE IMMUNITAIRE MUQUEUSE

Cette thèse a pour objectif premier d'étudier l'impact des immunoglobulines A (IgA) dans la réponse immunitaire muqueuse. Il est donc nécessaire de comprendre les fonctions de la muqueuse qui font de ces tissus un environnement délicat à appréhender, en particulier pour la vaccination.

A) Les muqueuses

Les muqueuses sont des tissus épithéliaux en continuité avec la peau – donc directement en contact avec le milieu extérieur – et dont la fonction principale est de protéger les organes internes. Elles sont présentes au sein du tube digestif, de l'appareil respiratoire et de l'appareil uro-génital. Les muqueuses sont plus perméables à l'eau que la peau. Les muqueuses ont une première fonction de protection mécanique et chimique contre les agressions de l'environnement extérieur. Ainsi, une couche de cellules épithéliales, comme par exemple les cellules épithéliales intestinales (IEC), crée une barrière physique grâce à des jonctions serrées ou des jonctions adhésives, limitant le transport passif de certains éléments vers le tissu conjonctif sous épithélial appelé *lamina propria* (1) (2). La définition de la barrière épithéliale ne se limite pas à l'existence de ce mécanisme puisque de nombreux acteurs la composent (**Figure 1**). On y trouve notamment des entérocytes composant la majorité des IEC mais aussi des cellules sécrétrices de mucus, principalement composé de mucine. Le mucus tapisse la surface des muqueuses et limite leur invasion par des agents pathogènes comme *Salmonella* (3).

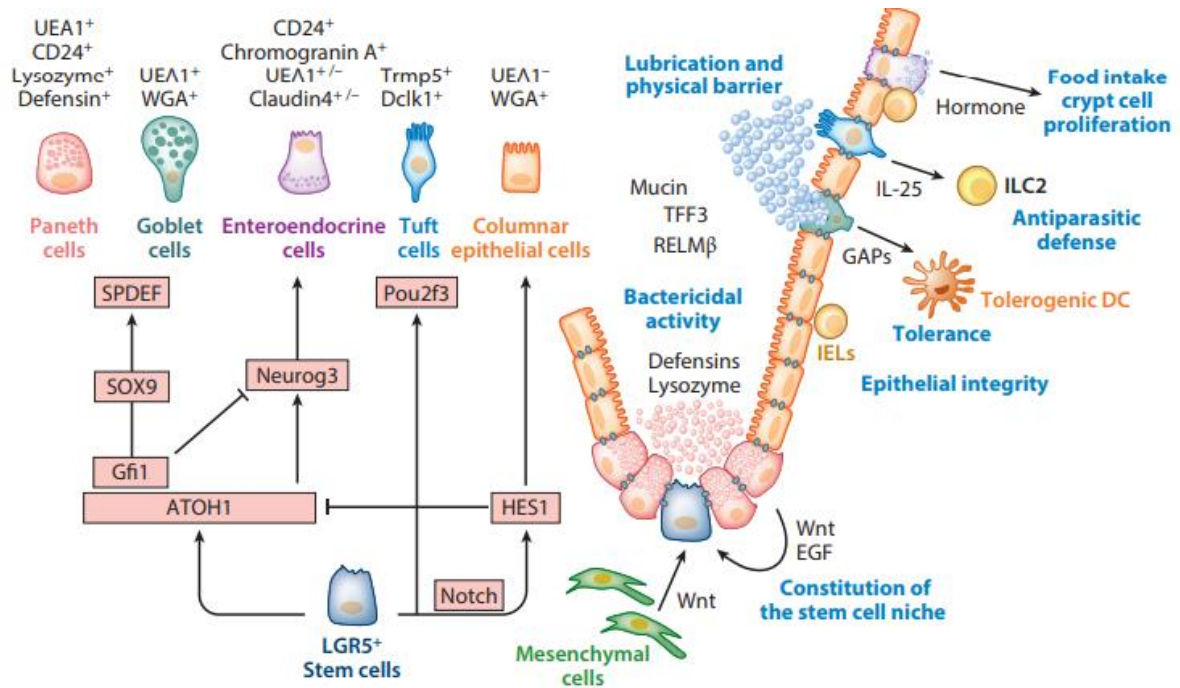


Figure 1: Fonction des cellules composant la muqueuse intestinale.

Les cellules épithéliales intestinales (IEC) dérivent toutes d'une cellule souche LGR5⁺ située dans les cryptes intestinales. Les entérocytes sécrétoires sont composés (i) des cellules de Paneth sécrétrices de peptides antimicrobiens tels que les défensines ou le lysozyme, (ii) de cellules caliciformes (goblet cells) produisant le mucus, (iii) de cellules entéroendocrines sécrétrices d'hormones. Les cellules « Tuft » sécrètent de l'IL-25 pour stimuler la protection antiparasitaire induite par les cellules lymphoïdes innées (ILC)-2. Figure tirée de la revue de Kurashima et al. (4)

Une autre fonction des muqueuses, et en particulier de la muqueuse intestinale, est l'absorption des nutriments. Pour cela, les muqueuses possèdent une structure spécifique composée de villosités formées par les IEC. Ces IEC sont polarisées et présentent des microvillosités au pôle apical permettant le transport des nutriments de la lumière intestinale vers la circulation sanguine.

Une autre fonction des muqueuses – découverte plus récemment – consiste à réguler l'interaction hôte/microbiote. Plus de 10¹⁸ bactéries tapissent le tractus digestif humain, maintenant l'homéostasie intestinale en protégeant l'organisme contre des agents pathogènes notamment via une compétition pour les nutriments (5). Dans certains cas, l'écosystème de bactéries

commensales se dérègle, menant à une dysbiose néfaste pour l'organisme. En effet, une dysbiose peut conduire à des maladies de Crohn ou des rectocolites hémorragiques (Annexe II). Il est donc nécessaire de contrôler les éléments transitant à travers l'épithélium afin de définir la réponse adaptée à établir selon qu'un nutriment, une bactérie commensale ou un pathogène est présent dans la lumière intestinale.

B) L'immunité innée des muqueuses

Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) est extrêmement important d'une part dans la lutte contre les pathogènes pouvant infecter les muqueuses, et d'autre part dans la mise en place d'une tolérance immunitaire cruciale compte tenu des nutriments et micro-organismes commensaux pouvant entrer en contact avec les muqueuses. A chaque type de muqueuse est associé un MALT différent à savoir : le GALT pour l'intestin, le NALT pour les voies respiratoires, le BALT pour les bronches et le GENALT pour l'appareil génital. Des sites immunitaires spécifiques de ces tissus sont nécessaires pour induire une réponse efficace en fonction des éléments du non-soi rencontrés. Les principaux sites de mise en place de la réponse immunitaire muqueuse sont les follicules lymphoïdes isolés (ILF) retrouvés sous l'épithélium colique et surtout les plaques de Peyer (PP) que l'on retrouve tout au long de l'intestin. Les ILF peuvent être impliqués dans la protection contre certains pathogènes comme *Salmonella* via la production d'IgA spécifiques mais restent moins efficaces que les PP dont nous parlerons plus dans cette thèse (**Figure 2**) (6). Le système immunitaire muqueux va notamment se différencier de la réponse immunitaire systémique par cette forte présence d'IgA.

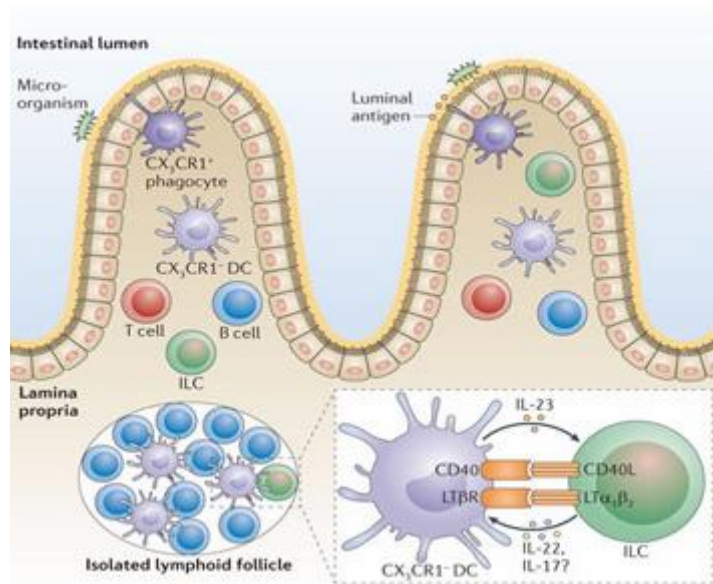


Figure 2: Le rôle des follicules lymphoïdes isolés (ILF) reste peu connu mais il est lié à la production d'immunoglobulines.

Les ILF contiennent des macrophages $CX3CR1^+$, des cellules dendritiques (DC) $CX3CR1^-$ qui vont permettre l'activation de LT essentiellement $CD4^+ TCR\beta^+$ et des LB surtout B-2B. Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes majoritairement sécréteurs d'IgA.

La réponse immunitaire muqueuse est essentiellement basée sur son site inducteur à savoir les PP qui possèdent tout l'arsenal nécessaire à la capture de micro-organismes et au déclenchement d'une réponse immunitaire innée et adaptative spécifique à ces micro-organismes (**Figure 3**). Les cellules microfoldées (M) sont présentes au niveau des PP et représentent environ 5% des cellules de l'épithélium associé au follicule (FAE) (7). Contrairement aux cellules épithéliales les entourant, elles ne présentent pas de microvillosités ni de mucus à leur surface. Ces caractéristiques vont les rendre particulièrement efficaces pour le transport de nutriments mais aussi de microbes commensaux ou pathogènes (7, 8) vers le dôme sous épithélial (SED) des PP. Les cellules M expriment plusieurs marqueurs à leur surface permettant de les identifier tels que les glycans $\alpha 1-2$ fucosylés (9), la glycoprotéine GP2 qui permet l'internalisation de certaines bactéries exprimant la *fimbriae* FimH (10) ou encore la famille des Sialic acid-binding

immunoglobulin-like lectins (Siglecs) qui reconnaît des résidus d'acide sialiques ou des glycoprotéines. Ainsi, la molécule Siglec-5 a été décrite comme étant exprimée par les cellules M humaines alors que Siglec-F est son équivalent murin (11, 12). Des cellules présentatrices de l'antigène (APC) à l'intérieur de la poche de la cellule M captent les Ag pour activer la réponse adaptative. Le rôle précurseur des cellules M dans la réponse immunitaire muqueuse en fait une cible de choix pour une vaccination contre des pathogènes entériques (13).

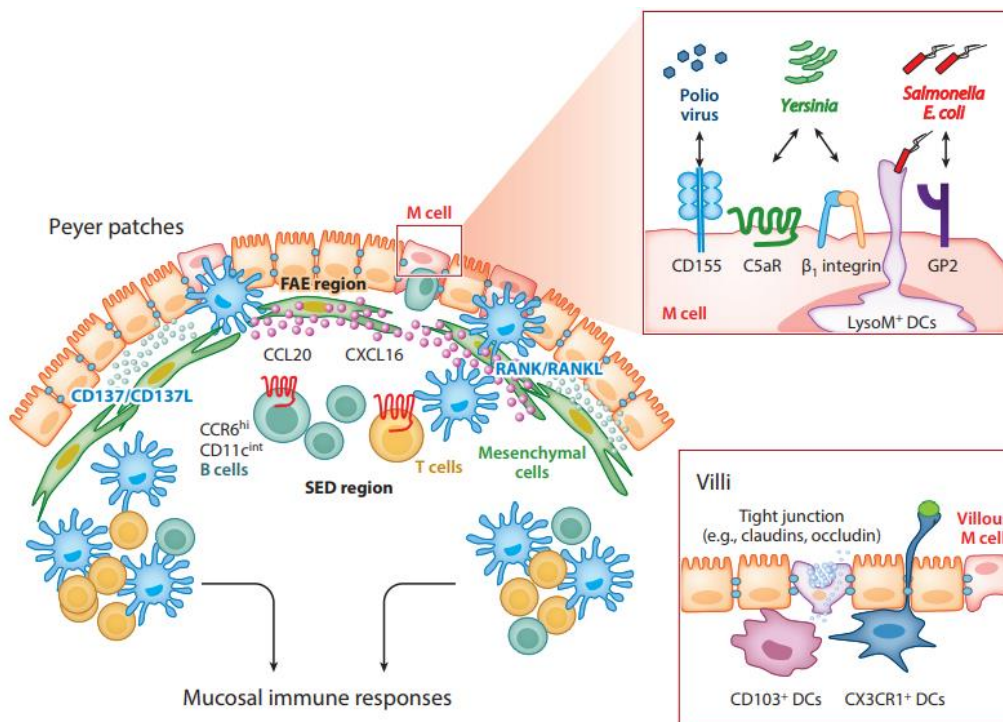


Figure 3: Les plaques de Peyer sont les sites inducteurs principaux de la réponse immunitaire muqueuse après l'entrée d'un antigène.

Elles forment des dômes constitués d'une couche d'épithélium associé au follicule (FAE) dans laquelle sont enchâssées des cellules microfoldées (M). Ces cellules M captent et transportent les antigènes de micro-organismes commensaux ou pathogènes vers le dôme sous épithélial (SED). Les antigènes sont captés par des cellules présentatrices de l'antigène (APC) telles que les DC CCR6⁺ CD11c⁺. Les DC peuvent enfin activer les LT et LB dans la zone T pour induire une réponse suppressive ou activatrice contre l'antigène. Figure tirée de la revue de Kurashima et al. (4)

Les muqueuses étant des sites particuliers, des cellules « non conventionnelles » y sont retrouvées. Il existe notamment une population de lymphocytes T (LT) spécifiques des muqueuses appelés lymphocytes MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells). Ces lymphocytes peuvent être intraépithéliaux (IEL) ou présents dans la *lamina propria*. Ils se caractérisent par l'expression des récepteurs des LT (TCR) $\gamma\delta$, $\alpha\beta$ ainsi que de la molécule $CD8^+$, $\alpha\alpha CD8^+$ (14), mais les LT helper (LTh)-17 en font aussi partie. Les LT $\alpha\beta CD8^+$ sont impliqués dans l'exclusion immunitaire que nous décrirons plus tard et dans la réparation du tissu alors que les LT $\alpha\alpha CD8^+$ ont une forte activité cytotoxique (15). Les LT $\gamma\delta$ sont activés suite à des dommages dans la barrière épithéliale et jouent un rôle important dans la réparation du tissu via la sécrétion de facteurs de croissance (16). Les LT $\gamma\delta$ ont aussi un rôle dans la protection contre les pathogènes puisque leur absence diminue la protection contre *Salmonella* chez la souris (17). Les LTh-17 sont majoritairement connus pour leur sécrétion d'interleukine (IL)-17A qui participe à la protection contre les champignons (18). Leur fonction n'est pas limitée à cela puisqu'ils ont aussi un rôle très important dans la régulation de l'homéostasie intestinale *via* leur interaction avec le microbiote et les LT régulateurs (LTreg) (19) (20). Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont une population lymphocytaire particulièrement retrouvée dans les muqueuses. Elles ne possèdent pas de récepteurs spécifiques pour un antigène mais peuvent répondre à un stress environnemental, permettant l'induction d'une protection contre des pathogènes intracellulaires (ILC1), des parasites (ILC2) ou des champignons (ILC3) (21).

Les neutrophiles contribuent activement à la défense des muqueuses *via* (i) le relargage de granules toxiques éliminant les pathogènes et participant au processus pro-inflammatoire, (ii) le recrutement et l'activation de cellules immunitaires comme les LT $CD4^+$, (iii) la sécrétion de facteurs de croissance contribuant à la réparation des muqueuses suite à des dommages (22).

C) L'immunité adaptative des muqueuses

Un grand nombre de cellules dendritiques (DC) (CD11c⁺) permettent d'orchestrer la réponse immunitaire muqueuse. Les cellules de Langerhans sont retrouvées dans les couches superficielles de la peau mais sont aussi fortement impliquées dans la reconnaissance d'antigènes dans la muqueuse orale, contribuant à la réponse immunitaire muqueuse (23). Elles ont aussi été montrées comme pouvant induire la commutation isotypique des lymphocytes B vers une réponse IgA en présence de TGF- β et d'IL-10 (24). Par ailleurs, même si le sujet reste controversé, différentes populations de DC, identifiées selon l'expression des marqueurs CX3CR1 (CX3C-chemokine receptor 1) et CD103, vont intervenir de manière distincte. En effet, il est communément admis que les DC CX3CR1⁺ présentes dans la *lamina propria* vont former des dendrites pour capter des antigènes de la lumière intestinale, alors que les DC CD103⁺ auraient plutôt le rôle d'acheminer les antigènes aux ganglions drainants comme les ganglions mésentériques (MLN) (**Figure 3**). Cependant, ce postulat est très discuté et pourrait être bien plus complexe (**Figure 4**). Par ailleurs, les rôles et phénotypes des macrophages, autres APC présentes dans la *lamina propria* et les PP restent encore à éclaircir pour comprendre leur implication dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative muqueuse.

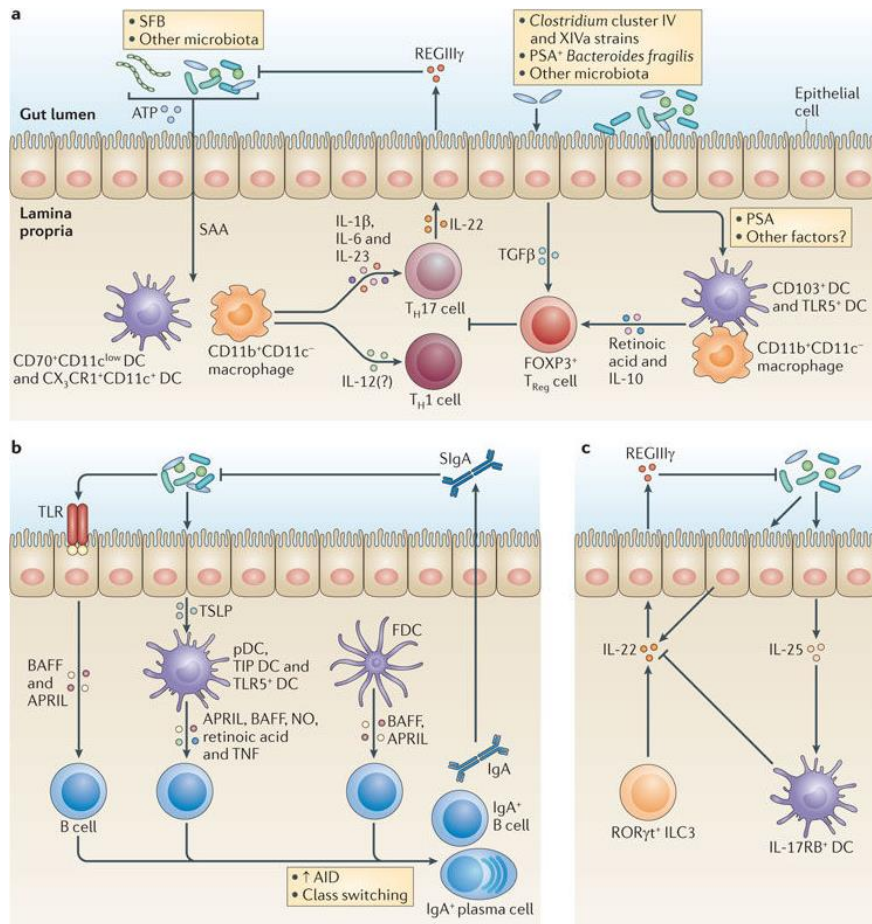


Figure 4: Différentes populations de DC pour différentes voies d'activation de la réponse immunitaire.

(a) La proportion des différentes bactéries commensales comme les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) est régulée par les LTh-17 grâce aux DC CX₃CR1⁺. D'autres bactéries du microbiote stimulent les IEC puis activent les DC CD103⁺, conduisant à une tolérance LTreg-dépendante. (b) Certaines bactéries du microbiote activent des DC plasmacytoïdes (pDC), des DC « TIP » (TNF and inducible nitric oxide synthase (iNOS)-producing DCs) ou des DC TLR5⁺. Ces DC sécrètent fortement les facteurs BAFF (B cell-activating factor) et APRIL (A proliferation-inducing ligand) conduisant à la formation de plasmocytes à IgA. (c) Le microbiote est régulé négativement par des cellules lymphoïdes innées (ILC) exprimant RORγt (retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt) via l'IL-22 et positivement grâce aux DC exprimant l'IL-17RB (IL-17 receptor B). Figure tirée de la revue de Kamada et al. (5)

Une fois que les DC ont été activées et qu'elles ont migrées vers les follicules des PP, elles peuvent activer des LT et des LB dans la zone T. Les DC vont aussi sécréter de l'acide rétinoïque

afin d'induire les récepteurs de domiciliation intestinaux tels que CCR9 ou $\alpha 4\beta 7$ sur les lymphocytes. Les principales populations de LT présentes dans la muqueuse intestinale sont les LTh-1, LTh-2, LTh-17. Leurs fonctions sont bien décrites mais particulièrement observées lors des inflammations aiguës et chroniques de l'intestin où les LTh-1 sécrètent de l'interféron gamma (IFN- γ) et de l'IL-12, les LTh-2 de l'IL-5 et de l'IL-13 et les LTh-17 de l'IL-17 et de l'IL-23 (15). Avec les DC, les LT peuvent activer les LB (réponse thymo-dépendante). Ceux-ci se différencient en plasmocytes à vie courte ou persistant. Ces derniers sécrètent des IgM mais majoritairement des IgA (25). Les IgA ont un rôle crucial dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale même si les IgM semblent suppléer leurs fonctions en cas de déficience en IgA, ce qui est le cas chez 2% de la population (26) (27, 28).

L'induction d'une réponse immunitaire intestinale suite à l'infection par un pathogène est importante pour la survie d'un individu, mais la non-réponse face à des éléments inoffensifs l'est tout autant. Ainsi, les aliments ou les composants du microbiote vont être reconnus comme des éléments du soi, induisant une tolérance périphérique fortement liée aux LTreg, conduisant à une suppression de la réponse immunitaire. La tolérance des muqueuses, notamment dans l'intestin, est fortement liée aux DC CD103⁺ qui activent les LTreg CD4⁺ FoxP3⁺ inductibles dans les zones T interfolliculaires des PP ou des MLN ; les macrophages ont aussi un rôle dans la tolérance médiée par les LTreg (29). Les microbes commensaux des tractus respiratoires, intestinaux ou de la muqueuse génitale ne sont pas censés entrer dans la circulation sanguine. Ce processus est contrôlé par une réponse immunitaire se limitant aux muqueuses. Ainsi, une réponse spécifique contre des bactéries intestinales chez la souris a été observée dans les compartiments muqueux, mais était absente au niveau systémique, démontrant une compartimentation de la réponse muqueuse contre les bactéries commensales (30).

A l'état basal, la muqueuse intestinale est caractérisée par la présence de LTreg pro-tolérologènes et de LTh-17 pro-inflammatoires dont l'action est finement contrôlée afin de conserver la flore tout en luttant contre les champignons et autres infections (31) (32). En conditions « normales », les muqueuses contiennent surtout des IgA dans leurs sécrétions, leur permettant de conserver toutes les caractéristiques décrites précédemment.

II/ PRODUCTION ET LOCALISATION DES IGA

Les IgA et IgM des muqueuses sont majoritairement présentes sous forme sécrétoire. Afin d'induire une réponse protectrice médiée par les IgA lors d'une vaccination contre un pathogène, il convient de choisir une voie d'administration adéquate et/ou d'incorporer dans la formulation vaccinale un élément inducteur d'IgA sécrétoires. Par ailleurs, l'utilisation d'IgA comme vecteur d'adressage muqueux nécessite aussi de comprendre sa prise en charge, le devenir et la fonction de cette protéine dans la muqueuse.

A) Les différentes IgA

Les IgA sont des anticorps (Ac) sécrétés par des LB des mammifères. Comme tout Ac, ils sont composés de deux chaînes lourdes (Hc) et deux chaînes légères (Lc). Une Hc est divisée en trois régions constantes $C\alpha 1$, $C\alpha 2$, $C\alpha 3$ et une région variable ; alors qu'une Lc est divisée en une région constante et une région variable. Les deux Hc sont reliées par une liaison covalente formée par des ponts disulfures au niveau de la région charnière située entre les régions $C\alpha 1$ et $C\alpha 2$. La partie variable de chaque IgA va permettre une reconnaissance d'un antigène peptidique. À la différence des autres immunoglobulines, cette reconnaissance pourrait être soit spécifique d'un seul antigène soit de motifs partagés par plusieurs agents du non-soi (33). La partie constante des IgA (Fc), en particulier celle présente sur la Hc, permet la fixation des IgA sur des récepteurs spécifiques.

Les IgA peuvent être retrouvées sous forme de monomères (mIgA) de 150kDa mais aussi sous forme dimérique (dIgA). Dans ce cas, les dimères sont reliés grâce à la chaîne J de 15kDa formant une liaison covalente entre des cystéines des Fc. La chaîne J est une protéine de type immunoglobuline qui relie les chaînes α et μ entre elles, permettant la formation de dIgA et d'IgM pentamériques. Enfin les dIgA produites dans la *lamina propria* et/ou dans les PP peuvent se fixer au récepteur aux Ig polymériques (pIgR) exprimé par sur le pôle basolatéral des cellules épithéliales. Le pIgR permet la transcytose des dIgA vers la lumière intestinale. Les dIgA vont alors se décrocher des cellules épithéliales en conservant un fragment du pIgR appelé pièce sécrétoire (SC) (34) (35) (36). Les IgA présentes sous cette forme sécrétoire (SIgA) dans la lumière intestinale sont stables et résistent en particulier à la dégradation par les protéases (37). Il est important de noter que l'IgA sérique est majoritairement monomérique (80% to 99%) (38) tandis qu'elle est surtout dimérique dans les sécrétions.

Les IgA sont aussi sous-divisées en deux isotypes chez l'Homme: IgA1 et IgA2. Ils diffèrent par la taille de leurs régions charnières, leur forme, leur séquence en acides aminés mais surtout par leur profil de glycosylation (39) (40). En effet, les IgA1 contiennent deux sites de N-glycosylations et cinq de O-glycosylations alors que les IgA2 ne présentent aucune O-glycosylation mais deux N-glycosylations supplémentaires (40). À noter que la chaîne J et le SC ont aussi leurs propres sites de glycosylation, (**Figure 5**). La proportion en IgA1 par rapport aux IgA2 est globalement plus forte (~85%), en particulier dans la circulation sanguine, la rate (~95%), la muqueuse nasale (~96%), la muqueuse de l'intestin grêle (~84%) et le colostrum (~65%) (40, 41). Les IgA2 sont principalement retrouvées dans le colon (~65%) et le tractus génital féminin (40) (42)(**Table 2**). Contrairement aux IgA1, les IgA2 sont résistantes aux protéases bactériennes, ce qui pourrait expliquer leur plus forte présence dans certaines zones de l'intestin (43).

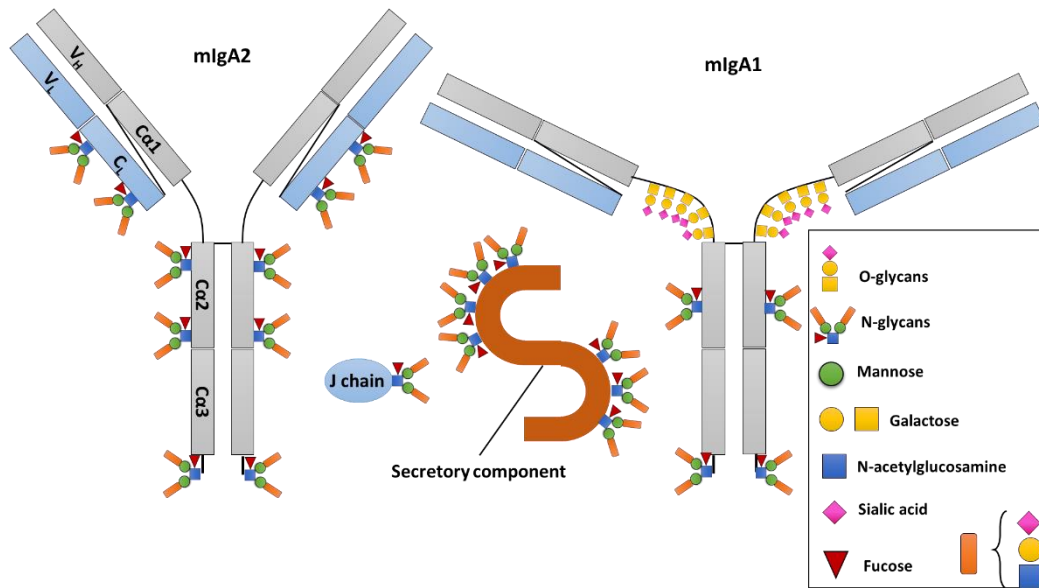


Figure 5: Les IgA1 et IgA2 présentent des profils de glycosylation différents.

Les IgA2 possèdent 10 régions N-glycosylées alors que les IgA1 possèdent 4 régions N-glycosylées ainsi que 10 O-glycosylées, modifiant leur région charnière. Les formes dimériques possèdent par ailleurs la chaîne J comportant elle-même une N-glycosylation. Finalement, les IgA sécrétoires présentant la pièce sécrétoire augmente leur nombre glycosylations. Figure inspirée de l'article de Zauner et al. (44)

B) Par qui et comment les IgA humaines sont-elles produites ?

L'intestin est le plus important composant du MALT, conduisant à la compartimentation d'un tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT). Les IgA du GALT sont majoritairement sécrétées par les plasmocytes à IgA dérivés de lymphocytes B du GALT ou de LB1b (45). Les plasmocytes dérivés de LB1b sont les principales cellules sécrétrices d'IgA en dehors des LB des PPs, notamment après stimulation avec du TGF- β et de l'acide rétinoïque (46, 47). Bien que la fonction des cellules B1 dans la production des IgA reste encore à étudier, elles seraient impliquées dans la sécrétion d'IgA polyspécifiques induites par voie thymo-indépendante (TI) (46). D'autres facteurs influencent la production d'IgA dans le GALT, comme le microbiote (48-50), l'activation de PRR tels que le toll-like receptor (TLR)-3 (51) ou la présence de cellules M (52,

53). En outre, les antigènes issus de la lumière intestinale transitent *via* les cellules M dans le FAE et sont pris en charge par les DC ou macrophages du SED des PP. Des DC enchâssées dans le FAE peuvent directement « capter » l'antigène (54) pour ensuite activer les LB dans le SED qui vont migrer dans le centre germinatif afin de finir leur différenciation en LB IgA⁺ (55). Des facteurs comme RANKL, l'IL-21 ou la présence de cellules mésenchymateuses influencent la commutation isotypique à IgA des LB (56) (52). La plupart des IgA de l'intestin ont subi une hypermutation somatique, indiquant un fort rôle des LT dans la mise en place de la réponse IgA mais l'impact de la contribution TI reste encore peu connue (57). Les LB activés peuvent alors circuler *via* les vaisseaux lymphatiques pour rejoindre les MLN ou la circulation sanguine, et finalement revenir dans la *lamina propria* intestinale sous forme de plasmocytes grâce à des marqueurs de domiciliation tels que $\alpha_4\beta_7$ ou CCR9 (**Figure 6**). Il a aussi été montré que les plasmocytes sécréteurs d'IgA du GALT pouvaient migrer dans le foie et sécréter des IgA spécifiques du microbiote ou de certains antigènes délivrés oralement à des souris (58). Les processus menant à la production d'IgA par les plasmocytes de la *lamina propria* sont relativement bien connus et nécessitent l'intervention de plusieurs acteurs (45). La production d'IgA1 plutôt que d'IgA2 n'est pas due à une plus forte action des LT dans l'activation des LB TD dans un cas plutôt qu'un autre (59). Une récente étude a néanmoins mis en évidence une plus forte expression de la cytokine B-cell activating factor (BAFF) par les LB périphériques après stimulation avec le ligand R848 du TLR7/8, induisant une forte sécrétion d'IgA1 et d'IgA2. Bien que les molécules a proliferation-inducing ligand (APRIL) et la Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) pourraient être impliquées dans la commutation des LB IgA1⁺ vers des LB IgA2⁺ (60), le processus de production d'un isotype plutôt qu'un autre par les plasmocytes des muqueuses reste encore à éclaircir.

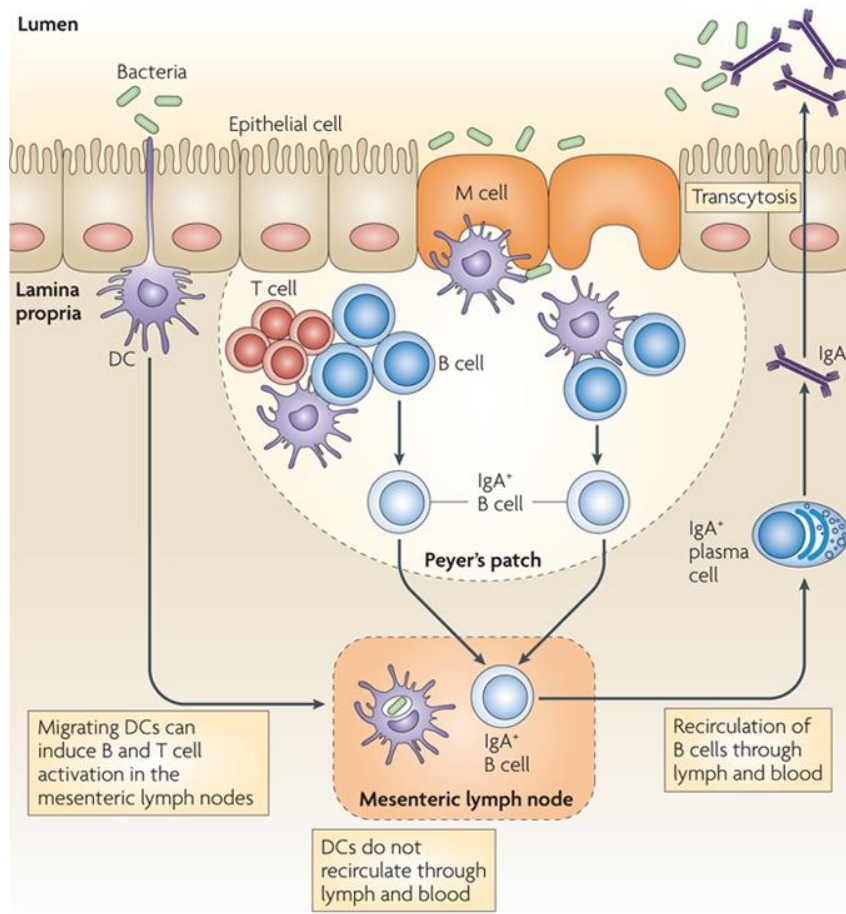


Figure 6: Résumé de la mise en place de la réponse humorale à IgA thymo-dépendante dans la muqueuse intestinale.

Après la prise en charge des pathogènes/antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène sous les cellules M des PP, les lymphocytes T et B sont activés dans la zone T. Les lymphocytes B subissent la commutation de classe et l'hypermutation somatique dans le centre germinatif pour se différencier en plasmocytes de plus ou moins forte affinité pour l'antigène. Ils sont remis en circulation dans le sang et l'expression de marqueurs de domiciliation les reconduisent dans la lamina propria. Les IgA dimériques sécrétées se fixent au pIgR, sont transportées vers la lumière intestinale et sont relarguées sous forme d'IgA sécrétoires à fort pouvoir neutralisant dont la fonction principale est l'exclusion immune. Figure tirée de la revue de Hooper et al. (61)

Les IgA sériques principalement monomériques sont sécrétées par les plasmocytes dérivés de la moelle osseuse. Les LB sont activés de façon TI principalement avec des polysaccharides ou de

façon TD avec des peptides, dans les ganglions lymphatiques ou la rate (**Figure 7**). La commutation isotypique et éventuellement l'hypermutation somatique permettent la différenciation en plasmocytes à IgA ayant une plus ou moins forte affinité pour leur antigène. Contrairement aux IgA sécrétées dans les muqueuses, la chaîne J n'est pas ajoutée aux IgA et l'isotype IgA1 est majoritairement retrouvé dans le sérum (38).

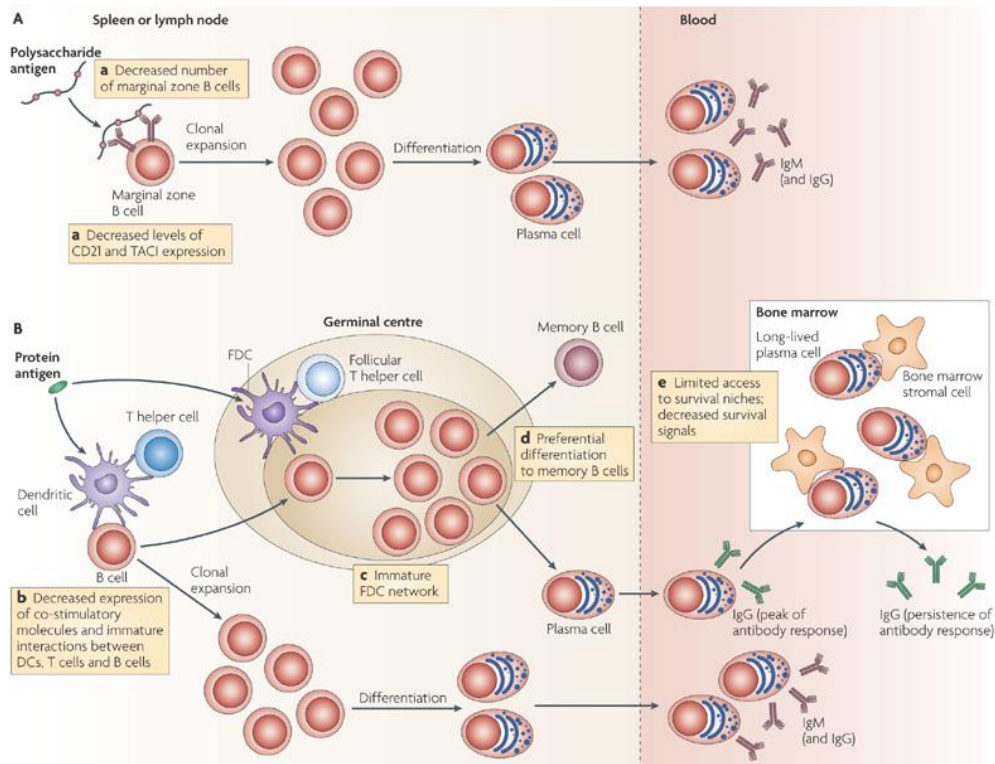


Figure 7: L'activation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'Ig.

Les lymphocytes B peuvent être directement activés par un antigène de façon thymo-indépendante (A). Dans ce cas, un polysaccharide induit le regroupement des BCR à la surface d'un lymphocyte B, induisant sa prolifération et sa différenciation en plasmocytes sécrétant des IgA de faible affinité. Dans le cas d'une activation thymo-dépendante (B), l'antigène est présenté par des DC qui activent des lymphocytes B avec l'aide de lymphocytes T helper. Les lymphocytes B migrent dans le centre germinatif où ils vont subir la commutation isotypique et l'hypermutation somatique aidés par les DC folliculaires et les LT helper folliculaires. Les plasmocytes alors produits sécrètent des IgA de forte affinité. Figure tirée de la revue publiée par Siegrist et al. (62)

Différentes DC intestinales sont cruciales à l'activation des LB vers une réponse IgA à travers la sécrétion de facteurs tels que le TGF- β ou BAFF et APRIL (**Table 1**). Les mécanismes de commutation vers un profil IgA sont aussi bien décrits dans la muqueuse respiratoire mais des données sont encore nécessaires pour mettre en lumière un éventuel point commun entre toutes les muqueuses. Les IgA sont aussi présentes dans le compartiment systémique. Néanmoins, sous-classes et formes des IgA diffèrent selon le tissu d'intérêt (**Table 2**). Ainsi, l'isotype IgA1 est prédominant dans le compartiment systémique et dans les muqueuses supérieures. En revanche, une plus forte proportion d'IgA2 est observée dans le colon alors qu'un équilibre entre les deux sous-classes est observé dans les glandes mammaires et l'appareil génital. Comme mentionné auparavant, les IgA monomériques sont particulièrement présentes dans le système sanguin alors que les dimériques se trouvent dans les muqueuses. Ces différents constats soulèvent un lien possible entre la localisation des différentes formes d'IgA, les cellules et facteurs impliqués dans leur production et leur fonction.

Table 1: Récapitulatif des cellules, récepteurs et facteurs solubles impliqués dans la commutation isotypique des LB vers des LB IgA⁺ dans les muqueuses.

Muqueuse	Fonction liées à la CSR IgA	Cellules impliquées	Molécules	Ref
MALT	Activation de la CSR IgA après activation des DC par le microbiote (TLR)	DC productrices de TNF- α et NOS (souris)	NOS, TGF- β (TD) NOS, APRIL, BAFF (TI)	(63)
GALT	Augmentation du taux en SIgA	Cellules M (souris)	RANKL	(52, 53)
	Commutation IgA1 vers IgA2 après activation des IEC par des ligands de TLR	IEC (humain, <i>in vitro</i>)	APRIL, TSLP	(64)
	Induction de LB IgA ⁺ par voie TI	pDC des MLN et PP (souris)	BAFF, APRIL, IFN de type I	(65)
	Différenciation de LB naïfs en LB IgA ⁺	DC de la <i>lamina propria</i> CD11c ⁺ CD11b ⁺ (souris)	TLR5 (flagelline)	(66)
	Génération de LB IgA ⁺	DC du SED (souris)	CCR6, CCL20	(55)
	Augmentation de la sécrétion d'IgA intestinales	DC de PP (souris)	RA, IL-6/IL-5	(67)
	Induction de LB IgA ⁺ en réponse à une immunisation (flagelline)	CD103 ⁺ CD11b ⁺ des MLN (souris)		(68)
	Augmentation du taux sérique d'IgA	(souris KO)	TGF- β	(69)
	Augmentation de la réponse IgA spécifique d'un antigène (CT) dans les muqueuses	(souris KO)	TGF- β	(70)
	Augmentation de la sécrétion d'IgA intestinal (feces)	(souris KO)	IL-21, IL-17, TGF- β	(56)
	Formation de LB IgA ⁺ après stimulation des DC (TLR)	DC folliculaires des PP (souris)	BAFF, TGF- β	(71)
	Différenciation en LB IgA ⁺	LB B220 ⁺ IgM ⁺ et cellules stromales de la <i>lamina propria</i> (souris)		(72)
	Différenciation en plasmocytes à IgA	LB de PP (souris, <i>in vitro</i>)	TGF- β , IL-5, IL-2	(73)
Différenciation en plasmocytes à IgA	LB1b péritonéales (souris)	RA, TGF- β	(45, 47)	
NALT/GALT	Activation des DC CD11b ⁺ CD103 ⁺	Microbiote du NALT(souris)	TLR4 (LPS)	(74)
	Activation des LB vers la CSR IgA Induction de leur migration vers l'intestin	DC CD11b ⁺ CD103 ⁺ (souris)	TGF- β α 4 β 7, CCR9	(74)
NALT	Activation des DC <i>via</i> le TLR3 et induction d'une réponse humorale IgA TD <i>via</i> le TGF- β	DC CD103 ⁺ (souris)	poly-I:C, TLR3, TGF- β	(51)

CSR : commutation isotypique, NOS : espèces réactives de l'azote et de l'oxygène, RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, pDC : cellule dendritique plasmacytoïde, GC : centre germinatif, TSLP : thymic stromal lymphopoietin, RA : acide rétinoïque, CT : toxine cholérique, IEC : cellules intra-épithéliales

Table 2: Répartition des isotypes et isoforms des IgA en fonction de leur localisation

Compartiment	localisation	[IgA1]	isoformes (m, d, S)	[IgA2]	isoformes (m, d, S)	proportion (IgA1:IgA2)	proportion plasmocytes (IgA1 ⁺ :IgA2 ⁺)	Observations particulières	Ref
SYSTEMIQUE									
	moelle osseuse		<u>m</u> , d(29%)		<u>m</u> , d(28.7%)		11.1		(75)
	sérum	1.5-1.6g/L	<u>m</u> (~90%)	0.15-0.6g/L	<u>m</u> , d(15-30%)	2.3-10		La proportion de plasmocytes IgA1 ⁺ et IgA2 ⁺ correspond au ratio IgA1/IgA2	(76-79)
	rate		<u>m</u> , d(23.9%)		<u>m</u> , d(44.8%)		3.7-9		(41, 75)
	GLP*						9		(41)
MUQUEUX									
-GLANDES MAMMAIRES									
	glande						1.5		(41)
	colostrum	10.9g/L	<u>S</u> , d	15.4g/L	<u>S</u> , d	1.1		SIgA=12g/L. IgA1 spécifiques d'antigènes protéiques VS IgA2 dirigées contre le LPS	(80-82)
	lait transitionnel	1.8g/L	<u>S</u> , d	3.4g/L	<u>S</u> , d			SIgA=1g/L	(80)
	lait mature	0.4g/L	<u>S</u> , d	0.3g/L	<u>S</u> , d				(80)
-GLANDES LACRYMALES	glande	1.2g/L	<u>d</u> (76.2%), m	1.1g/L	<u>d</u> (71.3%), m	1.7	1.1		(75, 79)
-GLANDES SALIVAIRES	glande		<u>m</u> , d(40.7%)		<u>d</u> (67%), m		1.1		(75)
	salive	30-900mg/L	<u>d</u> (90-95%), S(20mg/L)	16-700mg/L	<u>d</u> (90-95%), S(20mg/L)	1.3-2			(76, 83)
-NALT	NALT						9-19	Idem sérum	(41, 79)
	secrétions nasales	200-650mg/L	<u>S</u> (88%)	60-80mg/L	<u>S</u> (88%)	2.4-10			(41, 79, 84, 85)
-GALT	langue		<u>m</u> , d(36.8%)		<u>d</u> (56.2%), m		6.8-9		(41, 75)
	estomac						4-5.7		(41, 84)
	MLN		<u>m</u> , d(23.9%)		<u>m</u> , d(45.4%)		4.3		(75)
	duodénum						2.3-4		(41, 84)
	jéjunum					3.4		+ proportion d'IgA2 (ratio à 1.3) si infection par différentes bactéries	(86)
	iléum					1.6	1-1.2		(86) (41, 84)
	intestin		<u>d</u> (60.5%), m		<u>d</u> (72%), m		1.3	α 4 β 7 (intestin) plus fréquemment exprimé sur des plasmocytes IgA2 ⁺ L'immunisation orale contre <i>Salmonella</i> induit α 4 β 7 Confirmation que IgA2 plutôt en réponse au LPS	(87)
	secrétions intestinales	50mg/L	<u>S</u> (80-90%)	100mg/L	<u>S</u> (80-90%)	0.5		La SC se fixe sur les IgA1/2, les stabilisant et les rendant hydrophobes	(88) (89)
	gros intestin		<u>d</u> (51.6%), m		<u>d</u> (76.2%), m		0.6		(75)
	colon		<u>d</u> (73%), m		<u>d</u> (100%)		0.37-0.7		(90)
	rectum						0.7-0.8		(84)

-GENALT	endocervix				1.3	(84)
	ectocervix				1.4	(84)
	vagin				0.8	(84)
	sécrétions vaginales	17mg/L	20mg/L	~1		(79)

*GLP :ganglions lymphatiques périphériques

III/ LA FONCTION DES IGA1 ET IGA2 : BALANCE ENTRE TOLERANCE ET INFLAMMATION

A) Les récepteurs aux IgA

Plusieurs récepteurs ont été décrits comme pouvant interagir avec les IgA tels que le pIgR qui permet le transport des IgA ou le récepteur Fc néonatal (FcRn) qui permet le recyclage des Ig. Quatre récepteurs peuvent être impliqués dans l'induction d'une réponse immunitaire et vont particulièrement nous intéresser : Fc α RI, DC-SIGN, Dectin-1 et le récepteur à la transferrine (Figure 8).

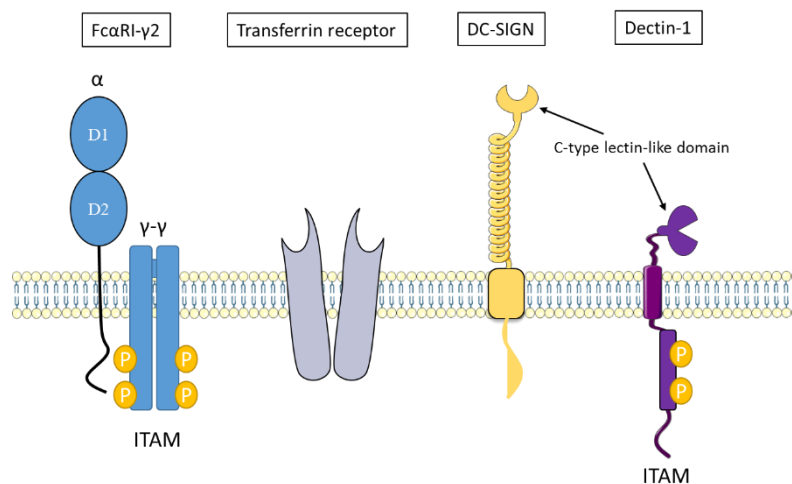


Figure 8: Les quatre principaux récepteurs aux IgA.

Le Fc α RI est associé aux chaînes γ possédant un domaine intramembranaire composé de motifs ITAM impliqués dans le rôle pro- et anti- inflammatoire de ce récepteur. Le récepteur à la transferrine est connu pour fixer le fer mais aussi les IgA grâce à son domaine extramembranaire. DC-SIGN et Dectin-1 sont deux lectines de type C capables de fixer les IgA via leurs glycosylations. Dectin-1 possède en plus un domaine ITAM dont la fonction lors de la fixation des IgA n'est pas encore éclaircie.

Le récepteur aux IgA (Fc α RI/CD89) est exprimé par les éosinophiles (91), les neutrophiles (92), les monocytes (93) et les DC (94). Il peut fixer aussi bien les IgA1 que les IgA2. Une polymérisation du Fc α RI soluble a été observée en présence de mIgA (95). En général, ce récepteur lie mieux les IgA sous forme de complexes immuns ou de polymères (96). Deux Fc α RI peuvent interagir avec une IgA et peuvent être associés avec des FcR γ contenant un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (97). La présence de ce dernier va médier une réponse activatrice induite par les IgA sous forme de complexe immun (98, 99). Ainsi, en contexte infectieux, les complexes immuns formés avec les IgA se fixent au Fc α RI des DC CD103⁺ intestinales, induisant une cascade de signalisation débutant par les motifs ITAM et aboutissant à une réponse inflammatoire médiée par la caspase-1 impliquant les LTh17 et des cytokines telles que l'IL-23, et le TNF- α (100) (**Figure 9**). Le rôle du Fc α RI est double puisqu'il peut aussi induire une réponse anti-inflammatoire. En effet, la fixation des IgA monomériques sériques entraîne le recrutement de la protéine Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) sur les domaines ITAM ce qui empêche la fixation de l'enzyme Syk et donc de la voie de signalisation pro-inflammatoire (101-103). Par ailleurs, ce récepteur est fortement impliqué dans les néphropathies à IgA (IgAN) (104). Cette maladie auto-immune est caractérisée par la sécrétion d'IgA1 monomériques anormalement glycosylées puisque présentant une déficience en galactose dans les O-glycosylations de la région charnière (105, 106). Cette différence par rapport aux IgA1 sériques normales va rendre ces molécules fortement immunogènes, c'est-à-dire qu'elles sont reconnues comme un élément du non soi par le système immunitaire. Ce dernier va donc induire une réponse spécifique contre ces IgA1 dégalactosylées, conduisant à une agglutination de complexes immuns dans le rein pouvant aboutir à l'insuffisance rénale (105).

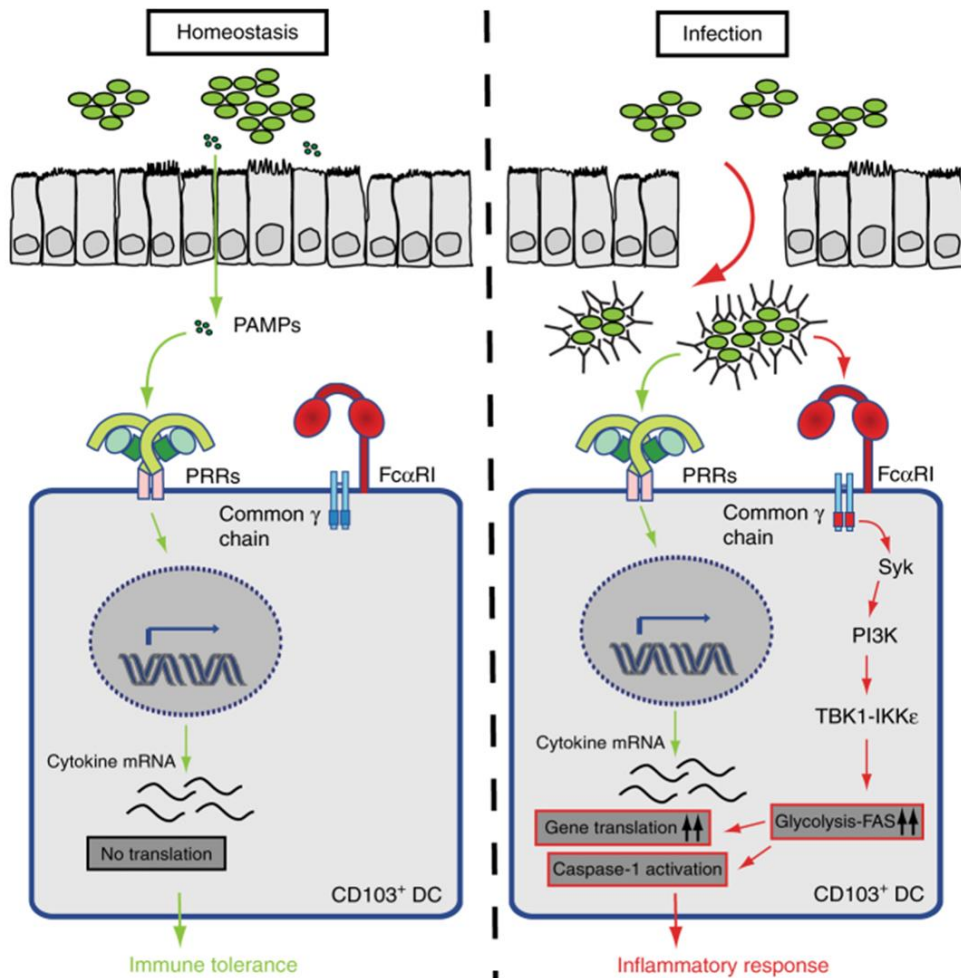


Figure 9: Modèle de réponse inflammatoire soulignant la coopération entre les TLR et le FcαRI.

(Gauche) A l'état basal, les cellules dendritiques (DC) CD103⁺ sont activées via leur TLR par des molécules provenant de la lumière intestinale. Ce processus induit la transcription de gènes pro-inflammatoires mais ne conduit pas à la synthèse de protéines. (Droite) En cas d'infection, des complexes immuns formés par les IgA se fixent au FcαRI, fournissant un second signal nécessaire à l'augmentation de la caspase-1 et donc à la synthèse de protéines pro-inflammatoires. Figure tirée de l'article de Hansen et al. (100)

Le récepteur à la transferrine 1 (CD71) est une glycoprotéine fixant le fer complexé à la transferrine puis endocytée par la cellule. Il est exprimé dans de nombreux tissus comme le colon et l'intestin (107) mais aussi fortement sur les lymphocytes sanguins (108). CD71 a été décrit comme un récepteur pouvant interagir avec des IgA monomériques (109) mais aussi sécrétoires

notamment grâce à leurs glycosylations (110). En outre, il permet le transport des SIgA1 ayant fixé un Ag de la lumière intestinale vers la *lamina propria* (111, 112). CD71 est sur-exprimé chez les patients souffrant de néphropathies à IgA, suggérant un rôle aggravant de ce récepteur dans cette maladie (113).

DC-SIGN est une lectine transmembranaire de type C (CLR) fortement exprimée par des DC immatures des tissus périphériques et dans le modèle *in vitro* de DC dérivées de monocytes (moDC) (114, 115). Leur domaine extra-membranaire de type C va permettre la reconnaissance de structures carbohydrates telles que le mannose ou le fucose (116). Ce récepteur interagit avec des éléments du soi mais aussi avec certains pathogènes comme les champignons et les mycobactéries et induit une réponse immunitaire *via* les DC (117) (118) (119). Il va aussi permettre l'interaction avec les LT ou le transport des DC dépendant des cellules endothéliales *via* respectivement ICAM3(114) et ICAM2(115). Une étude a mis en évidence une plus faible prise en charge des IgA par les DC lors d'un traitement de ces dernières au mannose (120). De cette façon, un rôle de DC-SIGN dans la liaison des IgA, supposément *via* leurs motifs glycosylés, a été souligné. Contrairement au Fc α RI, aucun rôle pro- ou anti-inflammatoire n'a été démontré suite à la fixation des IgA sur ce récepteur.

Comme DC-SIGN, Dectin-1 est un CLR originellement décrit comme étant le récepteur aux β -glucans (121) possédant le motif 3-O-Su-GalNAc β . Il est exprimé par les macrophages, les neutrophiles et les DC. Il possède un rôle protecteur notamment contre les champignons en induisant la sécrétion de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène (122) en collaborant avec le TLR-2 (123). Récemment, une voie β -glucans / Dectin-1/ IL-17 a été mise en évidence pour son rôle dans la régulation du microbiote (124). L'implication de Dectin-1 dans la réponse immunitaire pourrait être liée à son domaine ITAM intracellulaire (121). Par ailleurs, notre équipe a démontré le rôle important de Dectin-1 mais aussi du récepteur aux acides sialiques Siglec 5

dans la transcytose inverse des IgA grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo* n'exprimant plus ce récepteur (11). Ainsi, Dectin-1 pourrait aussi lier les IgA à la surface des DC même si la voie déclenchée reste méconnue. Néanmoins, il est connu que la chaîne γ du Fc ϵ RI possédant des motifs ITAM inhibe la voie pro-inflammatoire induite par des ligands de Dectin-1 sur les DC (125). Dès lors, un lien pourrait être fait entre la présence du Fc α RI, pouvant aussi être associé à des chaînes γ , et Dectin-1 conduisant à une régulation complexe des IgA interagissant avec les deux récepteurs. Par ailleurs, notre équipe a mis en évidence une régulation négative des récepteurs Dectin-1 et Siglec 5 par le senseur de pathogènes NOD-2 (Annexe III). Ces résultats ouvrent encore de nouvelles perspectives quant aux systèmes de régulation des récepteurs aux IgA à prendre en compte lors de la réponse IgA-médiée.

B) Fonction anti-inflammatoire des IgA

Exclusion immune

Les IgA participent à la tolérance immunitaire dès la naissance puisque les IgA maternelles inhibent la réponse adaptative chez l'enfant pour permettre l'acquisition de leur microbiote (126). En plus de participer à l'établissement du microbiote, les IgA intestinales vont aussi la réguler tout le long de la vie d'un individu (52, 127). Grâce à leur fonction d'exclusion immune, elles permettent de différencier les bactéries inoffensives ou commensaux des agents pathogènes (128), conduisant à la notion d'une immunosélection médiée par les anticorps (AMIS) (129). L'exclusion immune correspond à la fixation d'IgA à large spectre de reconnaissance antigénique sur des bactéries intestinales, forçant l'agrégation des bactéries répliquées (130) et empêchant l'entrée de ces dernières dans les cellules de l'hôte (**Figure 10**). L'un des moyens dont disposent les IgA pour empêcher l'entrée des bactéries est de se fixer dans le mucus tapissant le colon après avoir reconnu les bactéries (131). Ainsi la neutralisation des bactéries pathogènes comme *Shigella flexneri* par la fixation du LPS empêche la mise en place d'une réponse inflammatoire délétère pour l'intestin avant et pendant l'infection des cellules cibles (132, 133). La SC a notamment été

décrite comme un facteur améliorant la fonction protectrice *via* l'exclusion immune (134-136). Les IgA poly-réactives recouvrent également les bactéries commensales (57, 137), notamment après l'induction par ces bactéries (33) d'une réponse thymo-indépendante (138) conduisant ainsi à une réponse préférentiellement tolérogène contre ces agents.

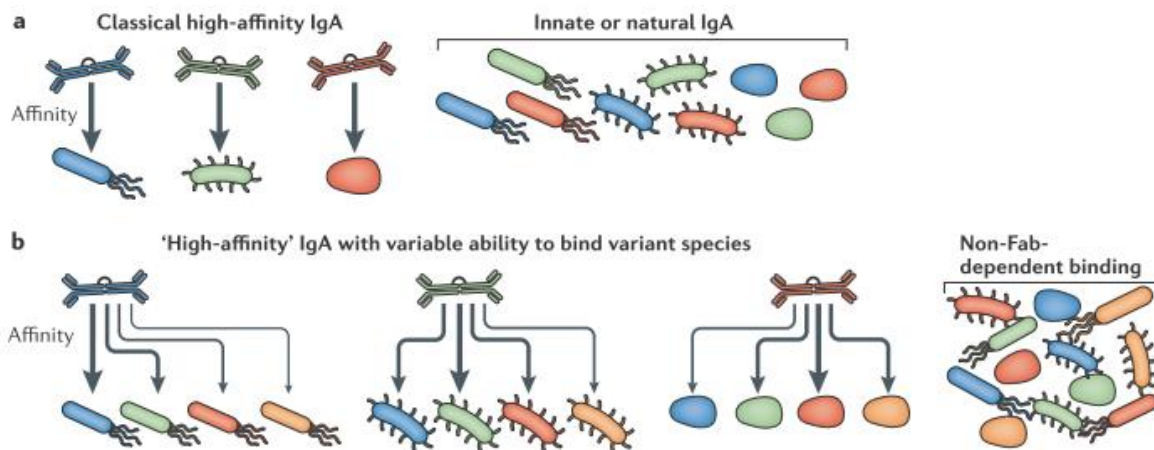


Figure 10: Modèle de réponse des IgA sécrétoires aux agents pathogènes ou commensaux.

(a) Deux types d'IgA seraient produites : les « classiques » à forte spécificité par la voie thymo-dépendante et les IgA « naturelles » à faible spécificité par la voie thymo-indépendante. (b) Les deux types d'IgA pourraient être retrouvées chez un même individu, les classiques fixant plutôt les pathogènes (flèches épaisses) et les naturelles les commensaux (flèches plus fines). Cette dichotomie, pas forcément aussi restrictive, pourrait expliquer le rôle tolérogène des IgA vis-à-vis du microbiote et le rôle protecteur contre les pathogènes. Figure tirée de la revue de Pabst et al. (33)

Réponse anti-inflammatoire directe

Les IgA sécrétoires peuvent directement induire une réponse T régulatrice avec sécrétion d'IL-10 dans un modèle de DC dérivées de la moelle osseuse (139). Même si ce modèle n'est pas complètement représentatif d'une réponse muqueuse impliquant d'autres types de DC, il met en évidence un mécanisme tolérogène des SIgA. Les IgA intestinales complexées avec des bactéries du microbiote comme *E. coli* peuvent notamment diminuer la réponse inflammatoire (140). Les IgA monomériques du sang ont aussi été décrites comme inductrices de réponse anti-

inflammatoire : (i) *via* le Fc α RI (103), (ii) en inhibant par exemple la réponse Th17 (141), (iii) en induisant la mort des neutrophiles (142).

C) Fonctions pro-inflammatoire des IgA dans la lutte contre les pathogènes

Les IgA peuvent aussi être induites par des pathogènes (143). Dans ce cas, l'activation de la réponse adaptative peut provenir de la présentation d'un antigène délivré par des IgA intestinales. Les IgA, notamment les IgA2, fixent les bactéries dans la lumière intestinale puis sont rétro-transportées vers le SED grâce au récepteur Dectin-1 (11) où elles vont pouvoir activer des DC (144). Le rôle des IgA dans l'inflammation est d'ailleurs souligné chez les patients atteints de la maladie de Crohn possédant une mutation du gène *NOD-2*, conduisant à un plus fort transport des IgA dans la lumière intestinale (Annexe III). Les complexes immuns formés par les IgA induisent une réponse cytokinique pro-inflammatoire *via* les macrophages et les monocytes (145) et sont phagocytés par les cellules de Kupffer dans le foie (146). Enfin, les IgA sériques induisent la migration de neutrophiles et la NETose *via* le Fc α RI (147, 148), menant à une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), de la phagocytose et à la sécrétion de cytokines et espèces réactives de l'oxygène (149) (**Figure 11**). Ainsi, les IgA possèdent un effet protecteur *via* leurs interactions avec les cellules immunitaires.

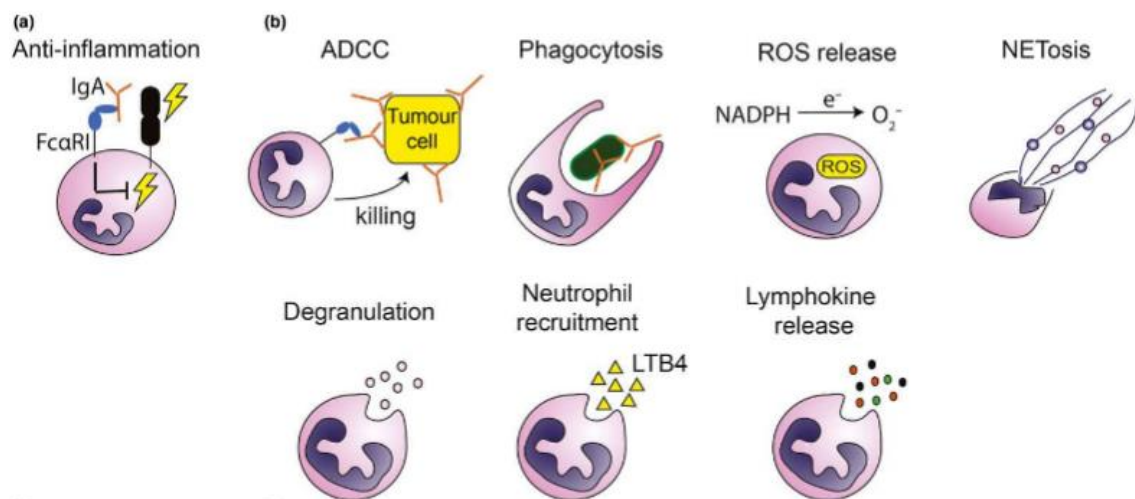


Figure 11: Rôle protecteur des neutrophiles dans la fonction des IgA.

(a) Les neutrophiles peuvent être liés au rôle anti-inflammatoire des IgA via le FcαRI, qui induit l'inhibition de leur activation. (b) Les neutrophiles sont surtout impliqués dans la fonction pro-inflammatoire des IgA. En effet, les IgA induisent l'ADCC, l'opsonisation, la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène, le relargage de NET, la dégranulation et la sécrétion de cytokines par les neutrophiles ainsi que leur recrutement. Figure tirée de la revue de Heineke et al.(150).

Ces données démontrent que les IgA de forte ou de faible affinité sont essentielles pour l'homéostasie intestinale à la fois en induisant une tolérance vis-à-vis du microbiote mais aussi en médiant la protection contre des pathogènes entériques *via* de nombreux mécanismes (**Figure 12**). Pour cette deuxième fonction, la mise en place de vaccins ciblant des pathogènes muqueux va passer par la recherche d'une réponse muqueuse IgA neutralisante (151, 152). Le challenge reste de bien contrôler la réponse IgA induite afin d'éviter qu'elle ne soit tolérogène.

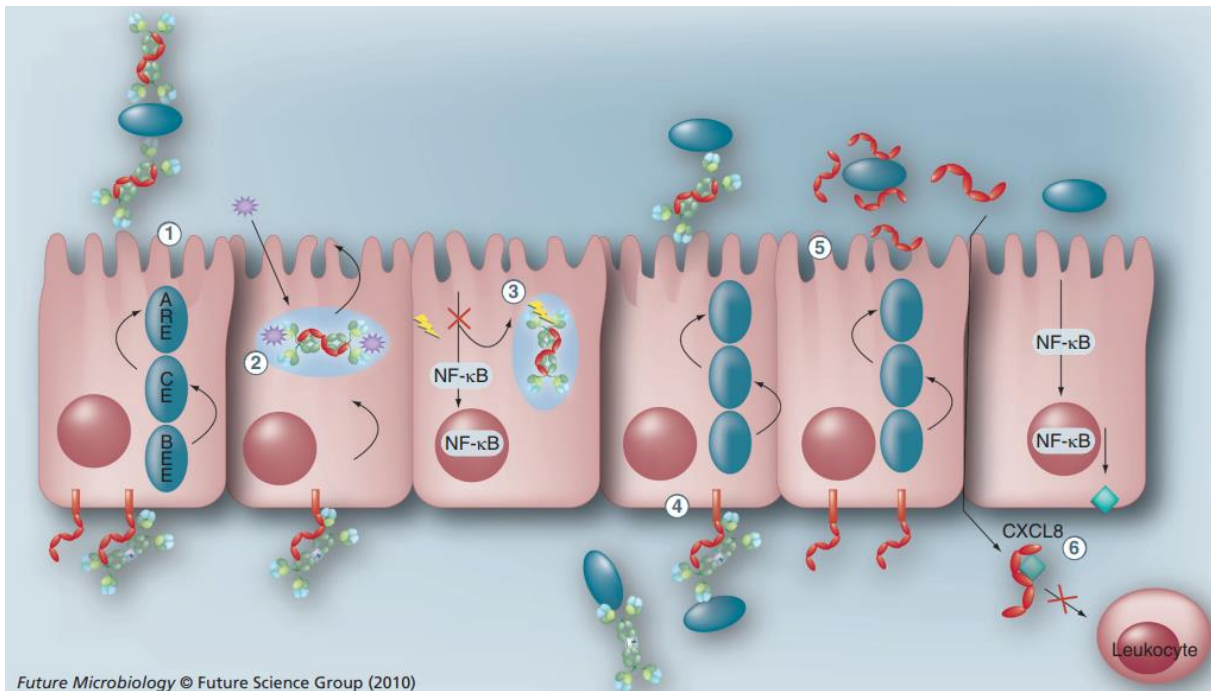


Figure 12: Résumé des fonctions protectrices des IgA dans la muqueuse intestinale.

(1) Les IgA sécrétatoires réalisent l'exclusion immunitaire, empêchant l'entrée de pathogènes. (2) Les IgA transportées par le pIgR peuvent former des complexes immunitaires avec des pathogènes endocytés dans les endosomes de la cellule, induisant leur excrétion hors de la cellule. (3) Les IgA diminuent les dommages subis par l'épithélium en inhibant la voie NF-κB. (4) Les IgA dimériques forment des complexes immunitaires avec des pathogènes dans la lamina propria et les renvoient vers la lumière intestinale via la transcytose. (5) La pièce sécrétatoire libre (SC) peut neutraliser des pathogènes en fixant des glycans. (6) La SC peut limiter le recrutement de leucocytes en inhibant CXCL8, diminuant l'inflammation. Figure tirée de la revue publiée par Corthésy (37).

Chapitre II : L'IgA : vecteur vaccinal muqueux

I/ LES DIFFERENTS VACCINS MUQUEUX

Nous avons vu que les muqueuses représentent une surface énorme d'échanges avec l'environnement extérieur, représentant dès lors une cible de choix pour certains agents infectieux tels que les entérobactéries mais aussi des virus comme le virus de l'immunodéficience humaine

(VIH). Une batterie de mécanismes protecteurs décrits plus haut est donc présente pour limiter ce genre d'infection. Afin de lutter contre des pathogènes ciblant les muqueuses, des études se sont donc penchées sur la création de vaccins muqueux. L'idée est de présenter un ou des antigènes aux sites inducteurs de la réponse immunitaire dans le GALT, NALT ou GENALT afin d'induire une réponse à la fois cellulaire et humorale incluant la sécrétion d'IgA neutralisantes (153). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux obstacles liés aux caractéristiques intrinsèques des muqueuses apparaissent : (i) résister aux conditions délétères de l'intestin notamment le pH acide ou les protéases bactériennes, (ii) traverser la barrière épithéliale afin de cibler les APC présentes dans la *lamina propria* mais surtout dans le SED des PP, (iii) induire une réponse immunitaire pro-inflammatoire non-toléro-gène, (iv) éventuellement « casser » la compartimentation muqueuse/systémique pour par exemple activer les lymphocytes B1 sécréteurs d'IgA, (v) induire le recrutement de cellules immunitaires au niveau des muqueuses par l'induction de récepteurs de domiciliation intestinal.

Malheureusement, peu de vaccins muqueux sont actuellement disponibles car les limites énoncées précédemment sont difficiles à dépasser. Les vaccins muqueux actuels ne présentent pas une réponse optimale car en grande partie seulement basée sur une réponse humorale (**Table 3**). Néanmoins, la mise en place de nouveaux vecteurs spécialement adaptés à la vaccination muqueuse pourrait ouvrir la voie à la généralisation de cette stratégie vaccinale (Annexe I). Ainsi, l'utilisation de nanoparticules protéiques ou lipidiques permet d'encapsuler et de protéger des Ag mais aussi de présenter en parallèle une panoplie d'adjuvants tout en pouvant être endocyté par des APC. Ces méthodes pourraient aussi permettre de cibler les cellules les plus aptes à protéger contre un pathogène par exemple en incorporant des récepteurs spécifiques ou des molécules comme l'acide rétinoïque induisant l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (154).

Table 3: Vaccins muqueux licenciés en 2017.

12 vaccins muqueux sont disponibles sur le marché en 2017, ciblant 5 pathogènes dont seulement 2 bactéries (*Salmonella Typhi* et *Vibrio cholera*). La plupart utilisent les pathogènes vivants mais atténués et s'administrent par voie orale, induisant une sécrétion d'IgA dans les muqueuses. OPV, oral polio vaccine; CTL, cytotoxic T lymphocytes; CTB, cholera toxin B subunit; LPS, lipopolysaccharide. Figure tirée de la revue publiée par Kim et al.(155)

Pathogen	Trade name	Composition	Dosage	Immunological mechanism	Efficacy
Rotavirus	Rotarix, RotaTeg	Live attenuated, monovalent or pentavalent rotaviruses	Oral, 3 doses	Mucosal IgA and systemic neutralizing IgG	Over 70%-90% against severe disease
Poliovirus	Orimune, OPV, Poliomyelitis vaccine	Live attenuated trivalent, bivalent, and monovalent polioviruses	Oral, 3 doses	Mucosal IgA and systemic IgG	Over 90% in most of the world
<i>Salmonella Typhi</i>	Vivotif, Ty21A	Live attenuated <i>S. Typhi</i> bacteria	Oral, 3-4 doses	Mucosal IgA, systemic IgG, and CTL responses	Variable, but more than 50%
<i>Vibrio cholera</i>	Dukoral, ORC-Vax, Shanchol	Inactivated <i>V. cholera</i> O1 classical and El Tor biotypes with or without CTB	Oral, 2-3 doses	Antibacterial, toxin-specific, and LPS-specific IgA	Strong herd protection over 85%
Influenza type A and B virus	FluMist	Live viral reassortant with trivalent mix of H1, H3, and B strains of hemagglutinin and neuraminidase genes in an attenuated donor strain	Intranasal in young children, 2 doses	Hemagglutinin- and neuraminidase-specific mucosal IgA and systemic IgG responses	> 85% in children, variable in adults

La plupart des vaccins muqueux licenciés sont administrés par la voie orale (**Table 3**). Les compartiments muqueux sont reliés entre eux (théorie du système immunitaire commun muqueux) mais distincts du systémique, permettant de penser à une stratégie vaccinale commune (**Figure 13**). La vaccination par voie génitale concerne aussi bien des bactéries comme *Chlamydia* ou des virus comme le VIH ou le virus du papillome humain (HPV) qui infectent cette muqueuse. HPV est responsable de 1000 décès par an du fait de l'induction de cancers du col de l'utérus chez la femme en France. Des vaccins sont commercialisés comme Gardasil® et Cervarix® mais

sont injectables par voie intramusculaire. De la même façon, le VIH est transmissible par voie sexuelle mais aucun vaccin administrable par voie génitale n'offre de résultats concluants. Les limitations de la conception d'un vaccin vaginal sont liées à (i) la difficulté d'induire des IgA neutralisantes à ce niveau, très efficaces dans la protection, (ii) la praticité de cette voie du fait de la vision culturelle, d'un recours à un médecin spécialiste pas forcément présent selon les régions géographiques, du nombre éventuel de doses ou du nombre de personnes concernées, c'est-à-dire toute personne pouvant avoir des relations sexuelles, (iii) la différence entre homme et femme. Néanmoins la vaccination intra-vaginale chez la souris a montré une protection contre le virus herpès simplex (HSV)-2 par l'induction de LT mémoires (156), laissant présager une potentielle utilisation de cette voie d'administration. La vaccination vaginale chez la femme avec la toxine cholérique B (CTB) comme adjuvant et comme antigène induit une réponse IgA 58 fois plus importante que la vaccination nasale dans les sécrétions cervicales. A l'inverse, une sécrétion d'IgA 7 fois moins importante dans les sécrétions vaginales a été observée (157). Une autre étude a pourtant démontré une sécrétion d'IgA spécifiques de la CTB à la fois dans les sécrétions vaginales et cervicales après immunisation vaginale (158). Ainsi, il n'est pas évident d'induire une réponse correcte complète par voie vaginale localement et la recherche d'amélioration à ce niveau reste à investiguer. Par ailleurs, bien qu'une réponse systémique et sublinguale peut être observée, l'administration d'un vaccin génital induit une réponse limitée au vagin et n'est pas applicable au rectum par exemple (158). A l'inverse, l'immunisation rectale permet une forte sécrétion d'IgA spécifiques dans le rectum (158) mais aussi dans le tractus génital en cas d'immunisation contre la grippe (159). Cependant, la vaccination rectale ne touche pas les autres muqueuses et reste une voie d'administration difficile à mettre en place mais pourrait être une bonne stratégie de lutte contre le VIH (160). La voie d'immunisation sublinguale est de plus en plus étudiée du fait des nombreuses possibilités qu'elle ouvre. En effet, elle induit une réponse adaptative humorale et cellulaire à la fois systémique et muqueuses. Ces réponses protègent

contre des pathogènes oraux mais aussi contre influenza H1N1 ou papillomavirus au niveau respiratoire et génital respectivement (161, 162). Comme la vaccination orale, la voie sublinguale peut faire intervenir une tolérance immunitaire. Par conséquent, son utilisation pour la désensibilisation est particulièrement relevante, notamment contre les allergènes respiratoires alors que la voie orale montre de meilleurs résultats pour les allergies alimentaires (163). Cette approche est de plus en plus étudiée car peu dangereuse comparée par exemple à la voie sous-cutanée (164) mais nécessite une forte quantité d'antigènes et l'utilisation d'adjuvants ou des systèmes de délivrance permettant l'induction d'une tolérance tels que la CTB ou des nanoparticules (165). Ainsi, la voie sublinguale nécessite encore d'étudier des adjuvants efficaces, les formulations et les doses les plus adéquates pour l'appliquer dans des phases plus avancées de stratégies vaccinales.

Enfin, la vaccination nasale pourrait être une bonne alternative pour cibler de nombreuses muqueuses puisqu'elle induit des réponses dans le tractus respiratoire, digestif, génital et finalement dans le compartiment systémique, (**Figure 13**) (166). Bien que l'organogénèse du GALT soit différente du NALT, ce dernier possède aussi des cellules M semblables à celles du GALT et essentielles à l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse globale (167) (168). Le NALT est de ce fait une cible de choix pour la vaccination muqueuse (169). Dans ce contexte, l'injection par voie nasale du couple p24-IgA sécrétoire induit le même type de réponse protectrice que celle observée dans l'intestin suite à l'infection de souris par le virus de la vaccine exprimant la protéine gag, soulignant la possibilité de faire un vaccin muqueux en ciblant le NALT (170). De même, l'immunisation nasale avec une souche atténuée de *S. Typhimurium* induit une protection contre *Salmonella* via les cellules M du NALT (168).

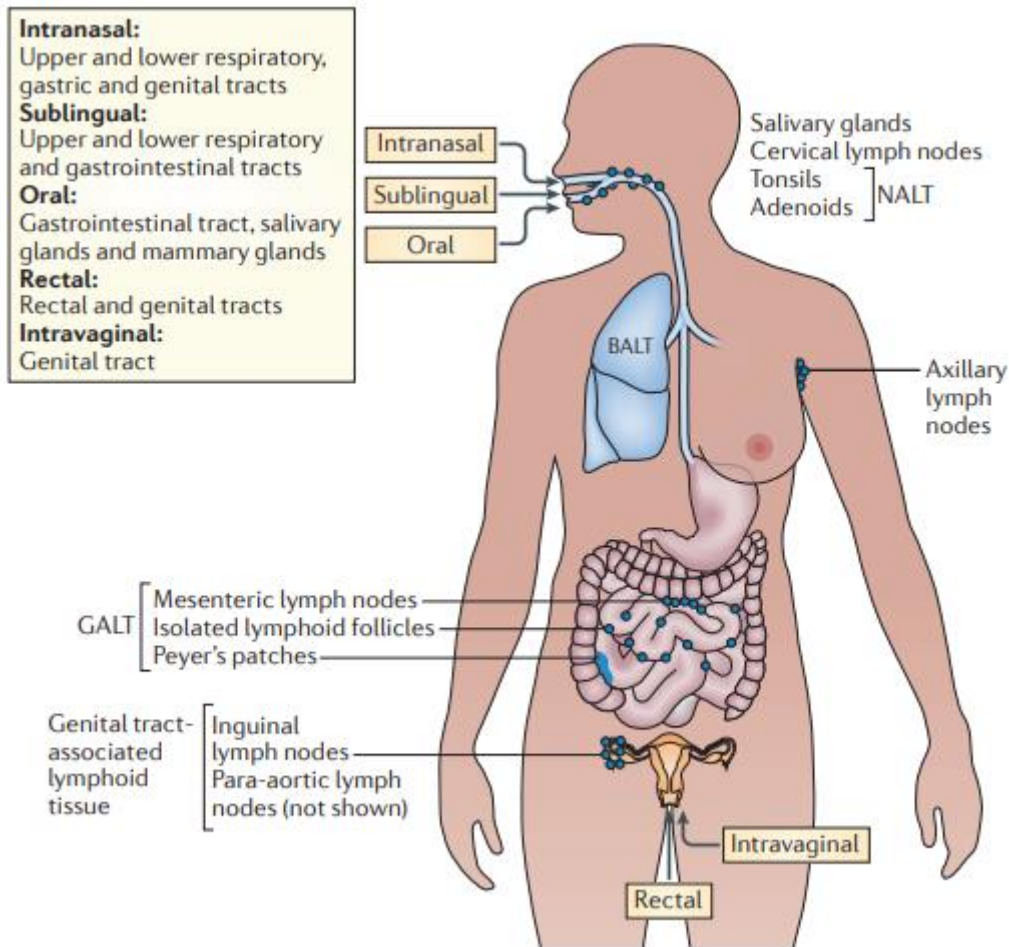


Figure 13: Les différentes voies d'administration muqueuses et leurs sites immunitaires inducteurs associés.

Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses peuvent être ciblés en choisissant une voie d'administration vaccinale appropriée i.e. la voie orale pour le GALT ou la voie nasale pour le NALT par exemple. Le ciblage des différents sites est rendu possible par l'expression de marqueurs de domiciliation sur les cellules immunitaires tels que $\alpha 4\beta 7$ par exemple qui cible l'intestin. Cependant, ces marqueurs ne sont pas totalement spécifiques et l'utilisation d'une voie permet un ciblage plus élargi. Ainsi, la vaccination intranasale est préférée pour cibler les voies respiratoires, gastriques et génitales. La vaccination orale est efficace pour l'immunité dans l'intestin et pour l'induction d'anticorps des glandes mammaires. (166).

II/ L'IGA : LE MOÏSE DE LA VACCINATION MUQUEUSE ?

Comme expliqué précédemment, les SIgA et notamment les SIgA2, sont stables dans l'intestin et peuvent être transportées de part et d'autre de l'épithélium intestinal (171). Notre équipe a démontré que les IgA sécrétoires couplées chimiquement à la protéine de capsid p24 du VIH et administrées par voie orale à des souris ciblaient spécifiquement les cellules M des PP et induisaient une réponse muqueuse humorale et cellulaire spécifique de la p24 mise en évidence par la sécrétion d'IgA et de cytokines pro-inflammatoires (172). De plus, une autre équipe a synthétisé une protéine fusion comprenant le fragment variable d'une IgA spécifique de la protéine GP2 exprimée par les cellules M et une partie streptavidine. Ce vecteur conjugué à un lysat de *S. Typhimurium* biotinylé et administré oralement a induit une réponse muqueuse humorale protectrice contre *Salmonella* notamment via la sécrétion d'IgA spécifiques (173). Grâce à leurs fonctions intrinsèques, les IgA sont donc des candidats potentiels comme vecteurs vaccinaux contre des pathogènes entériques au même titre que les nanoparticules protéiques ou lipidiques (Annexe I).

Dans le cas d'un modèle murin, l'utilisation d'IgA murine semble la plus pertinente. Les IgA murines ont la même structure globale que les IgA humaines (174) mais leur région charnière est tronquée (175). Ceci pourrait expliquer leur résistance dans l'environnement intestinal, comme observé avec les IgA2 humaines. Cependant, les souris ne présentent pas le même profil d'expression des récepteurs aux IgA. En effet, elles n'expriment pas le Fc α RI (176) et seulement les homologues de DC-SIGN specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin receptor (SIGNR)-1 et 3 (139) (177), mais expriment Dectin-1 (178) et le récepteur à la transferrine. A noter que Siglec 5 est aussi absent chez la souris mais qu'il existe l'orthologue murin Siglec F dont l'expression est très différente de la molécule humaine (12).

Bien que les IgA semblent extrêmement adaptées pour une utilisation en vaccination muqueuse, leur effet intrinsèque sur le système immunitaire reste peu étudié ainsi que leurs caractéristiques et fonctions dans les différents compartiments muqueux.

III/ LES IGM : VECTEUR VACCINAL ALTERNATIF OU COMPLEMENTAIRE DES IGA

Les IgM sont principalement retrouvées sous forme pentamérique dans le sang et exprimées par les LB n'ayant pas subis la commutation isotypique ni l'hypermutation somatique. Elles sont caractérisées par une faible affinité pour leurs antigènes, souvent de type polysaccharidiques, et par une fonction majoritairement liée à l'activation de la voie classique du complément.

Des IgM sécrétoires (SIgM) peuvent être retrouvées dans l'intestin et les muqueuses en moins forte concentration que les IgA. Ainsi, on retrouve 70, 10 et 5 fois moins d'IgM que d'IgA respectivement dans les sécrétions nasales (79), dans le rectum (179) et dans le jujénum chez les enfants de moins de 25 ans (180). Les SIgM seraient majoritairement issues de plasmocytes IgM⁺ mémoires et auraient pour rôle de fixer les bactéries commensales au mucus intestinal avec les SIgA (181). Le lien étroit entre IgM et IgA a été confirmé puisqu'une absence d'IgA chez la souris entraîne une augmentation des IgM dans les sécrétions muqueuses et l'absence d'IgM augmente le développement de LB B-1, suggérant une compensation des ces anticorps en cas de manquement de l'un d'entre eux (26, 27, 182, 183) (28). En plus du rôle de contrôle du microbiote, des études suggèrent une protection des muqueuses, notamment de l'intestin, liée aux IgM. En effet, l'utilisation d'une SIgM chimérique spécifique d'un haptène induisait une protection contre un meningococcus du groupe B *via* la voie du complément (184). Les IgM sont aussi impliquées dans la réponse muqueuse lors des maladies diarrhéiques par exemple puisque

qu'une augmentation 5 fois plus importante du taux d'IgM que d'IgA chez les enfants est observée dans ces cas (185).

Les IgM polymériques se fixent sur des récepteurs qu'ils partagent avec les IgA dimériques à savoir le Fc α / μ R et le pIgR (186) (187). Néanmoins, un récepteur spécifique des IgM a récemment été mis en évidence chez la souris, à savoir TOSO ou Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (FAIM3) (188) connu pour être impliqué dans la survie des cellules (189). L'expression de TOSO sur les cellules de l'immunité innée telles que les granulocytes ou les macrophages reste encore controversée (190) (191) mais sa présence sur les LT humains et surtout les LB humains et murins est clairement admise (192) (193).

Au vu des caractéristiques intéressantes des SIgM, la question de leur alternative aux SIgA comme vecteur vaccinal muqueux paraît légitime. En effet, elles possèdent a priori les mêmes qualités que les IgA avec pour principal avantage de posséder 10 sites de fixation d'antigènes alors que les SIgA n'en possèdent que 4. Cependant, de légères différences avec les IgA pourraient plutôt mettre en avant les IgM comme des compléments aux IgA. En effet, (i) la présence du récepteur TOSO sur les cellules des muqueuses n'a pas encore été clairement définie bien que les données récoltées par notre équipe démontreraient la présence de TOSO sur les cellules M, permettant la transcytose inverse des IgM, (ii) leur plus faible présence dans les muqueuses laisse supposer une plus faible présence de récepteurs (iii) les SIgM sont moins résistants à la protéolyse que les SIgA (194), (iv) bien que la transcytose des IgM ait été montrée (183, 195), leur transcytose inverse reste à être démontrée (v) leur fonction repose en grande partie sur l'activation du complément alors que les IgA sont plutôt liées à l'exclusion immune.

Chapitre III : *Salmonella* comme challenge pour la vaccination muqueuse

I/ DIFFERENTES SOUCHES POUR DIFFERENTES PATHOLOGIES

Cette thèse a pour but de présenter les IgA comme un vecteur vaccinal muqueux potentiel. Nous allons voir que les *Salmonella* sont des cibles importantes pour la vaccination muqueuse. Il est nécessaire dans un premier temps de caractériser ce pathogène. Cependant de la même manière que chaque individu est différent, il en est de même avec les bactéries. Nous allons donc devoir catégoriser les bactéries *Salmonella* afin de définir les cibles d'intérêts pour mieux les analyser par la suite.

A) La classification

Le genre *Salmonella* est une grande famille d'entérobactéries pathogènes aéro-anaérobies facultatives, c'est-à-dire d'organismes procaryotes dont l'environnement le plus adapté pour une infection est l'intestin de son hôte. En forme de bâtonnet, les *Salmonella* sont des bactéries Gram négatif et possèdent donc une paroi composée de lipopolysaccharides (LPS). Des oligosaccharides peuvent être associés au LPS et sont désignés comme les antigènes O (Ag-O). Par ailleurs, les flagelles sont un assemblage de protéines qui sont désignées comme les antigènes H (Ag-H). Le schéma de Kauffmann-White en 1934 a servi de première classification pour 44 sérovars de *Salmonella*. Il a introduit deux espèces dans le genre *Salmonella* à savoir *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori* (196). L'espèce *enterica* est elle-même divisée en six sous-espèces (ssesp) : *S. enterica* ssep *enterica* (I), *S. enterica* ssep *salamae* (II), *S. enterica* ssep *arizonae* (IIIa), *S. enterica* ssep *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* ssep *houtenae* (IV) et *S. enterica* ssep *indica* (VI). Ces sous-espèces ont été classées selon différentes caractéristiques telles que leur habitat (animaux à sang chaud ou sang froid) ou leur nutrition (fermentation du lactose ou

du tartrate (197) etc..). Au sein des sous-espèces, les bactéries sont différenciées en sérovars selon des caractéristiques sérologiques à savoir l'expression des antigènes (Ag) O et H à leur surface. Cette méthode a permis de regrouper des sérovars en sérogroupes en cas d'expression d'un Ag-O commun. Par exemple, le séro groupe O:2 se caractérise par plusieurs sérovars exprimant tous l'Ag-O numéro 2 et ayant des Ag-H différents voir d'autres antigènes O. Cette méthode de classification risque néanmoins d'être remplacée par la méthode MLST (Multilocus Sequence Typing) qui permet de retrouver les différents sérovars par séquençage génétique (198). Il existe 2610 sérovars du genre *Salmonella* dont la majorité se trouvent dans l'espèce *enterica* (2557) et plus particulièrement la ssep *enterica* qui reste la plus représentée avec 1531 sérovars (197).

B) *Salmonella* et évolution : vers des bactéries extrêmement adaptées à leurs hôtes

Les 2610 sérovars se distinguent par l'expression de protéines qui vont modifier l'adaptation de chaque sérovar à son hôte ainsi que leur virulence. Cependant, une différence maximal de 4,6% entre les gènes orthologues des sérovars augure une origine commune (199). Le genre *Salmonella* se différencie d'autres bactéries telles qu'*E. coli* par l'acquisition de cluster de gènes de virulence tels que les îlots de pathogénicité de *Salmonella* (SPI) 1 et 2 lui permettant d'infecter respectivement l'intestin ou le compartiment systémique. Enfin, la sous-espèce *enterica* a acquis la capacité d'infecter un grand nombre d'espèces animales, notamment les vertébrés à sang chaud. Ce sont donc les *Salmonella enterica* ssep *enterica* (*S.ssep* I) que nous décrirons par la suite puisque nous allons voir que leur adaptation à leurs hôtes - les mammifères et les oiseaux- va être à l'origine de nombreuses problématiques pour l'Homme. Certaines *S.ssep* I peuvent induire des gastroentérites s'aggravant dans seulement 7% des cas en infection systémique. Ces bactéries sont donc caractérisées par une forte morbidité mais une faible mortalité. À l'inverse, d'autres *S.ssep* I peuvent induire une infection systémique chez l'Homme, appelée fièvre typhoïde. Cette maladie se caractérise par une plus forte mortalité que les gastroentérites induites par les autres *S.ssep* I. De plus, 1 à 4% des patients rétablis d'une fièvre typhoïde deviennent des porteurs sains

de *Salmonella* contre 0,2 à 0,6% chez les patients rétablis d'une gastroentérite. Cette adaptation est due à l'acquisition des SPI-1 et 2 mais aussi d'autres gènes présents notamment dans l'opéron *spv* (*Salmonella* plasmid virulence) transmis par transfert horizontal (199). L'adaptation n'est pas qu'une question d'ajout de caractéristiques, puisqu'une étude a montré que des *Salmonella* très spécialisées pour leur hôte présentaient un génome plus dégradé qu'une *Salmonella* moins spécialisée, notamment avec l'apparition de pseudogènes (200). Dans ce sens, une dégradation du génome des *Salmonella* persistantes a été montré chez des personnes immunodéficientes, les définissant comme de possibles réservoirs pour l'évolution de *Salmonella* (201). Ainsi, les *Salmonella enterica* ssp *enterica* sont parfaitement adaptées à leurs hôtes, leur permettant une infection efficace.

Environ 200 types de maladies alimentaires dues à des toxines, des virus, des parasites ou des bactéries ont été recensées (Linscott A.J, Clin. Microbiol. Newsl, 2011) (WHO). Les bactéries *S. ssp* I sont les principales responsables de ces maladies chez l'Homme et les animaux et induisent quatre types de syndromes cliniques : (i) des sérovars tels que *S. Typhimurium* et *Enteritidis* induisent des gastroentérites, (ii) ces gastroentérites peuvent se compliquer en bactériémie pouvant entraîner des ostéomyélites notamment chez les enfants atteints d'hémoglobinopathies (202), (iii) des sérovars tels que *S. Typhi* et *S. Paratyphi* induisent la fièvre typhoïde, (iv) des patients préalablement infectés peuvent devenir porteurs sains suite à la persistance de *Salmonella* dans la vésicule biliaire grâce à des mécanismes tels que la mise en place de biofilms (203). Les cas (ii) et (iv) étant des conséquences d'une primo-infection par *Salmonella*, nous ne les aborderons pas dans notre étude qui vise à lutter contre l'infection à *Salmonella* via la vaccination.

C) La fièvre typhoïde

Les premières références à la fièvre typhoïde datent dès l'antiquité lors de la « Peste d'Athènes », une épidémie ayant touchée la Grèce de 430 à 426 avant J.-C. Cette période de l'Histoire a été relatée par Thucydide (*The History of the Peloponnesian War*, Library of Alexandria, Athens, Greece) qui décrit les symptômes par « de violentes chaleurs à la tête ; (des) yeux [...] rouges et enflammés » puis « le mal s'attaquait à l'estomac [...], avec des souffrances aiguës, toutes les sortes d'évacuation de bile [...] ». De manière intéressante, il avait déjà observé ce qui servira plus tard de prémices à la vaccination à savoir que « ceux qui en réchappent ne sont pas atteints une seconde fois de façon mortelle ». Des traces de cette maladie se retrouvent également au début du XX^{ème} avec le cas de Mary Mallon, qui lui valut le surnom de Mary Typhoïde par la suite (204, 205). Cette Irlandaise fut embauchée en tant que cuisinière par un riche banquier New-yorkais lorsqu'elle débarqua aux Etats-Unis en 1884. Par malchance, elle était porteuse saine de l'agent causal de la maladie et elle fut à l'origine de plus d'une cinquantaine de cas de fièvres typhoïdes par des transmissions *via* la nourriture, entraînant le décès de trois personnes. La malheureuse fut mise en quarantaine jusqu'à la fin de ses jours.

Ainsi, la fièvre typhoïde se transmet par voie oro-fécale soit d'individu à individu, soit par ingestion d'eau et d'aliments contaminés. Après 14 jours d'incubation, elle se caractérise par une infection systémique causant une forte fièvre, une anorexie et des douleurs abdominales (diarrhée ou constipation), pouvant entraîner la mort dans 1% des cas. Sans traitement, la maladie peut s'aggraver, aboutissant à des pneumonies ou des complications cérébrales, multipliant le taux de mortalité par dix. La principale bactérie causale de la maladie chez l'Homme - *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*) - a été observée puis isolée respectivement par Karl J. Erberth et Georg Gaffky en 1880 après une étude approfondie de William Budd. En plus de *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B et C sont également responsables de fièvres typhoïdes. Ces sérovars infectent exclusivement l'Homme. Les sérovars *S. Typhi* et *Paratyphi* A étant les plus impliqués dans des cas chez l'Homme, ils ont été

les plus étudiés. En plus des différences antigéniques (ils appartiennent respectivement aux sérogroupes O:9 (D1) et O:2 (A)), une étude s'est penchée sur les différences génomiques entre ces sérovars (206). Une plus faible présence de pseudogènes chez *S. Paratyphi A* (173) comparé à Typhi (219) tendrait à dire que *S. Paratyphi A* a dérivé plus récemment que Typhi. Par ailleurs, 24 régions sont présentes chez Typhi et absentes chez *S. Paratyphi A*, notamment le SPI-7 responsable de la formation de la capsule polysaccharidique Vi (Vi-CPS) entourant la bactérie. Cette capsule est donc seulement présente à la surface de *S. Typhi*, la protégeant des agressions extérieures et limitant sa reconnaissance par le système immunitaire (207) (208) (209). *S. Paratyphi A* possède aussi une douzaine d'insertions absentes chez *S. Typhi*. Ainsi, même si *S. Paratyphi A* et *S. Typhi* sont globalement très proches, expliquant leur restriction à l'Homme, leurs génomes ne sont pas totalement similaires et vont être responsables à la fois d'une expression antigénique (Vi-CPS par exemple) et d'une virulence différentes à prendre en compte pour l'élaboration d'un vaccin.

D) Les gastroentérites induites par *Salmonella*

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle, des cas de gastroentérites ont été associés à des bactéries du genre *Salmonella*. 56 cas d'empoisonnements alimentaires en 1888 dont un décès ont permis l'isolation de la bactérie *S. Enteritidis* chez les vaches d'où provenait la viande consommée (210). L'isolement d'une autre *Salmonella* responsable d'empoisonnement alimentaire - *S. Typhimurium* - a été réalisé en 1896 (210). Ces gastroentérites induites par *Salmonella* se sont caractérisées par de la fièvre, des diarrhées, des vomissements et des douleurs abdominales après 6 à 72h d'incubation (Institut Pasteur). Les deux sérovars responsables de la plupart des cas de gastroentérites chez l'Homme sont *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*. Par opposition aux *Salmonella* typhoïdiques (ST), les *Salmonella* responsables de gastroentérites sont classées dans la catégorie des *Salmonella* non typhoïdiques (SNT). Par ailleurs, les sérovars *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* sont des SNT invasives (SNTi) car dans 5% des cas, elles peuvent envahir le

système sanguin et se propager dans l'hôte de manière systémique. Cette complication s'observe le plus souvent chez les individus immunodéprimés et se caractérise par une forte bactériémie et une aggravation des symptômes pouvant conduire à des méningites, de l'arthrite septique, des ostéomyélites, des cholangites ou des pneumonies, augmentant le taux de mortalité jusqu'à 25-30%. Ainsi, une étude a montré que ces complications apparaissaient chez des enfants immunodéprimés dans 28% des cas alors qu'elles n'apparaissent que dans 3,8% des cas chez les enfants immunocompétents (211). L'impact des SNTi est encore plus important chez les adultes puisqu'une étude portant sur 172 cas d'infection par des *Salmonella* invasives montra une mortalité de 16% alors qu'elle était de 1,4% chez les enfants dans l'étude du Dr Zaidi (212).

II/ LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS...

Une fois qu'un individu a été contaminé par l'un des sérovars pathogènes de *Salmonella* par voie oro-fécale, son système immunitaire va tenter de lutter contre l'infection. Dans le cas où le système immunitaire n'a pas réussi à faire son travail, il faut aider le patient à combattre l'infection.

A) ...Atteints de fièvre typhoïde

Individus à risque chez ST

Le patrimoine génétique d'un individu va le rendre plus susceptible aux ST si des gènes de l'immunité aussi bien innée qu'adaptative sont mutés. Des anomalies dans la sécrétion de cytokines comme l'IFN- γ , dans la présentation de récepteurs de l'immunité innée tels que les TLR, dans la production de LT et LB ont été décrit comme augmentant le risque d'être infecté par des ST (213). Au contraire, des individus peuvent posséder un système immunitaire particulièrement efficace pour lutter contre *Salmonella*. Une étude portant sur trois cohortes de

patients atteints de fièvre typhoïde a mis en évidence le rôle de l'allèle HLA-DRB1 04:05 du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II) dans la résistance aux ST (214).

Diagnostic et traitement de la fièvre typhoïde

Un cas de fièvre typhoïde est avéré après un examen clinique permettant d'observer les symptômes décrits plus haut, mais plusieurs outils permettent de clairement identifier les agents en cause (215). Une leucopénie accompagnée d'éosinopénie ainsi que la présence de *S. Typhi* ou *Paratyphi* peuvent être confirmées par des cultures de sang, de moelle épinière et de selles. L'identification de bactéries sur milieux restrictifs nécessite au moins 48h d'incubation et leur sensibilité est variable (40 à 80% pour le sang et moins de 40% pour les fèces). Le test d'agglutination de Widal permet aussi de déterminer quelle souche est responsable de la maladie grâce à la détection des Ag-O et H. Un ELISA est aussi possible pour quantifier le taux d'anticorps anti-*Salmonella* Typhi ou Paratyphi. Ces méthodes sont toutefois lentes (au moins un jour pour obtenir les résultats), peu sensibles et le test de Widal est souvent sujet aux faux positifs. Ainsi, de nouveaux outils tels que la PCR sur le gène de la flagelline *FliC* - qui permet de différencier *S. Typhi* (*FliC-d*) et *S. Paratyphi A* (*FliC-a*) - ont été mis en place pour obtenir un diagnostic clinique plus rapide et ainsi traiter au plus tôt la maladie.

Une résolution spontanée peut avoir lieu avec une bonne réhydratation. Sinon, plusieurs antibiotiques sont utilisés pour réduire la mortalité à 1% (initialement à environ 10-20%). Historiquement l'ampicilline, le chloramphénicol, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, l'amoxicilline et la ciprofloxacine étaient les antibiotiques les plus utilisés. Maintenant la ciprofloxacine (fluoroquinolone), la ceftriaxone ou la cefotaxime (céphalosporine) ou encore la cefixime leurs sont préférées. Des cibles thérapeutiques chez *S. Typhi* sont toujours recherchées puisqu'une étude a par exemple trouvé 20 protéines essentielles pour *Salmonella* Ty2 et non présentes chez l'Homme qui pourraient être de bons candidats (216).

B) ...Atteints de gastroentérites induites par *Salmonella*

Individus à risque chez SNT

Les causes de susceptibilité aux SNT sont les mêmes que pour les ST. Cela paraît logique puisque leur mode d'infection est globalement identique et que la principale différence réside dans le fait que les ST vont se propager de manière systémique et non pas se cantonner au site d'infection à savoir l'intestin. Cependant, l'environnement génétique peut faciliter l'infection des SNT au niveau systémique. Des enfants présentant un variant du gène STAT4 vont par exemple être plus sensibles à une infection par des SNTi du fait d'une moins bonne réponse immunitaire (217). Par ailleurs, des pré-infections par des pathogènes immunosuppresseurs vont faciliter l'infection à *Salmonella*. Les co-infections entre la malaria et les SNTi sont donc très souvent rencontrées chez les enfants en particulier en Afrique Sub-saharienne (218, 219) et l'infection par le VIH facilite l'infection par les SNTi telle que *S. Enteritidis* (220) (221).

Diagnostic et traitement de la gastroentérite

Il est difficile de distinguer une gastroentérite induite par *Salmonella*, dont les symptômes se rapprochent de ceux observés après une infection par *Shigella* ou des *E. coli* entérohémorragiques. De même des splénomégalies et hépatomégalies sont observées chez les enfants mais peuvent être confondues avec une autre infection combinée à la malaria, souvent observée dans les pays touchés par les SNTi (215). Par ailleurs, il est difficile de diagnostiquer les SNTi, du fait de leur faible présence dans le sang et de leur similarité avec les ST rendant par exemple le test de Widal peu utile. Peu d'outils sont donc actuellement utilisés et la mesure des anticorps anti-LPS des SNTi reste le plus sensible (70 à 95%). Face aux limites des méthodes de diagnostic en cas d'infection à *Salmonella*, de nombreuses études ont été menées sur l'amélioration de la rapidité, de la sensibilité et de la spécificité des différentes méthodes existantes (215, 222-224). De nouvelles méthodes ont également fait leur apparition comme le « screening » des ARNm ou l'utilisation de bactériophages (225).

Les gastroentérites se résolvent généralement spontanément et une réhydratation riche en électrolytes est généralement indiquée dans les cas les plus sévères. La prescription d'antibiotiques est controversée dans le cas des *Salmonella* inductrices de gastroentérites. En effet les symptômes ne permettant pas de les distinguer d'autres pathogènes intestinaux, le choix des antibiotiques à administrer est difficile dans le cas d'une atteinte sévère devant être rapidement prise en charge. Par ailleurs il a été montré qu'un traitement combiné d'ampicilline et d'amoxicilline chez des enfants atteints de gastroentérites induites par *Salmonella* prolongeait et aggravait la maladie, par rapport à des enfants traités avec un placebo (226). En plus de cela, l'utilisation de quinolones n'a qu'un léger effet protecteur sur *Salmonella* (227). Une étude prospective a conclu qu'il était difficile d'observer un réel effet sur les gastroentérites induites par les SNT (228). En conclusion, l'utilisation d'antibiotiques tels que le triméthoprim-sulfaméthoxazole, les fluoroquinolones ou les céphalosporines de troisième génération est principalement utilisée pour des cas sévères ou sur des patients à risque pour des infections invasives.

Tout comme les ST, les SNTi peuvent persister chez l'hôte une fois l'infection enrayée, notamment dans la vésicule biliaire (203). Ce phénomène est problématique puisqu'il maintient une population de porteurs sains susceptibles de contaminer d'autres individus après l'hospitalisation. Par ailleurs, il a aussi été montré qu'une infection par SNTi chez un enfant augmentait son risque de contracter une maladie intestinale une fois adulte (229).

III/ ÉPIDEMIOLOGIE

A) Les *Salmonella* typhoïdiques touchent l'Afrique et surtout l'Asie du Sud-Est

L'Homme est majoritairement en contact avec d'une part d'autres Hommes et d'autre part des mammifères et des volatiles, que ce soient des animaux domestiques ou d'élevage. Il se trouve

que ces êtres vivants sont les hôtes respectifs de *S. Typhi* et *S. Paratyphi A* (également capables d'infecter l'Homme), les principaux agents responsables de la fièvre typhoïde. Comme toute maladie alimentaire, sa propagation va être liée aux conditions d'hygiène, aussi bien durant l'élevage (antibiotiques), dans les structures de production de nourriture animale (abattoirs...), ainsi qu'après (conservation des aliments). La transmission se faisant par voie oro-fécale, un accès à l'eau potable et au matériel diminuant les risques de contamination (lavage des mains, cuisson de la nourriture) est aussi nécessaire. Il en résulte que les principaux foyers épidémiques vont se situer dans des pays en voie de développement tels qu'en Amérique du Sud ou en Afrique avec une plus forte propension en Asie du Sud-Est (**Figure 14**).

Des études épidémiologiques ont estimé entre 11 et 26,9 millions le nombre de cas de fièvres typhoïdes par an, avec une plus forte incidence de *S. Typhi* (725/100 000) que *S. Paratyphi* (77,4/100 000) en Afrique subsaharienne (230, 231). À noter que l'incidence en Europe reste très faible (0.1/100 000) (230). Le nombre de décès est quant à lui estimé entre 120 000 et 220 000 par an (231). Ces chiffres restent des estimations et seraient a priori sous-estimés (232). Ainsi, la fièvre typhoïde représente environ 1% des décès annuels dans le monde (233) (**Figure 15**).

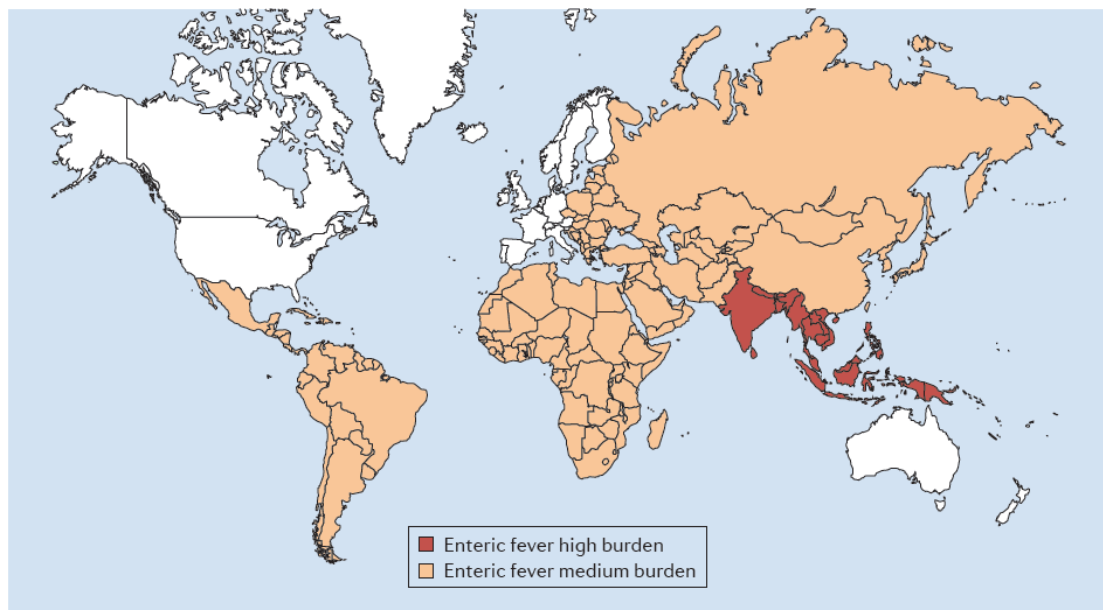


Figure 14: Distribution des cas de fièvre typhoïde dans le monde en 2014.

Les pays présentant plus de 100 cas pour 100 000 habitants sont considérés comme fortement touchés (rouge) et les pays comprenant entre 10 et 100 cas pour 100 000 habitant sont moyennement touchés (orange). Figure tirée de la revue publiée par Gilchrist et al (213)

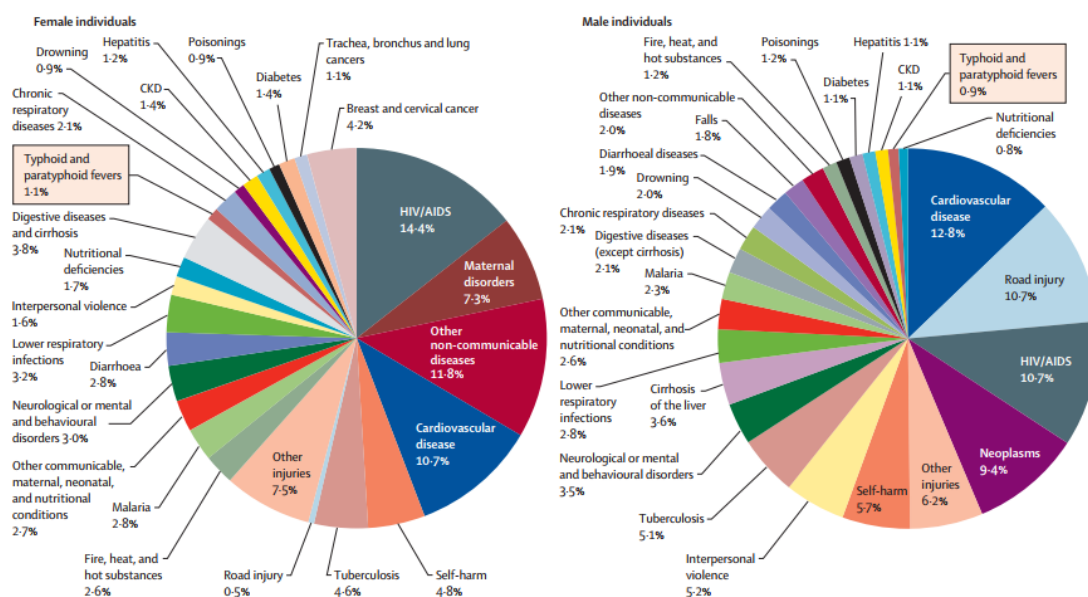


Figure 15: Les Salmonella typhoïdiques représentent 1% de la mortalité mondiale en 2012, sans distinction entre les sexes.

Figure tirée de la revue publiée par Wain et al, (233)

B) Les *Salmonella* non-typhoïdiques touchent en grande majorité l'Afrique Subsaharienne

Le mode de transmission des SNT est le même que pour les ST sauf que les nombreux sérovars composant les SNT infectent un grand nombre d'espèces, augmentant le risque de contamination *via* les animaux (234) (**Figure 16**). Les facteurs augmentant la transmission sont donc les mêmes que pour les ST. Étant donné que ces bactéries se transmettent par voie *oro-fécale*, des facteurs liés à l'environnement peuvent augmenter le risque de transmission d'un individu à l'autre. On retrouve ainsi l'eau, la nourriture, le contact avec un animal ou un humain contaminés ou encore l'hospitalisation comme principales sources de contamination (235). Il est difficile de chiffrer le nombre de gastroentérites induites par les SNT car : (i) les malades ne se présentent pas tous chez le médecin, (ii) tous les malades n'ont pas accès à un médecin, (iii) la détermination de l'agent causal des gastroentérites est rendue difficile par les méthodes décrites plus haut. Une étude a néanmoins réussi à estimer le nombre de cas par an à 93,8 millions et 155 000 décès en 2010 (236). Il faut par ailleurs distinguer les SNTi dont la mortalité est plus importante puisqu'une étude en 2010 a estimée à 3,4 millions de cas dont 1,9 millions d'enfants de moins de 5 ans avec un taux de mortalité de 20% chez ces enfants (237). Ces chiffres ont été confirmés par une étude plus récente qui montre que les principaux SNTi sont *S. Typhimurium* et *Enteritidis* (238).

Cattle																			
Pigs																			
Small ruminants																			
Horses																			
Dogs & cats																			
Rodents																			
Wildlife																			
Galliform birds																			
Anseriform birds																			
Non-domestic birds																			
Reptiles & amphibians																			
Fish																			
	Typhimurium	Enteritidis	Newport	Heidelberg	Javiana	4,5,12:i-	Montevideo	Muenchen	Oranienburg	Mississippi	Saintpaul	Braederup	Agona	Infantis	Thompson	Paratyphi B	Stanley	Tennessee	Hadar

Figure 16: Les 20 sérovars de *Salmonella non-typhoïdiques* les plus communs sont capables d’infecter un grand nombre d’espèce animale (2006).

Notamment, *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* ciblent les mammifères, les oiseaux et les reptiles. Figure tirée de la revue de Hoelzer et al. (234).

La plupart des facteurs aggravant la transmission des SNT sont retrouvés en Afrique subsaharienne, zone endémique pour les SNT et en particulier les SNTi (**Figure 17**) (235). Ces dernières induisent un décès dans 4 à 27% des cas de gastroentérites chez les enfants et dans 22 à 47% des cas chez les adultes hospitalisés. En adéquation avec l’accès aux structures favorisant une hygiène acceptable, le nombre de cas de gastroentérites en Afrique rurale est environ 4 fois plus important qu’en milieu urbain. En parallèle, il a été montré que les enfants de moins de 5 ans étaient les plus touchés (239, 240). Un des principaux facteurs aggravants est la co-infection par des agents immunosuppresseurs tels que les agents responsables de la malaria ou du syndrome d’immunodéficience humaine (SIDA) (241). Par exemple, le VIH créé un contexte propice à l’apparition de nouvelles souches comme cela a été montré chez des individus atteints du SIDA et infectés par *S. Enteritidis* suivis sur 15 ans (201). L’environnement de ces zones endémiques est donc favorable à l’apparition de nouvelles souches et cela a été démontré avec la découverte

de la souche ST313 de *S. Typhimurium* en 2012, fortement adaptée à l'Homme et de plus en plus retrouvée en Afrique (242). Cette souche présente de nombreuses délétions la rapprochant de *S. Typhi*, résultant principalement en l'absence de biofilm (243) et en sa capacité à induire des septicémies chez les enfants (242).

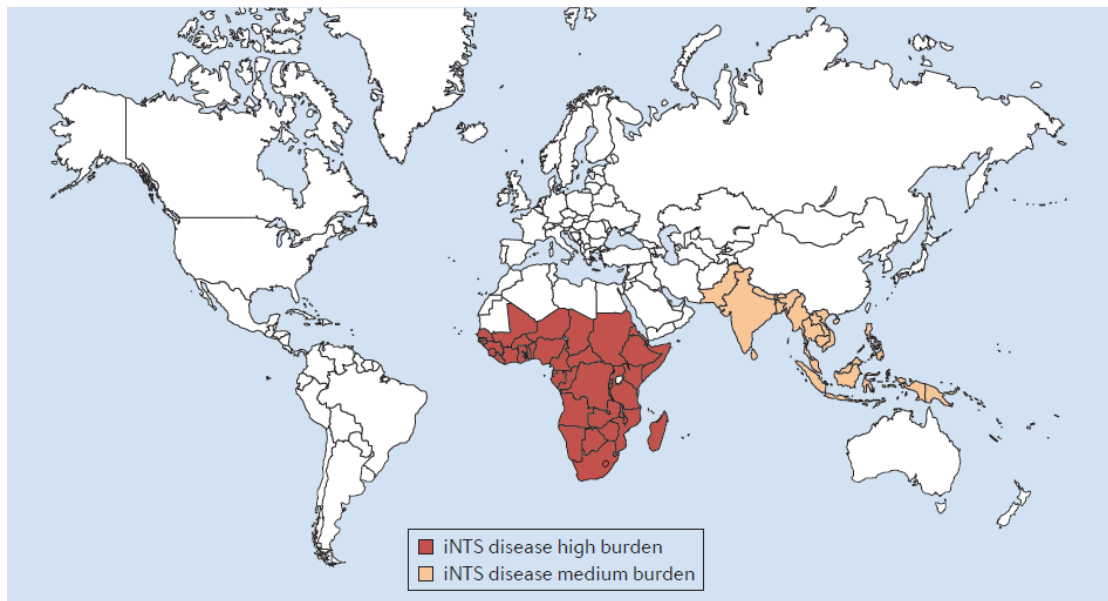


Figure 17: Distribution des cas de gastroentérites induites par les *Salmonella* invasives non-typhoïdiques dans le monde en 2014.

Les pays présentant plus de 100 cas pour 100 000 habitants sont considérés comme fortement touchés (rouge) et les pays comprenant entre 10 et 100 cas pour 100 000 habitant sont moyennement touchés (orange). Figure tirée de la revue publiée par Gilchrist et al (213)

Même si leur impact reste anecdotique dans les pays développés, plusieurs cas épisodiques ont eu lieu du fait de la production intensive des animaux d'élevage et/ou lors d'un manquement aux procédures d'hygiènes relatives à la nourriture. On note ainsi des cas en Australie en 2010(244), 23 cas en Italie en 2011 (245) ou encore en France en 2015 (246) et plus récemment en 2017 avec 37 nourrissons contaminés *via* du lait infantile, conduisant à l'hospitalisation de 18 d'entre eux (247).

L'impact des infections par *Salmonella* est un enjeu majeur de santé publique. C'est donc unanimement que les études s'accordent à dire que des solutions doivent être trouvées rapidement pour améliorer le diagnostic mais aussi le traitement contre les ST et SNT, en particulier pour les enfants des pays en voie de développement (248, 249) (250).

IV/ L'APPARITION DE SOUCHES MULTI-RESISTANTES

A) Épidémiologie

De nombreuses études se sont penchées sur les infections par les SNTi car fortement mortelles chez les enfants de moins de 5 ans. Ainsi il a été montré que chez les enfants fragilisés par la malaria et infectés par des SNT, 33,6% des isolats étaient des souches multi-résistantes (MDR) (251). Cette résistance concerne de nombreux antibiotiques et peut dépasser les 90% de résistance comme nous le montre le tableau récapitulatif d'études de MDR de SNT au Nigéria (252) (**Table 4**). Depuis, les preuves de cas de MDR ne cessent d'apparaître. C'est le cas pour *S. Typhimurium* avec par exemple le variant 1,4,[5],12:i:-, fortement retrouvé en Chine et qui présente des résistances à l'ampicilline, la streptomycine, les sulfamides et la tétracycline (253). La souche MDR stable *S. Typhimurium* DT104 est issue du réservoir animal, soulignant un rôle critique du pan vétérinaire dans l'apparition de souches MDR affectant l'Homme (254). De manière préoccupante, une étude sur le poulet a montré que *S. Typhimurium* pouvait transmettre sa résistance à la bactérie *E. coli* de l'animal (255). Des souches de *S. Enteritidis* possédant les caractéristiques d'une adaptation telles qu'un génome dégradé et une forte résistance aux antibiotiques ont aussi pu être répertoriées en Afrique Sub-Saharienne (256).

Table 4 : De nombreuses souches de *Salmonella non-typhoïdiques* ont été reportées avec des multi-résistances aux antibiotiques en Afrique, notamment au Nigéria en 2016.

Figure tirée d'un article publié par Smith et al. (252)

Antibiotics	% resistance	Year(s)
Amoxicillin	91.3, 55.6	2007, 2014
Ampicillin	86.9, 94.2	2007, 2014
Cefuroxime	55.5	2014
Cephalexin	55.6	2014
Co-trimoxazole	91.3, 31.8	2007, 2014
Nalidixic acid	4.9	2014
Amoxicillin–clavulanic acid	22.2	2014
Chloramphenicol	72.8	2014
Streptomycin	82.6	2007
Ciprofloxacin	14.8, 30.4	2000, 2007

Les ST sont aussi concernées puisque des souches MDR ont été observées dès 1997(257) pour la plupart des antibiotiques utilisés contre *Salmonella*. Depuis, de nombreuses résistances ont pu être répertoriées (258) par exemple en Asie où le plasmide de résistance IncHII a pu être observé dans de nombreux cas d'infection à *S. Typhi* (259)(**Table 5**). La transmission de MDR permet aux bactéries de coloniser différents continents (260), résultant en une propagation des MDR dans le monde entier et faisant place à l'émergence de nouvelles résistances (233, 261) (262) (**Figure 18**).

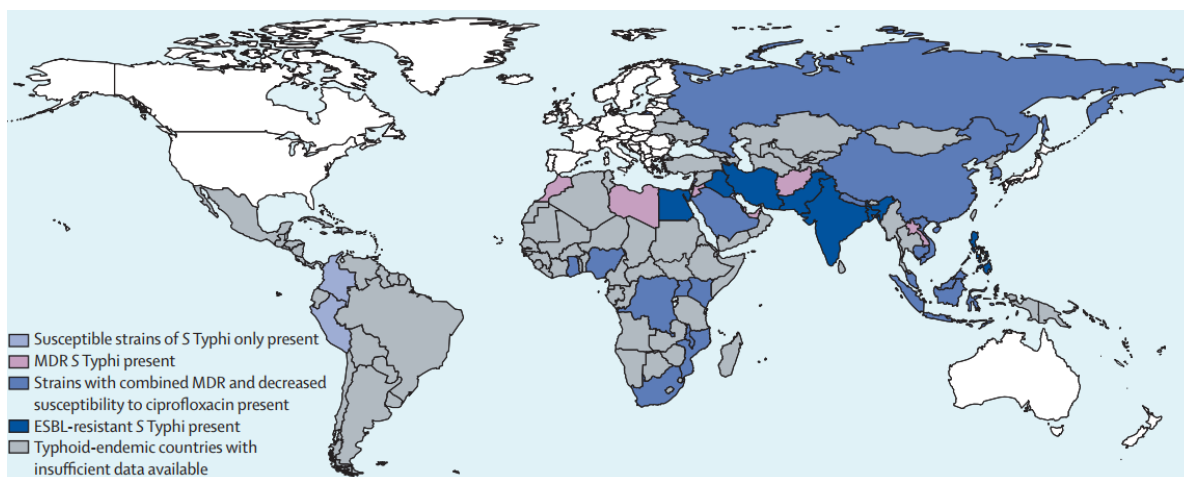


Figure 18 : Plusieurs pays sont concernés par l'apparition de souches de Salmonella typhoïdiques MDR.

Une MDR est définie par sa résistance à l'ampicilline, au co-trimoxazole, et au chloramphénicol. MDR=souche multi-résistante. ESBL=Bêtalactamases à spectre élargi. Figure tirée de la revue publiée par Wain et al,(233)

Table 5: Les MDR des Salmonella typhoïdiques ne possèdent pas forcément le même profil de résistance pour des pays situés dans une même zone géographique, ici en Asie du Sud-Est.

Ceci indique une très forte variabilité qui rend la gestion des multi-résistances extrêmement complexe. Figure tirée de l'article publié par Chiou et al (259)

Antimicrobial	% of isolates with resistance				
	Bangladesh (n = 38)	Indonesia (n = 55)	Taiwan (n = 36)	Vietnam (n = 51)	Total (n = 180)
Aztreonam	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cefotaxime	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ceftazidime	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Imipenem	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Nalidixic acid	81.6	1.8	0.0	19.6	23.3
Ciprofloxacin	39.5	0.0	0.0	0.0	8.3
Gentamicin	0.0	1.8	0.0	0.0	0.6
Kanamycin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ampicillin	68.4	1.8	2.8	80.4	38.3
Chloramphenicol	57.9	3.6	0.0	80.4	36.1
Streptomycin	60.5	3.6	0.0	80.4	36.7
Sulfamethoxazole	68.4	3.6	2.8	80.4	38.9
Tetracycline	21.1	3.6	2.8	84.3	30.0
Trimethoprim	57.9	1.8	2.8	80.4	36.1

B) Mécanismes

Les mécanismes d'obtention de résistance sont très nombreux et restent encore peu clairs. Il est néanmoins admis que la résistance peut se transmettre *via* des plasmides aussi bien pour *S. Typhimurium* avec le plasmide de virulence pSLT (263) que pour *S. Typhi* (264) avec le plasmide IncHI1 (265) ou encore pour la résistance à la quinolone chez *S. Enteritidis* (266). Un lien a d'ailleurs été démontré entre la virulence et la résistance de *Salmonella*. En effet, le coût métabolique de la virulence retarderait la croissance des bactéries, augmentant la résistance aux antibiotiques (267). Une autre étude a aussi mis en évidence l'impact d'une croissance lente de la bactérie dans la tolérance aux antibiotiques, mais l'explique par les variations phénotypiques d'une souche dans un même individu (268). Plusieurs variants apparaîtraient après l'infection et certains auraient une croissance retardée, favorisant leur résistance aux antibiotiques. Les prophages peuvent aussi être liés à l'évolution des bactéries *Salmonella* par l'échange de matériel génétique. Il a d'ailleurs été montré que l'inflammation augmentait le transfert horizontal de prophages entre sous-espèces de *Salmonella* (269). Enfin, *Salmonella* peut former des vésicules de membrane externe (OMV) qui peuvent servir au largage de protéines inutiles, à la sécrétion de toxines mais aussi au transfert horizontal de gènes (270).

Les mécanismes permettant à *Salmonella* de résister aux antibiotiques n'ont pas encore été tous éclaircis. Néanmoins, on sait par exemple que *Salmonella* possède 5 pompes à efflux jouant un rôle dans la MDR en limitant l'action des antibiotiques (271). On peut imaginer que certains mécanismes utilisés par d'autres bactéries MDR sont utilisés aussi par *Salmonella* comme l'inhibition de l'entrée des drogues ou leur dégradation. De manière intéressante, il a été décrit que *Salmonella* peut utiliser le microbiote, comme la sécrétion d'indole par *E. coli*, pour augmenter sa résistance aux antibiotiques (272).

Ici, nous voyons que l'utilisation d'antibiotiques, bien qu'efficace au demeurant, atteint ses limites du fait de l'apparition de souches MDR. La vaccination devrait limiter le recours aux antibiotiques. Une étude a modélisé un impact significatif d'un programme de vaccination tel que celui de la grippe chez la population jeune, confirmant l'intérêt de la vaccination contre *Salmonella* (273).

Afin d'éviter les redondances, seuls les sujets non traités dans la revue (274) et des compléments permettant de clarifier le sujet de thèse seront abordés par la suite.

Chapitre IV : Les obstacles à la vaccination contre Salmonella

Les *Salmonella* sont des pathogènes accidentels, impliquant qu'ils peuvent survivre en dehors de leur hôte plusieurs semaines en milieu sec et plusieurs mois en milieu humide. Cependant, l'essentiel de leur activité va être tournée vers l'infection de leurs hôtes. Analyser les étapes et les outils utilisés par *Salmonella* pour infecter son hôte peut mettre en évidence des cibles antigéniques pour un vaccin ou encore déterminer le meilleur moyen de vacciner pour induire une réponse immunitaire induisant une protection optimale.

I/ DIFFERENCES ENTRE ST ET SNT

Comme décrit précédemment, les sérovars pathogènes de *Salmonella* peuvent être divisés en deux catégories, ST et SNT. Nous verrons dans un premier temps les principales différences dans leur pathogénicité et dans un second temps, nous soulignerons les fortes similitudes dans leur processus infectieux qui vont permettre de mettre en évidence des cibles communes pour la création d'un vaccin multivalent.

A) Les différences génétiques

Du fait de son utilisation en tant que vaccin commercialisé, la souche Ty2 de *S. Typhi* est très étudiée, notamment pour l'analyse des gènes de ce sérovar. Elle comporte un génome de 4780 kb qui a été comparé, notamment *via* les sites de restriction, au génome de la souche LT2 de *S. Typhimurium* (275). Bien que la présence de séquences communes entre *S. Typhi* et *S. Typhimurium* suggère des fonctions communes conservées (206), un réarrangement de certains gènes est observé chez *S. Typhi*. Par exemple, la présence du locus *viaB*, responsable de la synthèse du Vi-CPS, a pu être identifiée chez Ty2 et non chez LT2. Par ailleurs 30 gènes ont été retrouvés mutés chez Typhi et Paratyphi A comparés à Typhimurium (206). Ainsi, ces gènes pourraient être impliqués dans des fonctions qui ne sont plus retrouvées chez ces deux sérovars à savoir l'infection à d'autres hôtes que l'Homme, ou la gastroentérite. A l'inverse 129 gènes (dont le SPI-2) apparus par transfert horizontal ne sont pas présents chez *S. Typhimurium* et seraient donc impliqués spécifiquement dans la fièvre typhoïde (206). Une étude comparative des génomes de 8 souches de ST et 27 génomes de SNT a mis en évidence 88 familles de protéines absentes chez les SNT et présentes dans au moins deux ST mais surtout chez *S. Typhi*. Ces protéines sont liées à la synthèse de Vi, à l'export, à l'assemblage du pilus et pourraient avoir une fonction dans l'apparition de fièvre typhoïde (276, 277). Une étude sur les mutations telles que les SNP (single nucleotide polymorphism) dans le génome de différentes souches de *S. Typhi* a montré une homogénéité avec une tendance à la perte de gènes corrélée à une meilleure adaptation à son hôte (278).

B) Les principales différences structurales et protéiques

Les différences génétiques entre les ST et SNT vont se refléter sur la panoplie de protéines produites par ces deux familles de *Salmonella*. La principale différence repose sur la capsule Vi présente sur *S. Typhi* et absente des SNT. Cette capsule induit une diminution de l'inflammation au niveau de l'infection locale et facilite l'infection systémique. En effet : (i) elle masque les

antigènes fortement reconnus tels que le LPS et la flagelline, (ii) elle inhibe directement l'inflammation en ciblant par exemple l'IL-8 (207). *S. Typhimurium* ne possède pas de capsule Vi mais une capsule polysaccharidique du groupe IV sécrétée dans la vésicule biliaire, et qui sert à la formation de biofilms permettant sa persistance dans l'organisme (279, 280). Une deuxième différence porte sur la toxine typhoïde (TT) découverte chez *S. Typhi*. Elle fait partie de la famille des Cytolethal distending toxin (CDT) et sa fonction est assurée par l'enzyme CdtB en association avec les protéines PltA et PltB (281, 282). La toxine n'est activée que lors de l'infection de la cellule hôte et va induire une cytotoxicité en dégradant l'ADN des cellules (282, 283). Sa production et son rôle sont de plus en plus étudiés (284, 285), permettant de conclure à l'absence de cette toxine chez les SNT, hormis un homologue approchant pour le sérovar *S. Javiana* (286).

D'autres différences existent, jouant un rôle dans la virulence des bactéries mais ne rentrant pas en compte dans la formulation d'un vaccin, elles ne seront donc pas abordées ici. Par ailleurs, il est nécessaire de rappeler que bien que des protéines soient conservées entre des sérovars avec des fonctions similaires, leur séquence codante peut être modifiée et donc leur conformation aussi. C'est le cas par exemple des Ag-H et -O qui permettent de différencier les sérovars mais qui ne sont pas reconnus par les mêmes anticorps. La création d'un vaccin multivalent doit donc prendre en compte l'accessibilité des Ag (non-cachés par la capsule Vi par exemple) et leur homologie de conformation entre les sérovars, au moins les quatre plus représentés.

II/ MODE D'ACTION DE *SALMONELLA* LORS DE L'INFECTION

A) Atteindre la lumière intestinale

Le site d'infection de *Salmonella* se situe dans l'intestin et concerne plus précisément les cellules épithéliales et des cellules M. Afin de se prémunir des infections, l'hôte possède néanmoins des systèmes qui forment un environnement hostile pour *Salmonella* : des enzymes digestives, un

niveau d'acidité très bas, des peptides antimicrobiens ou encore de l'acide biliaire (287, 288). Afin de surmonter ces obstacles, les bactéries *Salmonella* ont mis au point différents mécanismes tels que la réponse de tolérance à l'acidité (289) ou le LPS. Le LPS est composé du lipide A, d'un noyau oligosaccharidique et de l'antigène O. Il est transporté de la membrane interne à la membrane externe et sert à protéger la bactérie contre l'environnement et les drogues. Les protéines responsables du transport du LPS ont récemment été décrites et analysées comme des cibles thérapeutiques (290). Par ailleurs, l'Ag-O permet de cacher une partie des PAMP (pathogen associated molecular patterns), dont la flagelline, au système immunitaire de l'hôte (291). Ainsi, le LPS fournit une résistance chimique et immunitaire aux *Salmonella* dans l'intestin. Enfin, la motilité péritriche permise par les flagelles va permettre à la bactérie de se diriger vers ses cellules cibles sans être affectée par l'effet inhibiteur du mucus.

B) Interactions *Salmonella* et microbiote

Le microbiote est composé de bactéries commensales responsables entre autres de la structuration et maturation du système immunitaire intestinal, influençant par conséquent la susceptibilité à certains pathogènes entériques (292). Par ailleurs, les bactéries commensales peuvent agir directement sur les pathogènes, généralement en réduisant leur croissance par compétition pour les nutriments. De nombreux processus biochimiques permettent au microbiote de réduire les infections entéropathogéniques (293). Ainsi, il a été démontré que des souris germ-free étaient plus susceptibles aux infections par *Salmonella* (294, 295). De plus, la bactérie *E. coli Nissle 1917* peut réduire la colonisation de *S. Typhimurium* par compétition pour le fer (296). Ainsi, la diversité du microbiote détermine la susceptibilité à l'infection par *Salmonella* selon la disponibilité de certains nutriments comme le fer, le thiosulfate ou le fucose (**Figure 19**) (297). En plus de limiter l'infection intestinale, le microbiote diminue aussi l'infection des MLN par *Salmonella* (298).

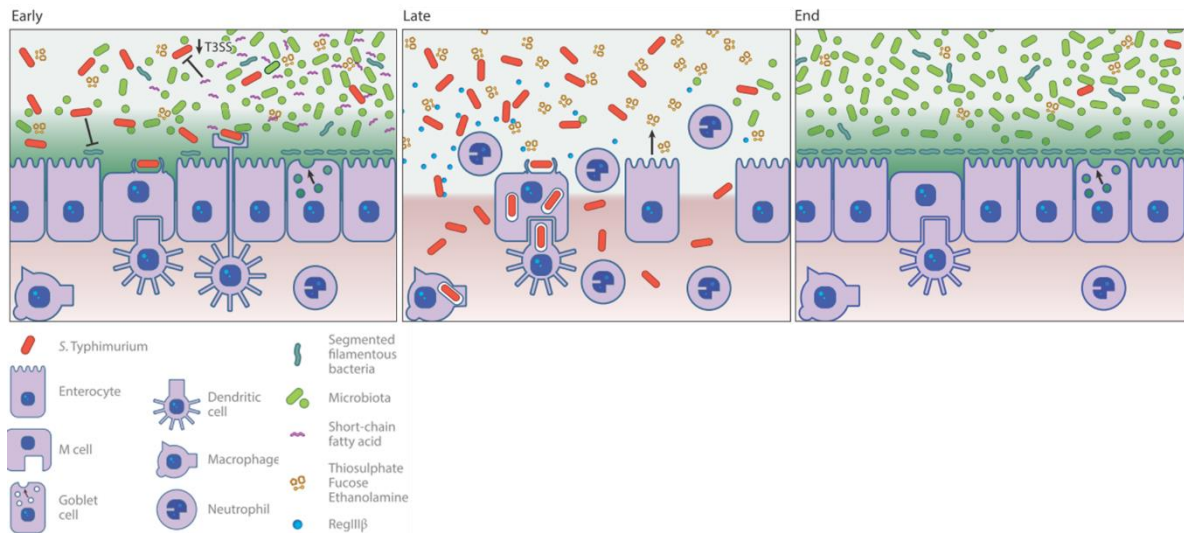


Figure 19: Le microbiote intestinal est modifié durant une infection par *S. Typhimurium* chez la souris.

La composition du microbiote va déterminer une plus ou moins forte résistance lors de la première phase d'infection (Early). L'inflammation plus tardive (Late) induite par l'infection à *Salmonella* va modifier la composition en nutriment dans la lumière intestinale et donc le microbiote. En phase finale de l'infection (End), le microbiote est rétabli et contribue à l'élimination de *Salmonella*. Figure tirée de la revue de Yurist-Doutsch et al. (297)

Une récente étude a mis en évidence un nouveau rôle du microbiote. En effet, certaines bactéries commensales promeuvent la sécrétion d'IFN- γ par les cellules immunitaires intestinales, réduisant ainsi la sévérité d'une infection à *Salmonella* (299, 300). Une stratégie vaccinale pourrait être de moduler la flore microbienne des patients afin d'améliorer la réponse contre *Salmonella*, par exemple via des bactéries probiotiques dont l'efficacité a été montrée pour *Salmonella* (301).

C) Se fixer sur des cellules cibles de l'intestin

Une étude a montré que *S. Typhimurium* se fixait spécifiquement sur les cellules M des FAE au niveau des PP (302). De nombreux systèmes sont utilisés par la bactérie pour se fixer sur la

membrane plasmique (**Figure 20**) pour ensuite lui permettre d'entrer dans la cellule cible et d'infecter son hôte suivant les mécanismes décrit dans la revue (274).

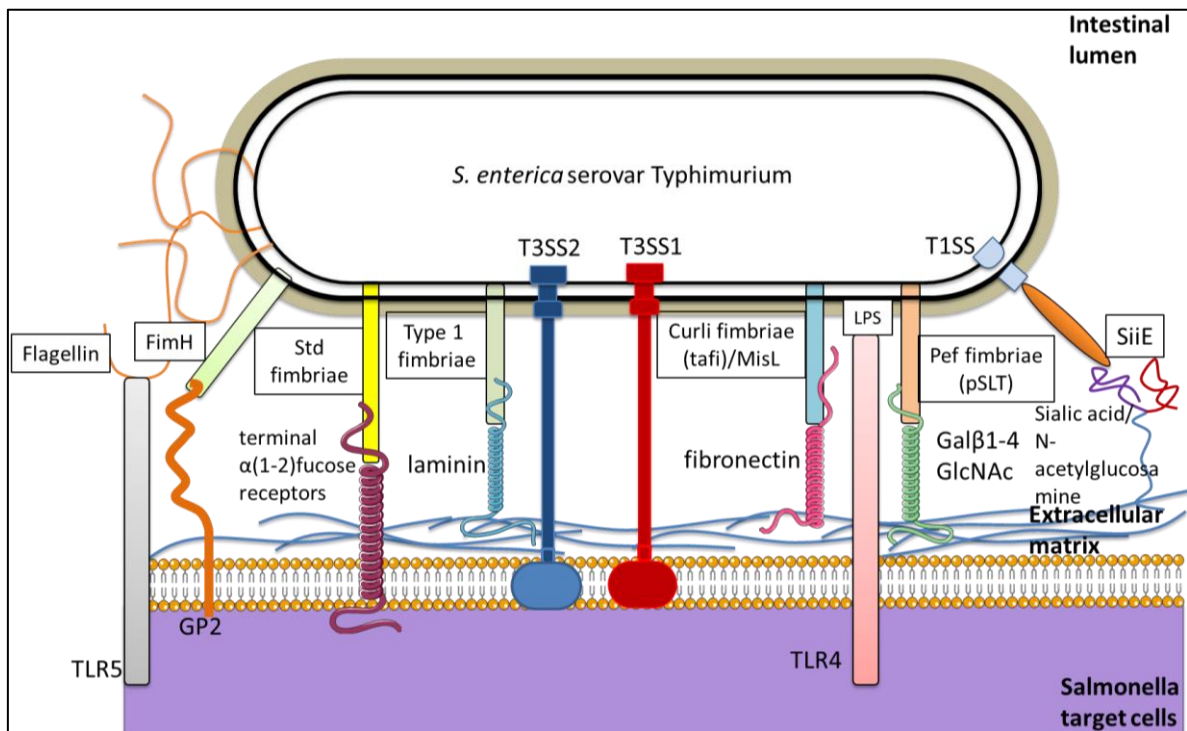


Figure 20: A l'image de *S. Typhimurium*, la famille *Salmonella* exprime de nombreux facteurs permettant leur interaction avec les cellules cibles.

Des éléments tels que les fimbriae, les curli ou les systèmes de sécrétions vont fixer la matrice extracellulaire ou des récepteurs présents sur les cellules cibles de l'infection à *Salmonella* à savoir les cellules épithéliales et principalement les cellules *M*.

III/ REPONSE IMMUNITAIRE CONTRE *SALMONELLA* : L'IMPORTANCE DES CYTOKINES ET DES IGA

La reconnaissance de *Salmonella* médiée par les TLR est particulièrement importante pour l'enclenchement de la réponse innée. En effet, la délétion à la fois des TLR2, 4 et 5 chez la souris induit l'absence de réponse immunitaire contre *Salmonella* (303). Par ailleurs, des souris TLR4^{-/-} et TLR2^{-/-} immunisées avec des porines de *S. Typhi* montraient des réponses anticorps perturbées, suggérant une importante contribution de ces deux récepteurs pour l'induction de la réponse

immunitaire (304). La voie des TLR déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires via l'activation de NF- κ B (nuclear factor κ B). Parmi elles, l'IFN- γ est particulièrement important puisque des patients et des souris déficientes en IFN- γ présentent en effet une plus forte susceptibilité à l'infection par *Salmonella* (305). Bien que les LTh-1 et les cellules natural killer (NK) T puissent sécréter de l'IFN- γ , les cellules NK sont les principales impliquées dans la protection médiée par l'IFN- γ en cas d'infection par *S. Typhimurium* (306). Le rôle protecteur des neutrophiles contre *S. Typhimurium* a aussi été mis en évidence dans la sécrétion d'IFN- γ TLR-indépendante (307). Enfin les LT producteurs d'IFN- γ étant activés en cas d'infection par *Salmonella*, ils seraient donc aussi impliqués dans la protection contre cette bactérie (308). Le rôle protecteur de l'IL-17 lors de l'infection par *Salmonella* a par ailleurs également été démontré. L'IL-17 est une cytokine sécrétée par de nombreuses cellules comme les neutrophiles, les cellules NK, les LT γ/δ mais surtout les LTh-17. Leur rôle dans la muqueuse intestinale est en premier lieu de limiter les infections par des bactéries et champignons pathogènes mais dans un second temps de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale (309). Ainsi, une sécrétion d'IL-17 par des Th-17 spécifiques de *Salmonella* peut être observée lors d'une vaccination contre *Salmonella* (310) et on peut imaginer un rôle de l'IL-17 postérieur à l'infection afin de rétablir l'homéostasie.

En plus des réponses généralement recherchées dans la vaccination muqueuse (**Figure 21**), la vaccination contre *Salmonella* nécessite de se focaliser plus particulièrement sur les IgA, généralement corrélées à une protection contre *Salmonella*(274). Comme expliqué précédemment, les IgA sont essentielles à la protection contre des pathogènes muqueux, leur induction va donc être recherchée lors des vaccinations, en particulier contre *Salmonella* (152) (274).

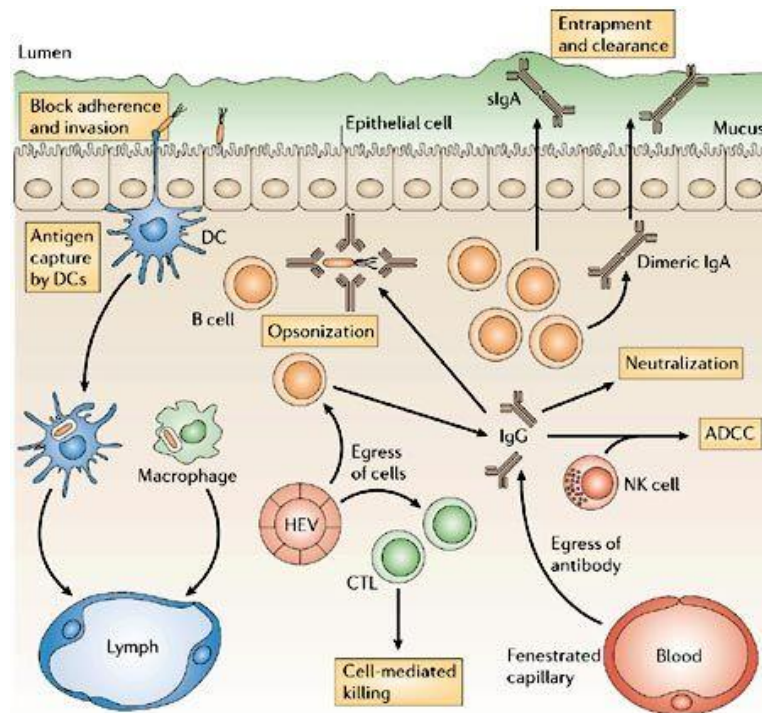


Figure 21: Les mécanismes principaux de l'immunité protectrice des muqueuses.

Les LB et LT sériques spécifiques d'un antigène reconnaissent des veinules muqueuses (HEV) pour entrer dans ce compartiment. Les LB finissent leur différenciation en plasmocytes sécrétant d'IgA principalement dimériques, excrétées vers la lumière intestinale pour neutraliser des pathogènes. Des IgG neutralisant provenant de la circulation sanguine peuvent aussi être trouvées dans la lumière intestinalis après transudation. Les cellules infectées peuvent être tuées par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ou par une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), une collaboration entre les cellules NK et les anticorps. Les pathogènes peuvent aussi être capturés par des cellules dendritiques et des macrophages puis transportés jusqu'aux ganglions drainant afin d'induire une réponse adaptative. Figure tirée de la revue publiée par Neutra et al.(153).

En résumé, les connaissances acquises sur les moyens de mobiliser la réponse immunitaire innée mais aussi adaptative représentent un atout pour générer un environnement capable d'induire des réponses immunitaires appropriées lors de la vaccination (274). Dans le cas d'une infection par *Salmonella*, les adjuvants et les systèmes de délivrance doivent être sélectionnés selon leur habilité à induire principalement des IgA, ainsi que des LTh-1 et LTh-17.

IV/ ÉCHAPPEMENT AUX REPONSES IMMUNITAIRES PAR *SALMONELLA*

Il convient de rappeler que la lutte contre les effets néfastes associés aux mécanismes d'échappement de *Salmonella* est un véritable défi pour la conception d'un vaccin (**Figure 22**). Ceci s'ajoute à l'observation que de nombreux Ag candidats ne sont que temporairement exposés à la surface de *Salmonella*, seulement exprimés dans des cellules infectées, ou seulement au moment de l'excrétion, ce qui rend leur utilisation limitée dans une formulation vaccinale. Ces observations ajoutées à la forte propension de cette bactérie à muter lorsqu'elle persiste dans l'hôte (201) font que le développement de vaccins reste une tâche complexe.

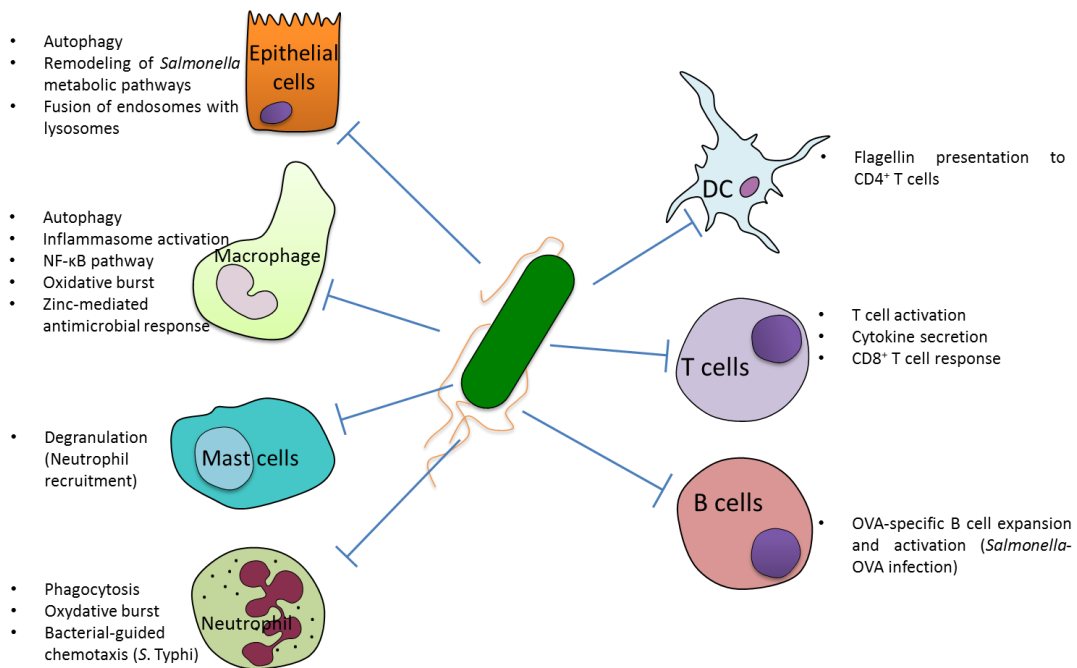


Figure 22: *Salmonella* inhibe la plupart des fonctions effectrices normalement induites par les cellules de l'immunité innée (gauche) mais aussi adaptative (droite) lors de l'infection par la bactérie.

V/ CHOIX DES ANTIGENES ET DE L'ADJUVANT : INDUIRE LA REPONSE LA PLUS ADAPTEE

Plusieurs vaccins contre *S. Typhi* (**Table 6**) et *S. Typhimurium* (**Table 7**) ont été développés et testés ces dernières années avec des résultats plus ou moins convaincants. Peu d'attention est portée aux vaccins contre *S. Paratyphi* et la mise en place de vaccins contre *S. Typhimurium* ou *S. Enteritidis* est soumise à de nombreuses difficultés expliquant le peu d'essais cliniques à ce jour (Annexe I). Néanmoins, ces études ont mis en évidence des antigènes capables d'induire une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire et capables de protéger l'hôte de l'infection à *Salmonella* qui pourraient être utilisés pour le design d'un vaccin (274) (Annexe I). Pour un vaccin multivalent, le choix se base sur la conservation des antigènes entre les différentes souches et sérovars de *Salmonella*. La protéine secretory system effector B (SseB) est sécrétée par le T3SS-2 dans la cellule hôte et joue un rôle indirect dans la mise en place de la virulence de *Salmonella* (311, 312). La protéine outer membrane protein C (OmpC) forme une porine avec d'autres OMP et joue un rôle dans l'interaction avec les macrophages (313). Bien qu'originellement décrites chez *S. Typhimurium*, ces protéines présentent des domaines conservés entre plusieurs sérovars comme *S. Typhi* ou *Paratyphi A* (314). Ces deux protéines ont donc les caractéristiques requises pour la mise en place d'une réponse immunitaire muqueuse contre les principales *Salmonella* pathogènes.

Table 6: Principaux vaccins contre *S. Typhi* en développement en 2014.

Figure tirée de la revue de MacLennan et al. (315)

Name	Description	Developer	Stage of development	References
Ty21a	Live attenuated	Vivotif (Crucell)	Licensed for adults and children > 5 y	17,18,104-111
Vi CPS	Vi Polysaccharide	Typherix (GSK), Typhim Vi (Sanofi), Typbar Vi (Bharat Biotech), Typho Vi (BioMed); Vax-tyVi (Finlay Institute); > 6 other endemic countries manufacturers	Licensed for adults and children ≥ 2 y	19,101,102, 112-115
Vi-TT	Vi Conjugate	Peda-Typh (BioMed)	Licensed in India	63,117
		Typbar-TCV (Bharat Biotech)	Licensed in India	63,118
Vi-rEPA	Vi Conjugate	National Institutes for Health	Phase 3	60-62
		Lanzhou Institute (China)	Licensed in China	63
Vi-CRM ¹⁹⁷	Vi Conjugate	NVGH (technology transfer to Biological E underway)	Phase 2	119,120
Vi-DT	Vi Conjugate	International Vaccine Institute (IVI)/Shanta Biotech	Phase 1	63,121-123
Vi conjugated to fusion protein PsaA-PdT	Vi Conjugate	Harvard Medical School	Preclinical	124
O:9-DT	O:9 Conjugate	International Vaccine Institute (IVI)	Preclinical	125
M01ZH09	Live attenuated	Emergent Biosolutions	Phase 2 in adults and children; evaluation in <i>S. Typhi</i> human challenge	126-131
CVD 909	Live attenuated	University of Maryland	Phase 2	132-136
Ty800	Live attenuated	Avant Immunotherapeutics	Phase 2	137,138
OmpC and OmpF	Outer membrane protein	Instituto Mexicano del Seguro Social	Phase 1 in Mexico	139,140

Table 7: Principaux vaccins contre *S. Typhimurium* en développement en 2014.

Figure tirée de la revue de MacLennan et al. (315)

Name	Description	Developer	Stage of development	References
O:4,5/O:9-flagellin	O:4,5/O:9 Conjugate	University of Maryland	Preclinical	50,69
O:4,12-TT	O:4-TT Conjugate	NIH	Preclinical	51
Os-po	O:4-porin Conjugate	National Bacteriology Laboratory, Stockholm	Preclinical	146
O:4,5/O:9-CRM ₁₉₇	O:4,5/O:9 Conjugate	NVGH	Preclinical	145
WT05	Live attenuated	Microscience, Wokingham Berkshire	Phase 1	147
CVD 1921 and CVD 1941	Live attenuated	University of Maryland	Preclinical	148
<i>S. Typhimurium</i> ruvB mutant	Live attenuated	Seoul National University	Preclinical	149
<i>Salmonella</i> hfq deletion mutant	Live attenuated	Indian Institute of Science Bangalore	Preclinical	150
SA186	Live attenuated	Istituto Superiore di Sanità Roma	Preclinical	151
MT13	Live attenuated	KIIT University Odisha	Preclinical	152
Various	Live attenuated, DNA adenine methylase mutants	University of California, Santa Barbara	Preclinical	153,154
Various	Live attenuated, regulated delayed attenuation	Arizona State University	Preclinical	155-157
Porins	<i>S. Typhimurium</i> porins	National Bacteriology Laboratory, Stockholm	Preclinical	146
OmpD	Outer membrane protein	University of Birmingham, UK	Preclinical	73
<i>S. Typhimurium</i> and <i>S. Enteritidis</i> GMMA	Generalized Modules for Membrane Antigens	NVGH	Preclinical	65,158,159

L'utilisation d'un adjuvant dans la formulation vaccinale est souvent nécessaire pour augmenter l'efficacité du vaccin en apportant le signal de danger nécessaire à l'activation de la réponse

immunitaire adaptative et en orientant cette dernière vers un profil souhaité, c'est-à-dire la plus efficace contre *Salmonella*. *Salmonella* est une entérobactérie, le choix d'une entérotoxine capable à la fois d'améliorer la réponse Th-1 ou Th-17 et d'induire une réponse IgA paraît donc naturel (**Table 8**). La CT tout comme la toxine thermo-labile (LT) d'*E. coli* sont connues pour déclencher ces réponses aussi bien dans l'intestin que dans d'autres muqueuses comme le tractus respiratoire (316). Cependant, ces adjuvants restent toxiques pour l'Homme, ayant nécessité la synthèse de mutants tels que la multiple-mutated CT (mmCT) ou la double-mutant heat-labile toxin (dmLT), toutes deux capables d'induire une réponse Th-17 (317). L'utilisation de la CT comme adjuvant en vaccination contre *Salmonella* a montré une solide réponse humorale et cellulaire chez la souris après immunisation nasale avec la protéine SseB encapsulée dans des microbulles lipidiques (318). La CT semble donc être un bon candidat dans une formulation vaccinale muqueuse contre *Salmonella* mais d'autres pistes pourraient être envisagées comme par exemple la toxine typhoïde qui paraît plus physiologique mais qui reste spécifique à *S. Typhi*.

Table 8: Entérotoxines utilisées comme adjuvants muqueux et leurs effets.

GM1= ganglioside GM1, CT= Cholera toxin, CTB= Cholera toxin subunit B, CTA1-DD= cholera toxin subunit A1–*Staphylococcus aureus* protein A D-fragment dimer, LT= *E. coli* heat-labile toxin.

Type of adjuvant or delivery system	Composition	Target	Formulation	Immuno-enhancement	Mucosal IgA	Clinical testing?	Licensed vaccine?
Enterotoxins	CT	GM1	Soluble or conjugated	T _H 2 cells, T _H 17 cells, CTLs	+++++	Yes	No
	CTB	GM1	Soluble or conjugated	ND	+	Yes	Yes
	CTA1-DD	Immuno-globulin heavy chain, complement	Soluble, conjugated to nanoparticles or incorporated in ISCOMs	T _H 1 cells, T _H 2 cells, T _H 17 cells, CTLs	++++	No	No
	LT	GM1 and other gangliosides	Soluble or conjugated	T _H 1 cells, T _H 2 cells, T _H 17 cells, CTLs	++++	Yes	No
	Mutant LT and CT	GM1 and other gangliosides	Soluble or conjugated	T _H 1 cells, T _H 2 cells, T _H 17 cells, CTLs	++++	Yes	No

OBJECTIFS ET PROBLEMATIQUES

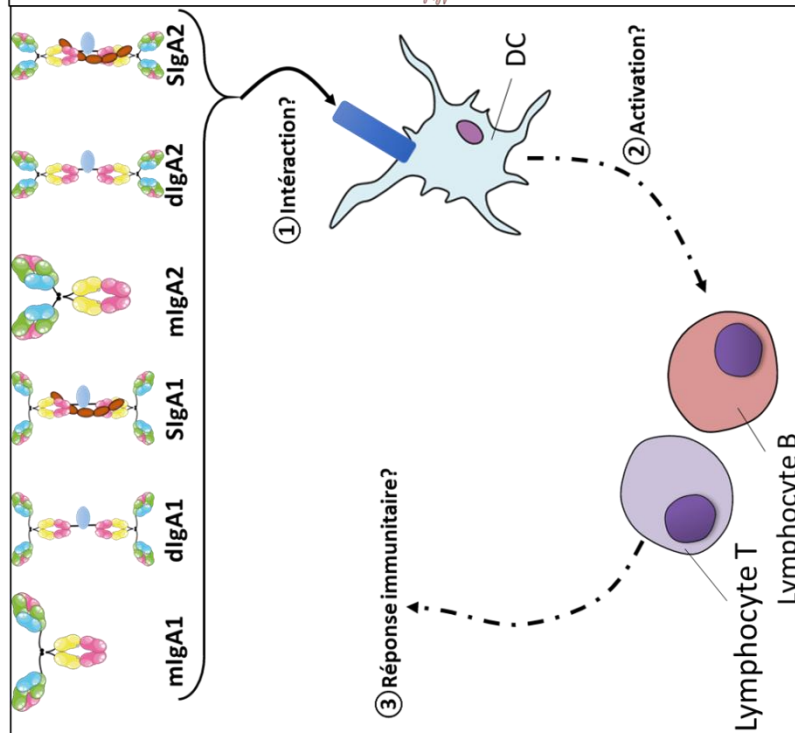
L'apparition de souches de *Salmonella* multi résistantes nécessite la mise en place d'un vaccin prophylactique stable pour endiguer les épidémies de *Salmonella*, en particulier dans les pays en voie de développement. Bien que des vaccins contre *Salmonella* Typhi soient actuellement disponibles, leur efficacité sur les populations à risque n'est pas satisfaisante et ils ne protègent pas contre les autres sérovars pathogènes principaux à savoir Paratyphi A, Typhimurium et Enteritidis. La forte représentation des immunoglobulines A (IgA) dans les muqueuses et leur rôle de médiateur au sein du système immunitaire pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans la vaccination muqueuse.

Le premier objectif de ma thèse est d'étudier les fonctions immunologiques des différents isotypes et isoformes d'IgA, notamment dans les muqueuses. Notre hypothèse est que les IgA1 et IgA2 se comportent différemment au niveau des muqueuses et sont responsables du rôle anti- et/ou pro-inflammatoire des IgA dans cet environnement. Pour confirmer notre théorie, nous cherchons à (1) définir un profil d'interaction des différents IgA avec les récepteurs présents sur les cellules dendritiques, (2) analyser l'effet des différentes IgA sur les cellules dendritiques, et enfin (3) à caractériser la réponse immunitaire déclenchée par l'un ou l'autre des isotypes (**Figure 23**). Ceci nécessitera de (i) étudier séparément les deux isotypes IgA1 et IgA2 mais aussi les isoformes à savoir les formes monomériques, dimériques et sécrétoires, (ii) déterminer un modèle de cellules dendritiques humaines capables d'être stimulées et d'induire des réponses anti- ou pro-inflammatoires, (iii) étudier la réponse cellulaire après stimulation par des cellules dendritiques préalablement exposées aux différentes IgA.

Le second objectif est d'évaluer un vaccin mono- ou multivalent contre *Salmonella* capable de cibler le système immunitaire muqueux. Notre hypothèse est que les IgA seraient des vecteurs de choix pour atteindre cet objectif. Nous avons dans un premier temps déterminé que : (1) des IgA couplées à un antigène sont capables de le transporter vers des sites immunitaires inducteurs

muqueux, (2) l'IgA peut activer le système immunitaire muqueux, (3) la réponse ainsi induite est protectrice face à une infection par *Salmonella* (**Figure 23**). Les principales difficultés à surmonter ici seront de (i) choisir des antigènes immunogènes n'induisant pas d'effet secondaires dû par exemple à leur implication dans l'échappement de la bactérie à la réponse immunitaire, (ii) choisir des antigènes conservés capables d'induire une protection contre plusieurs sérovars de *Salmonella*, (iii) éviter la mise en place d'une réponse tolérogène face aux antigènes choisis.

Partie I : Influence de l'isotype et de l'isoforme des IgA humaines sur la réponse immunitaire



Partie II : Pertinence de l'IgA en tant que vecteur vaccinal muqueux contre les infections à *Salmonella*

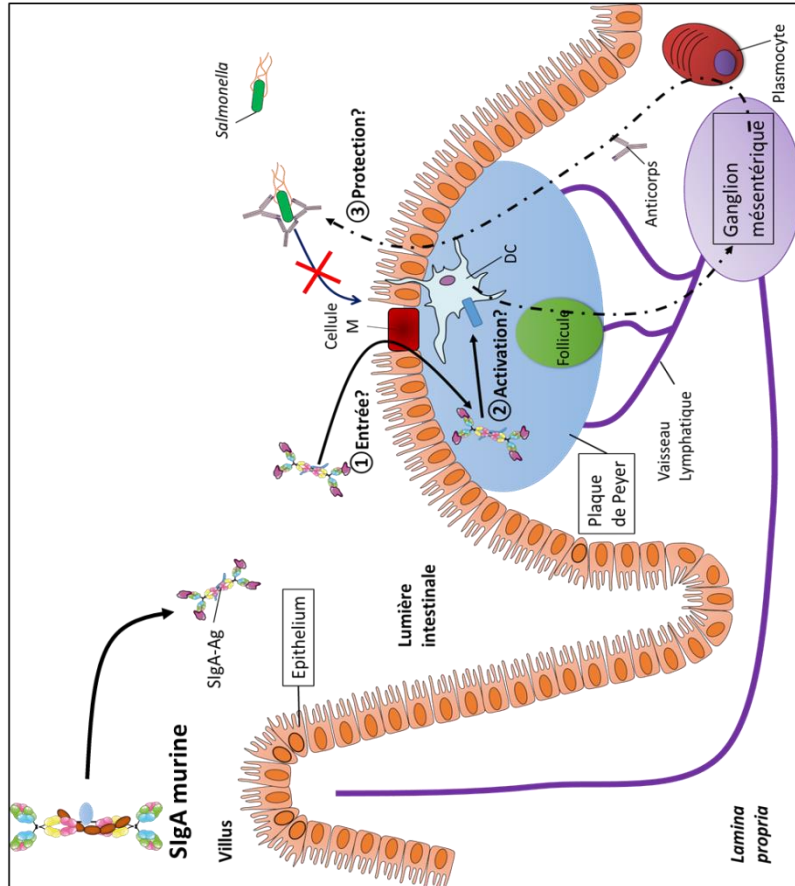


Figure 23: Schéma bilan des principaux objectifs de cette thèse.

mIgA = IgA monomérique, *dIgA* = IgA dimérique, *SIgA* = IgA sécrétoire, *DC* = cellule dendritique, *Ag* = antigène

Test mycoplasmes

Toutes les lignées cellulaires ont été testées pour l'absence de contamination aux mycoplasmes (HEK-Blue2 Plasmotest, InvivoGen) avant et après congélation suivant les instructions du fournisseur.

Test d'endotoxines

Les échantillons ont été testés pour leur quantité d'endotoxines (test Endosafe, Charles River) et il en résulte : mIgA1 (< 5 EU/mL), IgA2 (< 5 EU/mL), SIgAC5 (132 EU/mL), SIgA Sal4 (> 500 EU/mL), SseB (> 500 EU/mL). Partant de ces résultats, tous les réactifs ont été supposés contaminés par les endotoxines sauf les mIgA. L'utilisation de colonnes de détoxification (Fisher Scientific, 20344) diminuait effectivement la quantité d'endotoxines dans les échantillons (> 500 EU/mL pour SseB avant et < 5 EU/mL après détoxification) mais entraînait une perte de 75% de l'échantillon. L'utilisation de polymyxine B à 50µg/mL (InvivoGen) juste avant l'ajout des activateurs dans le milieu de culture a donc été privilégiée pour éviter les biais d'activation.

Souris et lignées cellulaires

Souris BALB/cByJ ou C57BL/6J SPF (exempt d'organismes pathogènes spécifiques) (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) âgées de 7-10 semaines ayant été gardées pour 1 à 3 semaines d'acclimatation avant le début des expériences. Les souris ont été hébergées en animalerie conventionnelle (PLEXAN, Saint-Etienne, France, agrément #42-18-0801) en environnement A2. Les souris infectées étaient manipulées sous PSM de type II.

La lignée intestinale humaine Caco2 (obtenus du Dr. Maria Rescigno, University of Milan-Bicocca, Milan, Italy) était cultivée dans du milieu DMEM complet (10% SVF, 1% pénicilline/streptomycine) à 37°C, 10% CO₂ (54). La lignée cellulaire de lymphome de Burkitt Raji B (American Type Culture Collection) était cultivée dans du milieu RPMI 1640 complet à 37°C, 5% CO₂. La lignée de cellules épithéliales humaines 5637 (DSMZ, ACC 35) a été cultivée en milieu RPMI 1640 complet (10% SVF, 1% pénicilline/streptomycine). La lignée cellulaire humaine de précurseurs CD34⁺ Mutz3 (DSMZ, ACC 295) a été cultivée en milieu RPMI 1640 complet et 20% de surnageant filtré (0,22µm) de 5637 confluentes.

Préparation des IgA et IgM murines

L'IgAC5 spécifique du LPS de *Shigella flexneri* sérotype 5a(319) et l'IgASal4 spécifique des carbohydrates de surface de *Salmonella Typhimurium* (320) sont des anticorps murins monoclonaux (MAb) produits suivant la méthode précédemment décrite (321). La forme polymérique était obtenue par chromatographie d'exclusion stérique (321). La pièce sécrétoire murine était purifiée après culture de l'hybridome 2H2 par chromatographie d'affinité (322) puis ajoutée aux IgAC5/Sal4 en quantité équimolaire dans du phosphate-buffered saline (PBS) après dialyse des IgA (Thermo Scientific, 66380). Le mélange était conservé 30 minutes à température ambiante (RT) pour former les SIgAC5/Sal4 puis conservé à 4°C. L'IgMHF5 spécifique de l'uréase B d'*Helicobacter pylori* était produit par culture d'un hybridome en milieu RPMI 1640 hypercomplet (10% SVF, 1% pénicilline/streptomycine, L-glutamine 2mM (Sigma, G7513), Acides aminés non essentiels 1% (Sigma, M7145), Hepes 10mM (Sigma H0887), pyruvate de sodium 1mM (Sigma, S8636)). L'hybridome était cultivé en flasques CELLline 350mL suivant les instructions du fournisseur (Integra, 90010) et le SN était prélevé chaque semaine, filtré (0,22µm) et congelé. Comme l'IgAC5, les IgM polymériques sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion stérique. Les SIgMHF5 étaient ensuite produites de la même façon que les SIgA.

IgA humaines

Les mIgA1 et mIgA2 anti-hCD20 humaines monoclonales exemptes d'endotoxines (Invivogen) sont des anticorps recombinant produits dans des cellules CHO et purifiés par chromatographie d'affinité avec le peptide M. La dIgA1 monoclonales (Nordic Mubio, P444) était issue d'un myélome de patient et pure à 98%. La dIgA2 monoclonale était issue d'un hybridome à IgA2 (clone F2) immortalisé au laboratoire à partir de plasmocyte de la *lamina propria* issu d'un patient atteint de la maladie de Crohn (Dendritics, DDXK-HuBBB). Le surnageant du clone F2 était concentré (Amicon 100K, Millipore, UFC910024) puis purifié par chromatographie d'affinité avec du peptide M-agarose (InvivoGen, gel-pdm-2). Les IgA sécrétoires étaient assemblées à partir des IgA dimériques de la même façon que les IgA murines.

Production des antigènes SseB et OmpC de *Salmonella*

La protéine recombinante Serodominant Secreted Effector Protein B (SseB) a été préparée selon la méthode de Barat *et al* (323). Après transfection dans *E. coli* BL-21 suivant le protocole fourni (Biolabs, C2527H) puis amplification du plasmide pET 20b fourni par le Dr. Kumar par maxiprep

(Macherey Nagel, kit Nucleobond 714440.1), la protéine recombinante Outer Membrane Protein C (OmpC) a été préparée selon la méthode de Kumar *et al* (324). L'insertion des gènes a été testée par digestion enzymatique et la pureté des protéines après production a été testée par Western Blot (Cf paragraphe Western Blot) pour SseB avec un anticorps anti-Histidine HRP (Fisher scientific, 11520853) et par spectrométrie de masse LC-MSMS pour OmpC (Protein Science Facility, IBCP, Lyon).

SDS PAGE et Western Blot

Les protéines étaient traitées avec du LDS (B0007, Life technologies), éventuellement un agent réducteur (B0009, Life technologies) puis chauffées à 95°C pendant 3 minutes. Elles ont été chargées sur gel à 4-12% (NW04120BOX, Invitrogen) avec le marqueur de taille See Blue Plus prestain (LC5125, Invitrogen). Après migration, les gels étaient soit colorés au bleu de coomassie (UPG4562A, Interchim) soit les protéines étaient transférées à sec sur membrane de nitrocellulose (iBlot2 system, Life technologies). La membrane était bloquée 2h à RT dans du PBS, Tween 0,05%, lait 5%. Après lavage avec du PBS, Tween 0,05%, la membrane était incubée 2h avec les anticorps primaires directement couplés ou non à la HRP dilués dans du PBS, Tween 0,05%, lait 0,5%. Des anticorps secondaires couplés à la HRP et dilués dans du PBS, Tween 0,05%, lait 0,5% ont pu être utilisés dans une étape supplémentaire nécessitant 2h d'incubation. Après 3 lavages au PBS, Tween 0,05% et 2 au PBS, les bandes étaient observées au Chemidoc XRS (BioRad)

Les productions de SseB et OmpC étaient vérifiées par SDS PAGE et Western blot en conditions dénaturantes avec des anticorps anti-*Salmonella Typhimurium* (lapin, Fisher Scientific, PA120811) et anti-IgG de lapin HRP (Ozyme, 7074P2).

Les IgM murines étaient vérifiées par SDS PAGE et Western blot en condition dénaturantes non réductrices avec un anti-IgM couplé à la HRP (Abcam, 99590)

Les IgA murines étaient vérifiées par SDS PAGE et Western blot en condition dénaturantes non réductrices avec un anti-IgA couplé à la HRP (chèvre, Southern Biotech) et un anti pièce sécrétoire humaine HRP (Sigma, S1640).

Les IgA humaines étaient vérifiées par SDS PAGE et Western blot en condition dénaturantes non réductrices avec un anti-IgA couplé à la HRP (1/1000, chèvre, Sigma, A0295). Pour différencier les IgA1 des IgA2, les anticorps primaires anti-IgA1 (9130-01, Southern Biotech) ou anti-IgA2

(9140-01, Southern Biotech) avec un Ac secondaire anti-Ig de souris couplé à la HRP (1/1000, lapin, Dako, P0260) ont été utilisés.

Le couplage de SseB et de l'OmpC sur les IgA/IgM était vérifié en SDS PAGE et en Western blot après couplage des antigènes avec la Cyanine-3. Un anticorps anti-Cyanine 3 biotinylé (C3117, Sigma) était utilisé et révélé avec de la streptavidine-HRP.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Des plaques 96 puits « maxisorps » étaient adsorbées la nuit à RT avec les antigènes pour les ELISA indirectes ou avec les Ac de capture pour les ELISA en Sandwich dilués soit dans du tampon carbonate à pH 9,6 (Na₂CO₃ 1,59g/L, NaHCO₃ 2.93g/L) soit du PBS. Les plaques étaient lavées avec du PBS, Tween 0,05% et les sites aspécifiques bloqués 1 à 2h avec du PBS, Tween 0,05%, BSA 1, 2 ou 4%. Après 3 lavages, les échantillons étaient incubés 2h à RT. Après 3 lavages, l'anticorps primaire dilué dans du PBS, Tween 0,05%, BSA 1% était ajouté et incubé 2h à RT. Après 3 lavages, l'anticorps secondaire dilué dans du PBS, Tween 0,05%, BSA 1% était éventuellement ajouté et incubé 2h à RT. De la streptavidine-HRP (N100, ThermoScientific) était parfois ajoutée dans une dernière étape avant la révélation. Les plaques étaient finalement incubées 30 min maximum avec du TMB (Tebu-bio laboratories) après 4 derniers lavages et la réaction était stoppée avec de l'acide chloridrique (HCl 0,1N). La densité optique était lue à 450nm (TECAN®).

Pour le dosage des anticorps spécifiques de SseB ou OmpC, 500ng de protéines étaient adsorbées avec du tampon carbonate. Les IgA et IgG spécifiques des antigènes étaient dosées soit avec un anticorps primaire anti-IgA ou anti-IgG de souris couplés à la HRP (Southern Biotech ou Sigma) soit avec un anti-IgG biotinylé (Eurobio) à 0,17µg/mL révélé avec de la streptavidin-HRP (ThermoFisher Scientific).

Les dosages de l'IL-16 murine (Abcam, 201282), de l'IL-17A murine (Biolegend, 432502) et de l'IFN-γ murine (Biolegend, 430802) ont été réalisés selon les recommandations des fournisseurs.

Dosage des protéines par Bradford

La concentration de SseB et OmpC après purification a été déterminée par dosage Bradford (27813, Sigma) dans du tampon Tris 0,02M, EDTA 1mM, NaCl 0,2M. Une gamme de BSA était réalisée et la densité optique (DO) était mesurée à 595nm (TECAN). La concentration des IgM HF5 murine était déterminée à l'aide d'un ELISA et composé d'un anticorps anti-mouse IgM de

capture à 1µg/mL (Abcam, 190369) et d'un anticorps anti-mouse IgM de détection couplé à la HRP (Abcam, 99590). Une IgM purifiée de souris était utilisée comme standard (Abliance).

Cytométrie en flux

Les compensations sont réalisées grâce à des billes de compensation (eBioscience, 01-1111-42) sauf pour les marqueurs de *viabilité* qui se font sur les cellules d'intérêt. Les cellules vivantes sont analysées et discriminées par un marquage au 7AAD (BD, 559925) ou par un marquage au LIVE/DEAD™ à 488nm (Invitrogen, L23101). Chaque panel a été testé sur son marquage aspécifique en comparant avec et sans blocage des récepteurs Fc (Miltenyi, humain 130-059-901 et murin 130-092-575). Les marquages sont analysés *via* un cytomètre BD FACSCanto II (BD). Tous les anticorps ont été utilisés dilués au 1/200^{ème}. Pour les marquages sur cellules humaines, les anticorps contre les marqueurs suivants ont été utilisés :

Phénotypage et activation des moDC: anti-CD209/DC-SIGN BV421 (BD, 564127), anti-CD1a APC-Vio770 (Miltenyi, 130-100-225), anti-CD14 PE (Miltenyi, 130-098-067), anti-CD11b PE-Vio770 (Miltenyi, 130-099-708), anti-HLA-DR BV510 (BD, 563083), anti-CD80-PE-Vio770 (Miltenyi, 130-101-213), anti-CD86-FITC (Miltenyi, 130-098-182), anti-CD40-PE (Miltenyi, 130-099-385).

Phénotypage et activation des DC intestinales humaines: anti-CD68 FITC (BD, 562117), anti-CD1c PE (BD, 564900), anti-CD11b APC (BD, 561015), anti-CD11 PE-Cy7 (BD, 561356), anti-CD103 BV421 (BD, 563882), anti-CX3CR1 BV510 (BD, 744487), anti-HLA-DR APC-H7 (BD, 561358), anti-CD80 APC (Biolegend, 305220)

Phénotypage et activation des LC : anti-CD34 PE (Miltenyi, 130-098-140), anti-CD11b PE-Vio770 (Miltenyi, 130-099-708), anti-CD1a APC-Vio770 (Miltenyi, 130-100-225), anti-CD207/Langerin APC (Miltenyi, 130-098-364), anti-CD14 PE (Miltenyi, 130-098-067)

Prolifération et activation des LT et LB après la MLR : anti-CD3 BV510 (BD, 563109), anti-CD8 PE-Cy7 (BD, 557750), anti CD4 APC (BD, 561841), anti-CD25 PE (BD, 555432), anti-Ki67 BV421 (BD, 562899)

Pour les marquages sur cellules murines, les anticorps contre les marqueurs suivants ont été utilisés :

Prolifération et activation des T chez la souris: anti-CD4 PE (BD, 557308), anti-CD8 APC (BD, 553035), anti-CD45 BV421 (BD, 563890), anti-CD3e PE-Cy7 (BD, 552774), anti-CD19 BV510 (BD, 562956)

Phénotypage et Activation des DC de PP chez la souris: anti-CD103-FITC (Miltenyi, 130-102-479), anti-CD103-APC (BD, 562772), anti-CX3CR1-BV510 (Biolegend, 149025), anti-CD11b APC-Cy7 (BD, 557657), anti-CD11b APC (BD, 553312), anti-CD11c BV510 (BD, 562949), anti-CD40 BV421 (BD, 562846), anti-CD80 PE (BD, 553769), anti-CD86 PE-Cy7 (BD, 560582), anti-I-A/I-E BB515 (BD, 565254).

Préparation des cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC)

Les PBMC humains ont été isolés à partir de buffy coat de donneurs sains (EFS Auvergne-Rhône-Alpes) par Ficoll (Eurobio, CMSMSL01-01). Les monocytes (CD14⁺) ont ensuite été purifiés sur colonne MACS (Miltenyi) par tri positif au CD14 (Miltenyi, 130-050-201). Les monocytes ont ensuite été cultivés en milieu RPMI complet complétement avec du GM-CSF humain (100ng/mL, Miltenyi, 130-095-372) et de l'IL-4 humaine (50ng/mL, Miltenyi, 130-095-373) pendant 6 jours avec un changement de milieu à J3. La différenciation en moDC (CD14⁻, CD11b⁺, CD209⁺) était ensuite vérifiée par cytométrie en flux.

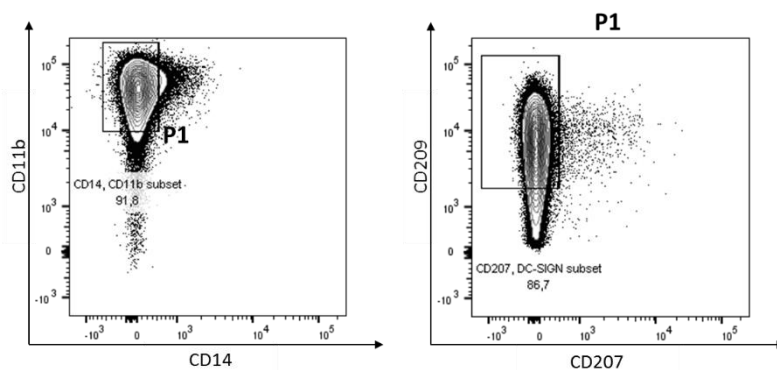


Figure 24: Identification des cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC) par cytométrie en flux.

Maturation des moDC

Les moDC étaient disposées dans des plaques 24 puits (1mL à 1x10⁶ cellules/mL) dans du milieu RPMI complet. Un traitement à la polymyxine B (50µg/mL, InvivoGen, TLRL-PMB) était réalisé sauf contre-indication. Les réactifs étaient ensuite rajoutés : Lipopolysaccharides d'*E. coli* (500ng/mL, Sigma, L4391), CpG ODN 1826 (2,5µM, InvivoGen, tlrl-1826), CpG ODN 2395

(2,5 μ M, InvivoGen, tlr1-2395), R848 (500ng/mL, InvivoGen, tlr1-r848), cocktail activateur constitué d'IL-1 β (25ng/mL, Miltenyi, 130-093-897), d'IL-6 (100ng/mL, Miltenyi, 130-095-352) et de TNF- α (50ng/mL, Miltenyi, 130-094-022), IgA à 12ng/mL.

Isolation et activation des DC de PP de souris

Immédiatement après la mise à mort, l'intestin de souris Balb/c était prélevé en conditions aseptiques. Les PP étaient récupérées dans du tampon de lavage (PBS, 5% SVF, 2mM EDTA) puis digérées 20 min à 37°C avec 0,21 unités/mL de Libérase™ (Sigma, 000000005401020001) dans de l'eau supplémentée avec 0,1ng/mL de DNase et 2mM CaCl₂. La digestion était complétée par une séparation mécanique sur tamis cellulaire (70 μ m, Miltenyi, 130-098-462). Les cellules étaient ensuite conservées au maximum 24h à 37°C dans du RPMI hypercomplet complété avec du GM-CSF murin (25ng/mL, Miltenyi, 130-095-746) et du M-CSF murin (50ng/mL, Miltenyi, 130-101-706).

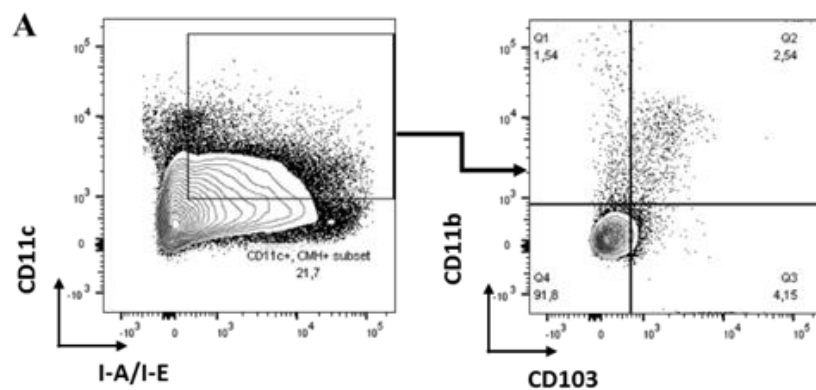


Figure 25: Identification des sous population de DC intestinales de souris par cytométrie en flux.

Les cellules étaient cultivées en plaque 24 puits (5x10⁵ cellules dans 2mL) en présence de polymyxine B (50 μ g/mL, InvivoGen, TLRL-PMB). Les cellules étaient activées avec les différents réactifs : CpG ODN 1826 (2,5 μ M, InvivoGen, tlr1-1826), SseB (10 μ g), SIgAC5-SseB (10 μ g SseB). L'expression des marqueurs d'activation des cellules dendritiques (CD11c⁺) était observée par cytométrie en flux.

Différenciation des cellules Mutz3 en cellules de Langerhans

La méthode était basée principalement sur les travaux de Gruijl *et al*(325). 2,5mL de Mutz3 étaient placées en plaques 12 puits à 1,5x10⁵ cellules/mL. Les cellules ont été incubées 9 jours

avec du TNF- α (2,5ng/mL final, Miltenyi 130-094-015) et du GM-CSF humain (100ng/mL, Miltenyi 130-093-862) avec un changement de milieu à jour 4. Les cellules ont ensuite été lavées puis incubées 7 jours avec la même concentration de TNF- α et GM-CSF plus du TGF- β 1 (1ng/mL, Miltenyi 130-095-067). La différenciation en cellules CD34⁻, CD1a⁺, CD207⁺ était vérifiée par cytométrie en flux.

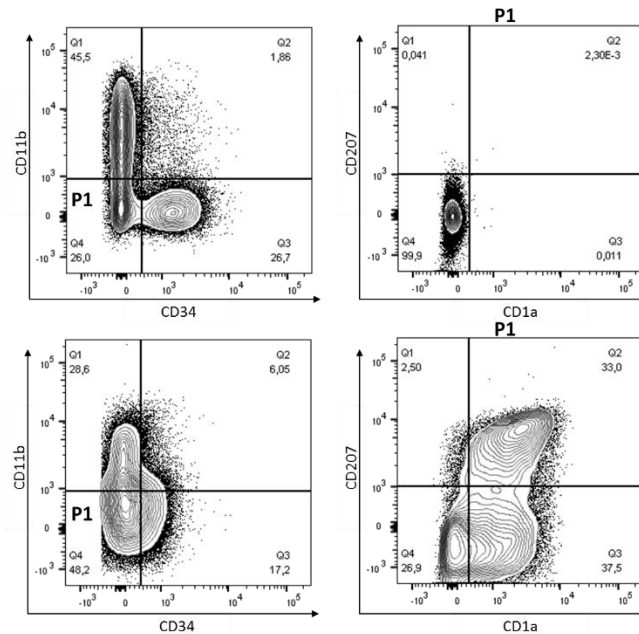


Figure 26: Stratégie de fenêtrage de la population des cellules de Langerhans en cytométrie en flux.

Les cellules Mutz3 étaient incubées en présence (bas) ou absence (haut) de cytokines induisant la différenciation en cellules de Langerhans CD11b⁻, CD34⁻, CD207⁺, CD1a⁺ (P1).

Thermophorèse

Les récepteurs recombinants Fc α RI (R&D systems, 3939-FA-050), Dectin-1 (R&D systems, 1859-DC050), DC-SIGN (R&D systems, 161-DC-050), le récepteur humain à la transferrine (R&D systems, 2474-TR-050) possèdent tous un tag histidine en partie N-terminale. 200nM de récepteurs étaient couplés à 100nM de fluorochrome rouge NT-647 suivant les instructions du kit « Monolith NT™ His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA » (NanoTemper technologies, L008). Les récepteurs à 25nM final étaient ajoutés séparément à une gamme d'IgA1 ou IgA2 humaine monomériques (Invivogen) réalisée de 25 μ M à 0,3nM. La force de l'interaction récepteur/ligand était mesurée alors qu'un gradient de température était appliqué chauffage des capillaires

contenant les couples IgA/récepteurs grâce à un lecteur de thermophorèse (Monolith NT.115 Nanotemper, plateforme IBCP, Lyon).

Microscopie confocale sur cellules dendritiques

Des lames LabTek® (Sigma, C6807) étaient adsorbées avec 500µL de Poly-L-lysine (Sigma, P4707) et incubées 1h à 37°C. Les lames étaient lavées au PBS et séchées 1-2h sous un PSM. Les moDC (500µL) étaient incubées à 1x10⁶ cellules/lame dans du milieu RPMI complet sur la nuit à 37°C. Après 2 lavages légers au PBS, les cellules étaient incubées avec 6µg d'anticorps dans 200µL de RPMI complet à 37°C pendant 1h. Après 2 lavages au PBS, les cellules étaient fixées 5 min (PBS, 4% formaldéhyde), de nouveau lavées puis les sites aspécifiques étaient bloqués (PBS, BSA 1%) pendant 15min à RT. Les cellules étaient perméabilisées (PBS, BSA 1%, Triton 0,1%) 2 min puis lavées 2 fois au PBS. Les anticorps primaires étaient ajoutés 1h à 4°C : anti-CD71 humain (1/200, lapin, Thermofisher, PA5-27739), anti-CD209 humain (1/50, lapin, Thermofisher, PA5-19966), anti-CD369 humain (1/200, lapin, Thermofisher, PA5-34382), anti-CD89 humain (1/500, lapin, Abcam, ab124717), anti-IgA humaine Alexa 555 (1/200, chèvre, Southern Biotech, 2050-32) ou anti-IgA murine Alexa 555 (1/200, chèvre, Southern Biotech, 1040-32). Les cellules étaient lavées 2 fois au PBS puis de nouveau incubées 45min à 4°C avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin Alexa 488 (1/200, chèvre, Southern Biotech, 4050-30). Les cellules étaient lavées au PBS puis le noyau était marqué 5-10 min au Draq5 (1/1000, Abcam, ab108410). Après 2 lavages, les cellules étaient montées entre lame et lamelle avec du vectashield (Vector laboratories, H-1400) puis observées au microscope à fluorescence.

Couplage des Ig avec les antigènes vaccinaux (Ag)

Les couplages étaient basés sur un *ratio* de 2 Ag pour un monomère d'Ig. Ainsi, 4 moles de SseB ou d'OmpC étaient utilisées pour une mole de SIgA alors que 10 moles étaient utilisées pour une mole de SIgM. Le complexe était associé grâce à une liaison covalente rendue possible par le sulfo-KMUS (0,48mg/mL final, Thermofisher, 21111). La SIgA était ensuite dessalée (Fisher Scientific, 10753007) puis l'Ag était ajouté. Après la formation de la liaison à RT pendant 30min, la construction était conservée à 4°C.

Digestion à la papaine

Les IgA dimériques seules ou couplées avec l'antigène SseB ont été digérées sur de la papaine immobilisée (Thermo scientific, 20341) selon les instructions du fournisseur. En bref, 300µg

d'IgA couplées ou non étaient incubés sur la nuit à 37°C sous agitation dans du phosphate de sodium (20mM), de l'EDTA pH 7 (10mM), de la cystéine-HCl (20mM) à pH 7 et avec la papaïne. Les IgA étaient séparées de la papaïne par centrifugation et 1,5mL de Tris-HCl à pH 7,5 (10mM) étaient ajoutés.

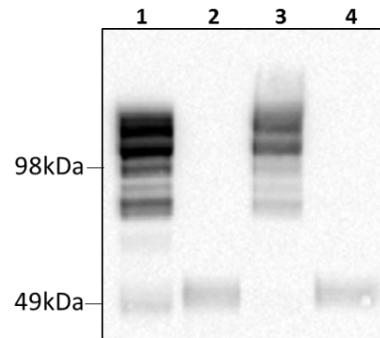


Figure 27 : Western blot confirmant la digestion enzymatique des IgA par la papaïne.

(1) dIgAC5 murine. (2) dIgAC5 digérée à la papaïne. (3) dIgAC5 couplée à SseB via le Sulfo-KMUS. (4) dIgAC5-SseB digérée à la papaïne

Test d'activation des TLR *in vitro* à l'aide de lignées cellulaires

Les lignée cellulaires HEK293 n'exprimant pas de TLR (hTLR-), seulement le TLR1/2 (hTLR2), le TLR3 (hTLR3), le TLR4 (hTLR4), le TLR5 (hTLR5) ou le TLR9 (hTLR9) (InvivoGen) ont été incubés en plaque 96 puits avec SseB (30µg/mL) ou avec les ligands de leur TLR soit respectivement Pam-2 (0,1ng/mL, InvivoGen), Poly I:C (100ng/mL, InvivoGen), LPS K₁₂ (1ng/mL, InvivoGen), flagelline (20ng/mL, InvivoGen), CpG ODN 2006 (3µg/mL, InvivoGen). Les cellules étaient lavées puis incubées en milieu Hek Blue. La DO était mesurée 24h après à 630nm.

Injection de protéines en anse intestinale chez la souris

Les antigènes SseB et OmpC étaient couplés à la Cyanine 3 (Cy3 fast Conjugation Kit, Abcam, ab188287) à raison de 200µg d'antigène pour 100µg de réactif de conjugaison. Les Antigènes étaient ensuite couplés aux Ig suivant le protocole précédemment décrit. Pour la préparation des anses intestinales, les souris étaient mises à jeun la veille, anesthésiées par l'injection intra-péritonéale de kétamine et xylazine (respectivement 100 et 10 mg/kg). La température des souris était maintenue à 37°C durant la durée de la chirurgie. Les solutions de SseB-Cy3, SIgAC5-SseB-Cy3, SIgMHF5-SseB-Cy3, OmpC-Cy3, SIgAC5-OmpC-Cy3 et SIgMHF5-OmpC-Cy3 étaient administrées à 0,2mg/mL (PBS) dans une anse intestinale contenant une PP jusqu'à ce que l'anse

soit gonflée. Après minimum 1h, les souris étaient mises à mort par dislocation cervicale et la portion d'intestin était prélevée et lavée au PBS. L'intestin était fixé O/N à RT dans 4% de paraformaldéhyde et inclus dans une solution d'OCT (optimal cutting tissue). Des sections de 7-8 μm (Leica Microsystems, Leica cryostat model CM1950) étaient fixées sur des lames (VWR, 631-0099) et directement observées au microscope à épi fluorescence (Nikon Eclipse Ti-S).

Modèle inversé *in vitro* d'épithélium humain associé au follicule

Le modèle de transport était basé sur la méthode décrite par (326) et modifiée par Rochereau *et al* (11). Brièvement, 3×10^5 cellules épithéliales humaines Caco-2 étaient disposées sur des transwells avec pores de $10 \mu\text{m}$ (Sigma, CLS3402). Ces derniers étaient retournés à J1 puis la résistance transépithéliale (TEER) était mesurée (Millicell-ERS Ohmmeter, Millipore) jusqu'à atteindre une TEER de 350-400 Ω . La lignée cellulaire Raji de lymphocyte B humains était ensuite rajoutée (5×10^5 cellules) sur la moitié des transwells au niveau basal jusqu'à une diminution d'environ 100 Ω dans la condition avec Raji par rapport à celle sans Raji.

Transport des complexes Ig-Ag dans le modèle inversé

Le transport des Ig-Ag se base sur la méthode utilisée par Rochereau *et al* (11). Rapidement, les transwells contenant le modèle épithélium intestinal humain étaient retournés et insérés dans des tubes de silicone. La partie apicale hermétiquement isolée était remplie de milieu DMEM complet puis les échantillons étaient injectés à la concentration indiquée selon l'expérience. Après 90 min d'incubation à 37°C, le milieu contenu dans la partie basale était prélevé et conservé à -20°C avant titration par ELISA.

Culture de la souche SL1344 de *Salmonella enterica* Typhimurium

La souche SL1344 de *Salmonella enterica* Typhimurium a été fournie par le Dr Blaise Corthésy. Le stock glycérol (milieu lysogeny broth (LB), streptomycine 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15% glycérol) était prélevé avec une anse et étalé sur gélose LB (streptomycine 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$, agar 15g/L) afin d'obtenir des colonies isolées. Après 24h d'incubation à 37°C 5% CO₂, une colonie était prélevée et déposée dans 3mL de LB_{strep} liquide (streptomycine 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Après une nuit à 37°C 5% CO₂, 120 μL étaient dilués dans 3mL de LB_{strep}. La densité optique (DO) était mesurée et les bactéries étaient incubées à 37°C 5% CO₂ sous agitation. Les bactéries ont ensuite été titrées sur gélose LB_{strep} à différents temps d'incubation, permettant d'établir une courbe de croissance de la souche SL1344 avec une équivalence entre DO et Colony-forming unit (Cfu).

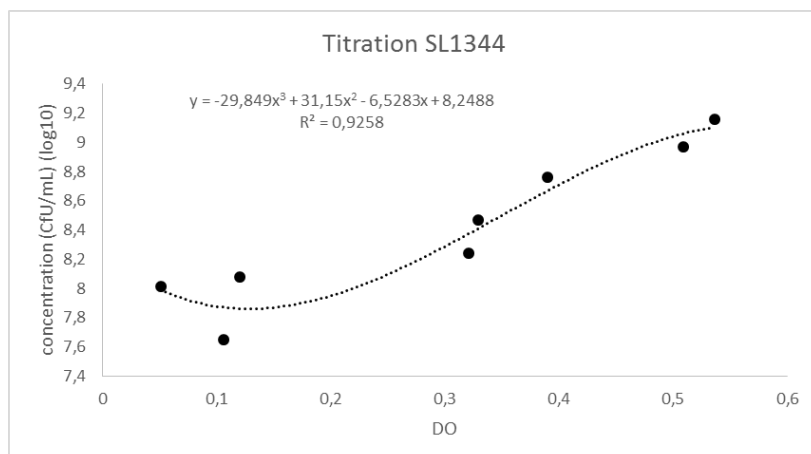


Figure 28: Modélisation théorique de la courbe de croissance de *Salmonella enterica* Typhimurium SL1344.

Infection orale par *Salmonella* chez la souris

La souche SL1344 en phase de croissance était diluée aux concentrations de 1×10^8 Cfu/mL, 1×10^7 Cfu/mL, 1×10^6 Cfu/mL, 1×10^5 Cfu/mL dans du PBS (selon la concentration théorique et vérifiée le lendemain par titration). Les souris BALB/c de 7-9 semaines étaient infectées avec 100 μ L de bactéries par gavage. Leur poids était mesuré chaque jour. Les souris étaient mises à mort en cas de perte de plus de 20% de poids par rapport au groupe de souris non infectées et/ou en cas de score >6 par rapport aux critères établis dans la fiche de suivi clinique ci-dessous. Par la suite, les souris étaient infectées avec une dose théorique de 5×10^5 Cfu de *Salmonella* et réelle comprise entre 1×10^5 et 1×10^6 Cfu.

Table 9: Fiche de suivi clinique appliquée aux souris infectées par *S. Typhimurium*.

Points d'observation		Valeur
Liés à l'infection	Poids (souris/témoin)	6
	Diarrhées	6
Aspects physiques	pelage luisant, plaqué contre la souris	0
	Pelage terne	1
	Pelage très terne, hérissé, absence de nettoyage	2
Aspects faciaux	Yeux ronds, vibrisses écartées, oreilles décollées	0
	Yeux resserrés, vibrisses regroupées, oreilles rabattues	3
Aspects comportementaux	Pas de signes particuliers	0
	Modification du comportement exploratoire	1
	Dos voûté, crispations au niveau du ventre	2
	Prostration, isolement du groupe dans la cage	4
Lors de la manipulation	Réaction à un stimulus	0
	Réaction aux stimuli, vocalisations, comportement agressif	1
	Absence de réaction aux stimuli, apathie	2
		TOTAL
≤4	Pas de procédure de gestion de la douleur	
=5	Alerte du concepteur, isolement de l'animal	
≥6	Sortie de l'animal de la procédure	

Suivi de la distribution de *Salmonella* après infection *in vivo*

Des souris BALB/c de 7 semaines étaient infectées avec 1×10^7 Cfu par gavage. Des mises à mort étaient effectuées à J4, J5, J6 et J7 post-infection. Le foie, la rate, les MLN, les PP, de l'intestin et des fèces étaient récupérés dans des tubes préalablement pesés. Les échantillons étaient pesés et les PP étaient traitées au DMEM complémenté à la gentamycine (100µg/mL) pendant 30min à 37°C. Les organes étaient écrasés sur tamis cellulaire 70µm (Miltenyi) et lavés avec du tampon de lyse (PBS, 1% Triton X100). Les fèces étaient diluées à 150mg/mL dans du PBS. Après centrifugation, le surnageant était utilisé pour la titration. Les échantillons provenant des organes étaient dilués dans du tampon de lyse et les bactéries étaient déposées sur gélose LB (streptomycine 90µg/mL) avec un ensemenceur (Interscience, easySpiral®) et puis comptées grâce un lecteur (Interscience, Scan® 1200).

Test de neutralisation de *Salmonella*

Basé sur les travaux de Mathias *et al* (134). La souche SL1344-GFP⁺ (Ampicilline te streptomycine résistante) fournie par B. Corthésy était cultivée comme indiqué précédemment pour la souche SL1344 en rajoutant de l'ampicilline dans les milieux (75µg/mL). En phase

exponentielle de croissance, la concentration était évaluée suivant la courbe théorique et la bactérie était titrée sur gélose (lecture 24h après). Les bactéries étaient diluées dans du PBS à 6×10^7 Cfu/mL. 100 μ L de bactéries étaient incubés 2h à RT avec 100 μ L d'Ac à différentes concentrations. Les cellules Caco-2 étaient décollées avec de la trypsine/EDTA (Sigma) puis comptées. $1,5 \times 10^5$ cellules (40 bactéries pour une cellule) étaient ajoutées à la mixture Ac/bactéries dans du DMEM complet pendant 2h à 37°C. Le surnageant était éliminé après centrifugation 5min à 1500rpm. Les cellules étaient re-suspendues dans du DMEM complet gentamycine 100 μ g/mL à 37°C durant 2h. Les cellules étaient lavées 3 fois au PBS gentamycine 100 μ g/mL et marquées au 7AAD. Les cellules GFP⁺ étaient ensuite analysées en cytométrie en flux.

Chapitre V : L'impact de la structure des IgA sur leur capacité à activer la réponse immunitaire adaptative

“Impact of IgA structure on their ability to stimulate adaptive immunity”

ARTICLE ET RESUME

Les IgA sont divisées en deux sous-classes ; IgA1 et IgA2, elles-mêmes présentes sous forme monomérique, dimérique ou sécrétoire. Les IgA1 monomériques sont fortement représentées dans le sérum et ont été décrites comme ayant des propriétés anti-inflammatoires. Bien que les IgA2 soient plus résistantes aux protéases de l'intestin, les IgA1 et IgA2 dimériques et sécrétoires sont toutes les quatre présentes au niveau des muqueuses. Un rôle tolérogène des IgA de forte affinité contre le microbiote est observé dans ce tissu et semble lié à une réponse thymo-dépendante alors qu'une réponse thymo-indépendante se traduit par une réponse IgA de faible affinité contre les pathogènes. Afin d'étudier la fonction des IgA1 et IgA2, nous avons testé la capacité des différents isotypes et isoformes d'IgA à induire une réponse immunitaire.

Nous avons mis en évidence une meilleure affinité des IgA1 pour le récepteur Fc α RI et des IgA2 pour DC-SIGN. Par ailleurs, nous avons confirmé un rôle anti-inflammatoire des IgA1 et pro-inflammatoire des IgA2. Ces réponses sont exacerbées avec les IgA sous forme dimériques et peu de différences sont observées en présence de la pièce sécrétoire. Malgré des profils d'activation différents, toutes les IgA sont capables d'activer des LT CD8 cytotoxiques. Enfin, une meilleure stimulation des moDC par les IgA2 dimériques par rapport aux IgA1 dimériques pourrait s'expliquer par la meilleure capacité des IgA2 à up-réguler leurs récepteurs à la surface des DC.

1 **Impact of IgA structure on their ability to modulate adaptive immunity**

2

3 Rémi GAYET¹, Francesco NICOLI², Blandine CHANUT¹, Mireille PAUL³, Nicolas
4 ROCHEREAU¹, Eva MICHAUD¹, Christophe GUILLON⁴, David PRICE⁵, Laura
5 PAPAGNO², Gilles BIOLEY⁶, Blaise CORTHESEY⁶, Stéphane PAUL^{1*}.

6 **Affiliations:**

7 ¹ GIMAP/EA3064, Université de Lyon, CIC 1408 Vaccinology, F42023 Saint-Etienne, France;

8 ² Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, DHU FAST, CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies
9 Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France; ³INSERM U1135, CIMI-Paris, Paris, France.

10 ³ SAINBIOSE, INSERM U1059, University of Lyon, Saint-Etienne, F-42023, France

11 ⁴ Retroviruses and Structural Biochemistry, Univ Lyon, CNRS, UMR5086, Institut de Biologie et Chimie des
12 Protéines, Lyon, France

13 ⁵ Institute of Infection and Immunity, Cardiff University School of Medicine, Cardiff CF14 4XN, United
14 Kingdom

15 ⁶ R&D Laboratory of the Division of Immunology and Allergy, CHUV, Centre des Laboratoires d'Epalinges,
16 1066 Epalinges, Switzerland

17

18 * Corresponding author: Stéphane PAUL; stephane.paul@chu-st-etienne.fr

19 Faculté de médecine de St-Etienne, Laboratoire GIMAP

20 10 rue de la Marandière, 42270 St Priest-en-Jarez

21 Tel: +33 (0) 4 77 42 14 84; Fax: +33 (0) 4 77 42 14 86

22

23 **SUMMARY**

24 The role of IgA isoforms and isotypes remains poorly understood, especially in mucosa.
25 Gayet et al. report that IgA2 induce a pro-inflammatory response leading to a CD8 T cell-
26 dependent toxicity whereas IgA1 rather trigger an anti-inflammatory response.

27 **ABSTRACT**

28 Human IgA are defined based on their subclasses *i.e* either IgA1 or IgA2 isotypes and on their
29 monomeric, dimeric or secretory conformation. Serum monomeric IgA mainly IgA1 are
30 usually considered as an anti-inflammatory isotype whereas mucosal dimeric and secretory
31 IgA have clearly dual pro- and anti-inflammatory effects. Here, we show that IgA isotypes
32 and isoforms mediate different binding abilities to FcαRI, Dectin-1, DC-SIGN and CD71 on
33 monocytes derived dendritic cells (moDC). We describe that IgA regulate the expression of
34 their own receptors, triggering modulation of CD1a⁺ moDC maturation. We also demonstrate
35 that dimeric IgA2 induce a pro-inflammatory response whereas dimeric IgA1 rather trigger an
36 anti-inflammatory response. In addition, the stimulation of DC by the two isotypes leads to
37 cytotoxic CD8⁺ T cells activation. Our study particularly pave the way for further
38 investigations on IgA/receptors interaction, IgA-mediated CD8⁺ T cells activation pathway
39 and IgA response with or without antigen binding which could definitively determine the
40 inflammatory and tolerogenic IgA mechanisms.

41 **Keywords:** IgA, isotype, isoform, secretory, dendritic cells

42

43 **INTRODUCTION**

44 With a production of around 75 mg/kg/day (Macpherson et al., 2012), human
45 immunoglobulin A (IgA) are the most secreted antibodies by comparison with IgG
46 (~22mg/kg/day) or with IgM (~7mg/kg/day). In particular, IgA is the main antibody isotype
47 represented in mucosal fluids, comprising vaginal and gastric secretions but also saliva and
48 colostrum (Woof and Mestecky, 2005). IgA can be produced as a monomeric (mIgA) or a
49 dimeric (dIgA) form after binding with J-chain. The secretory form (SIgA) is generated by
50 recovering a fragment of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) during epithelial
51 transcytosis (Brandtzaeg and Prydz, 1984).

52 Human IgA1 and IgA2 differ by the size of their hinge region between the C α 1 and C α 2
53 regions, their shape, their amino acid sequence and especially their glycosylation profiles
54 (Zhou and Ruprecht, 2014) (Kerr, 1990). IgA1 contains two N-linked glycosylation and five
55 O-glycosylation sites whereas IgA2 is devoid of O-glycosylation but contain two additional
56 N-glycosylation sites (Kerr, 1990). Both the J-chain and the secretory component (SC) also
57 have their own glycosylation sites (Huang et al., 2015). The proportion of IgA1 is globally
58 higher (~85%) as compared to IgA2, especially in the blood, the spleen (~95%), the nasal
59 mucosa (~96%), the proximal small intestinal mucosa (till 84%) or the colostrum (~65%)
60 (Kerr, 1990; Kett et al., 1986). IgA2 are preferentially found in colonic fluids (~65%) and the
61 female reproductive system (Kerr, 1990) (Brandtzaeg, Immunol Rev, 2005). IgA are mainly
62 monomeric in the serum (80% to 99% depending on the individual) (Woof and Kerr, 2006)
63 whereas mucosal IgA are predominantly dimeric. Human IgA were described to bind several
64 receptors such as the Fc α receptor I (CD89) (Lu et al., 2011), the transferrin receptor (CD71)
65 (Moura et al., 2001), dectin-1 (CD369) (Rochereau et al., 2013) or Dendritic Cell-Specific
66 Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN/CD209) (Baumann et
67 al., 2010).

68 Serum IgA are derived from plasma cells in the bone marrow whereas dIgA are produced by
69 plasma cells from the *lamina propria* beneath the mucosa epithelium (Lycke and Bemark,
70 2017). They have been extensively studied since their function, called immune exclusion, is
71 the first line of protection in mucosal surface. This consists of commensal or pathogen
72 bacteria shaping by respectively low- or high-affinity IgA, impeding their entrance in
73 intestinal epithelium. Nevertheless, in addition to this anti-inflammatory function, dIgA and
74 SIgA were recently described as pro-inflammatory actors in mucosa by recruiting neutrophils

75 (Heineke et al., 2017) or by transporting mucosal antigens (Ag) to Ag presenting cells (APC)
76 such as macrophages and dendritic cells (DC) in *lamina propria* or Peyer's Patches. In this
77 case, inflammation was induced after IgA recognition by receptors such as the CD71
78 transferrin receptor (Woof and Mestecky, 2005). Given the role of IgA in the microbiota
79 selection from the first years of life, an IgA-dependent regulation was supposed between
80 defense mechanisms against pathogens and the antibody-mediated immunoselection (AMIS)
81 (Bunker et al., 2017; Kubinak and Round, 2016; Macpherson et al., 2018). mIgA are mainly
82 described for their anti-inflammatory effect in the serum (Mkaddem et al., 2014) even if a
83 study recently described a pro-inflammatory effect FcαRI, Fcα/microR (CD89)-dependent
84 Hansen, 2018 #49}.

85 Roles of IgA are highly diverse and would deserve to be further investigated. Differential
86 interactions of IgA isotypes and isoforms with their receptors, such as C-type lectin receptors,
87 could explain the diversity of immune responses. In addition, location of dIgA in the mucosa
88 areas compared to serum monomeric IgA could result in different immune functions. Finally,
89 both IgA1 and IgA2 are found in mucosal secretion, raising the question of their respective
90 local functions. Here, we aimed to clarify the difference between IgA1 and IgA2 in their
91 ability to bind to DC and to induce pro- or anti-inflammatory response. The
92 immunostimulatory effects of polymeric IgA vs monomeric IgA were then compared to
93 understand their potential effect in the human body.

94

95 **RESULTS**

96 **IgA1 and IgA2 bind to different receptors on moDC populations**

97 To determine whether the binding capacity of IgA isotypes and isoforms on APCs was
98 different, the interaction of monoclonal mIgA, dIgA and SIgA IgA1 and IgA2 to IgA
99 receptors on human dendritic cells (DC) was compared. Interestingly, we described for the
100 first time the expression of CD89, CD71 but also CD369 and CD209 on moDC surface (**Fig.**
101 **1A and B**). Moreover, none of the receptors was ubiquitously displayed on moDC
102 (**Supplementary Figure S1a**), suggesting either the presence of different subsets of moDC or
103 a heterogeneous expression of IgA receptors on moDC. In addition, some moDC displayed
104 intracellular IgA signal without detectable staining for a single specific receptor
105 (**Supplementary Figure S1a**) suggesting either internalization and degradation of this
106 receptors after IgA binding or the uptake of IgA by another receptor. mIgA1 and mIgA2
107 bound specifically to the four receptors but mIgA1/CD89 co-localization present the highest
108 staining intensity (**Fig. 1A**) which suggest both a high expression of CD89 on moDC and a
109 high recognition of mIgA1 by CD89. In contrast, more intense co-localization staining
110 between mIgA2 and CD369 and CD71 seemed to occur (**Fig. 1B**). Globally the same number
111 of co-localizations spots was observed between dIgA and SIgA, suggesting a low effect of SC
112 association for binding to receptors (**Fig. 1A and B**). Binding of dIgA1 with the four
113 receptors seems to be lost (**Fig. 1A**) whereas dIgA2 keep their ability to bind CD89, CD369
114 and CD209 compared to their monomeric form (**Fig. 1B**).

115 The binding affinities of IgA isotypes on different receptors were then compared using ELISA
116 and microscale thermophoresis by increasing ligand/receptors molar *ratio*. We firstly
117 observed a 10-fold higher affinity of mIgA1 than mIgA2 to the CD369 (**Supplementary**
118 **Figure S1c**) and 3-fold to the α -chain receptor CD89 (**Fig. 1C**) with respective K_d of 2 μ M to
119 6 μ M (**Supplementary Figure S1b**). In contrast, mIgA2 bound CD209 with a 30% better
120 affinity than IgA1 (**Supplementary Figure S1d**). We were not able to clearly measure the
121 affinities of IgA isotypes and isoforms to CD71 (**Fig. 1E and Supplementary Figure S1e**). A
122 stronger affinity of dIgA1 compared to mIgA1 was observed on CD89 (**Fig. 1C**). In contrast,
123 dIgA1 affinities with CD369 and CD71 were quite equivalent (**Fig. 1D and F**) or slightly
124 lower for CD209 (**Fig. 1E**). dIgA2 affinity decreased for CD89, disappeared for CD369 and
125 CD71, but increased for CD209 when compared to mIgA2 (**Fig. 1C, D and F**). When
126 comparing dIgA2 and dIgA1, the former interacts better with CD209 (**Fig. 1E**), whereas the
127 latter displayed increased affinities for all the other receptors (**Fig. 1C, D and F**).

128 We further wondered whether IgA uptake was affected by the profile of IgA receptors
129 expressed on moDC by flow cytometry. Interestingly, almost no IgA⁺ moDC were observed
130 when the cells expressed only one IgA receptor, suggesting the requirement of at least two
131 receptors to significantly increase the IgA internalization by moDC (**Fig. 1G**). In contrast, the
132 frequency of IgA⁺ cells rose around 2-, 3- and 4-times for moDC expressing respectively two,
133 three and four receptors, indicating a proportional correlation between the expression of IgA
134 receptors on DC and their ability to internalize IgA (**Fig. 1H**). No difference in IgA⁺ moDC
135 profile was observed with the various isoforms (**Supplementary Figure S1f**). A predominant
136 role of CD209 and CD369 for IgA uptake was suggested since 90% of IgA⁺ cells expressed at
137 least these two receptors (**Fig. 1I**). The majority of CD209 and CD369-expressing cells IgA⁺
138 cells only expressed these two receptors (>80%) whereas less than 10% also expressed either
139 CD89 or CD71 and less than 10% expressed the four receptors (**Fig. 1G**). A 2-fold higher
140 proportion of quadruple positive cells was observed with IgA1 compared to IgA2, suggesting
141 a more important role of CD89 and CD71 in IgA1 than IgA2 internalization. Thus, we
142 emphasized a different binding of IgA isotypes to the CD89, CD369, CD209 and CD71
143 expressed on moDC.

144 **Dimeric IgA2 induce an over-expression of their own receptors on DC surface.**

145 moDC had been described as divided into two subsets discriminated by the expression of the
146 surface marker CD1a (**Supplementary Figure S2a**) and displaying different functions
147 (Chang et al., 2000; Gogolak et al., 2007). Therefore, we wondered whether one of the IgA
148 isotypes or isoforms preferentially bound CD1a⁻ (mDC2) or CD1a⁺ (mDC1) moDC subset.
149 First, the expression levels of the IgA receptors were determined on moDC. Without any
150 stimulation, moDC constitutively express CD209, CD369 and slightly CD89 but did not
151 express CD71 (**Fig. 2A and Supplementary Figure S2b**). The absence of CD71 expression,
152 not observed in immunofluorescence, might be due to the antibody used or the absence of
153 IgA. At steady state, mDC1 displayed the same expression level of CD89 on their surface
154 than mDC2 cells (**Fig. 2B**). In contrast, a significant 20% higher CD209 expression (**Fig. 2C**)
155 whereas a 30% lower amount of CD369 (**Fig. 2D**) were observed on CD1a⁺ cells compared to
156 CD1a⁻ cells. The uptake of IgA isotypes and isoforms by mDC1 and mDC2 were then
157 compared. No difference of dIgA2 and SIgA2 uptake was noticed between CD1a⁻ and CD1a⁺
158 subsets whereas the proportions of IgA⁺ cells in CD1a⁻ moDC after mIgA2, mIgA1 and
159 particularly dIgA1 and SIgA1 incubation were increased respectively by 35%, 60%, 100%
160 and 90% compared to CD1a⁺ subset (**Fig. 2E**). Interestingly, 2-fold and 1.6-fold increases of

161 IgA⁺ cells were observed with mIgA2 compared to mIgA1 on CD1a⁺ and CD1a⁻ cells,
162 respectively (**Fig. 2E**). A 2-fold and 6-fold reduction of IgA⁺ cells proportion were observed
163 with dIgA1 or dIgA2 on CD1a⁺ and CD1a⁻ cells respectively compared to their monomeric
164 counterparts (**Fig. 2E**). These results indicated both a higher interaction of mIgA isotypes
165 with moDC than dIgA or SIgA and a higher ability of mDC2 cells to internalize IgA than
166 mDC1 subset.

167 We then hypothesized that IgA binding could induce the up-regulation of their receptors. A 2-
168 fold CD71 over-expression on moDC after a treatment with TNF- α , IL-1 β and IL-6
169 (**Supplementary Figure S2e**) as previously described (Pasquier et al., 2004) was confirmed.
170 A 1.5-fold over-expression of CD89 on CD1a⁻ cells with the cytokine cocktail
171 (**Supplementary Figure S2f**) was also observed compared to non-stimulated moDC.
172 However, treatment of moDC with mIgA1, dIgA1, SIgA1 or mIgA2 did not significantly
173 increase CD71 and CD89 expression (**Fig. 2F and I, Supplementary Figure S2e, f**). In
174 contrast, these isotypes and isoforms increased CD209 and CD369 surface expression on
175 CD1a⁺ cells by 45% and on CD1a⁻ cells by 25% (**Fig. 2G and H, Supplementary Figure**
176 **S2g, h**), suggesting that CD1a⁺ cells were more affected by the IgA-dependent modulation of
177 receptors expression. A 2-fold and 3-fold over-expression of CD71 and CD89, respectively,
178 were observed when CD1a⁻ cells were incubated with dIgA2 compared to the other isoforms
179 and isotypes (**Fig. 2F and I**). While dIgA2 induced the same level of IgA receptors up-
180 regulation as dIgA1 or mIgA on CD1a⁺ cells (**Fig. 2F, G, H and I**), a 2-fold increase of CD89
181 (**Fig. 2F**), 1.4-fold increase of CD369 (**Fig. 2G**), 1.2-fold increase of CD209 (**Fig. 2H**) and 3-
182 fold increase of CD71 (**Fig. 2I**) were observed between dIgA2 and mIgA2 or dIgA1
183 conditions on CD1a⁻ cells. Thus, we pointed out the capacity of IgA1 and IgA2 to increase the
184 expression of CD209 and CD309, two receptors highly involved in IgA uptake, especially on
185 mDC1 surface. Interestingly, in spite of a lower internalization of dIgA compared to mIgA,
186 dIgA2 were able to up-regulate their own receptors.

187 **Dimeric IgA efficiently mature moDC**

188 Since both IgA isotypes and isoforms were differently taken up by moDC, we wondered
189 whether they also differently stimulated moDC. Even if lipopolysaccharide (LPS) treatment
190 globally triggered the same effect between activation markers expression of CD1a⁺ and CD1a⁻
191 cells (**Supplementary Figure S3a**), only significant increases of CD40, HLA-DR, CD86 or
192 CD40 and HLA-DR were observed respectively on CD1a⁺ and CD1a⁻ cells (**Fig. 3A**). We
193 avoided an endotoxin effect of our IgA purification process by using polymyxin B. In this

194 case, a conserved ability of moDC to be activated with a cytokine cocktail was observed (**Fig.**
195 **3B, Supplementary Figure S3b**). mIgA had a limited effect on the expression of co-
196 stimulatory molecules on moDC. Only 10% down-regulation of CD86 and 20% up-regulation
197 of CD80 were observed on CD1a⁻ cells (**Fig. 3A, Supplementary Figure S3a, and b**). A
198 CD86 overexpression of at least 25% on CD1a⁻ cells and significant increases of HLA-DR
199 and CD40 expression on CD1a⁺ and CD1a⁻ cells surface were observed with dIgA1 and
200 dIgA2 compared with no treatment (**Fig. 3B and Supplementary Figure S3b**). Furthermore,
201 dIgA1 and dIgA2 significantly increased respectively CD86, CD40, HLA-DR and CD40,
202 HLA-DR expressions on CD1a⁺ compared to mIgA1 and mIgA2 (**Table 1**). In addition,
203 dIgA1 and dIgA2 significantly increased respectively CD86, CD40 and HLA-DR expressions
204 on CD1a⁻ compared to mIgA1 and mIgA2 (**Table 1**). Moreover, a 2-fold higher expression of
205 surface HLA-DR and CD86 or only CD86 were observed on CD1a⁺ cells (**Fig. 3C**) or CD1a⁻
206 cells, respectively (**Fig. 3D**), after dIgA2 stimulation compared to dIgA1. Thus, the mDC2
207 subset seems to be more efficiently activated by IgA, with the dimeric isoform displaying the
208 strongest effect.

209 **dIgA2 and dIgA1 induce opposite inflammatory profiles in moDC**

210 In order to characterize the immune profile triggered by the various IgA isoforms and
211 isotypes, we performed transcriptomic analysis of IgA-treated moDC (**Supplementary**
212 **Figure S4a, b, c**). Even though CD40 ligand (CD40L) was up-regulated with both mIgA1 and
213 mIgA2, the latter differently regulated RNA expression of moDC (**Fig. 4A**). mIgA1 increased
214 more than 2-fold the expression of genes involved in immune cells attraction such as
215 chemokine (C-C motif) ligand 8 (CCL8), CD40, interleukin (IL)-16 and the transporter
216 associated with antigen processing-associated glycoprotein (TAPBP) (**Fig. 4A**). In contrast,
217 mIgA2 induced the over-expression of two adhesion molecules Intercellular Adhesion
218 Molecule 2 (ICAM-2) and CD2 that are involved in the interaction between moDC and
219 adaptive immune components (**Fig. 4A**). Gene expression profiles after dIgA and SIgA
220 activation, which were quite similar, were then compared to the one induced by the mIgA
221 (**Fig. 4B, C**). More than 20 genes were down-regulated with dIgA1 (**Fig. 4B**) stimulation
222 whereas 18 (**Fig. 4C**) were over-expressed with dIgA2 compared to their respective
223 monomeric forms. While genes already over-expressed by mIgA1 (**Fig. 4A**) were still up-
224 regulated 4-fold for CD40 or 3.6-fold for TAPBP with dIgA1 (**Fig. 3B**), dIgA2 modified
225 expression of novel genes compared to mIgA2 (**Fig. 4C**). Both dIgA1 and dIgA2 induced
226 over-expression of (i) T cells chemo-attractants CCL5 and its receptors CCR1 and CCR3 for

227 dIgA1 (**Fig. 4B**) and CXCL10, CCL5 or the 15-fold over-expressed CCL19 for dIgA2 (**Fig.**
228 **4C**) (ii) genes involved in T cell activation such as the major histocompatibility complex
229 (MHC)-I HLA-A for dIgA1 (**Fig. 4B**) or IL-12A and IL-12B, ICAM-1 and CD80 with dIgA2
230 (**Fig. 4C**). In contrast, dIgA1 down-regulated whereas dIgA2 over-expressed genes involved
231 in (i) immune cells attraction such as CXCL12, CCL16, CCL8 or CCL2 for dIgA1 (**Fig. 4B**) or
232 neutrophils chemo-attractant CXCL8, CXCL1, CXCL2 and CCL3 for dIgA2 (**Fig. 4C**) (ii)
233 pro-inflammatory response such as IL-6, IFN- γ , RELB or NFKB1 (**Fig. 4B and C**) (iii) T
234 helper cells activation and differentiation such as IL-12A and B, IL-2, HLA-DPA1 which
235 were affected by dIgA1, especially the 5-fold down-regulated TNFSF11 (**Fig. 4B**). All
236 together, these results indicate a low influence of SC in DC activation but also different gene
237 expression induced by IgA1 and IgA2, which is accentuated by the dimeric/secretory isoforms
238 toward an anti-inflammatory profile for IgA1 and pro-inflammatory for IgA2.

239 In order to get further insights into the effect of IgA interaction with moDC, cytokine
240 production was measured in the culture moDC supernatants (**Supplementary Figure S4d**).
241 Globally, similar effects on cytokine secretion were observed between dimeric and secretory
242 IgA. In contrast, the dimeric isoforms were much more potent than the monomers to stimulate
243 cytokine production by moDC. TNF- α and IL-6 levels were increased 5-fold and 10-fold by
244 dIgA1 (**Fig. 4D**) and 33-fold and 700-fold by dIgA2, respectively (**Fig. 4E**). In addition, an
245 increase of around 1.5-fold of IL-16 was observed with dIgA1 and IL-23 secretion was
246 increased by 4-fold after stimulation with dIgA2 (**Fig. 4E**). Dimeric IgA also induced anti-
247 inflammatory cytokines production such as IL-10, which was increased by 1.6 with dIgA1
248 (**Fig. 4D**) or 7 with dIgA2 (**Fig. 4E**). Although a similar secretion of the T cell
249 chemoattractant IL-16 was observed between dIgA1 and dIgA2 stimulation, dIgA2 induced a
250 higher pro-inflammatory cytokines secretion such as TNF- α (~80-fold), IL-6 (~2-fold) and
251 IL-12p40 (~20-fold) combined with IL-23 (~5-fold) than dIgA1 (**Supplementary Figure**
252 **S4e**). Our results indicate a stronger effect of dimeric forms on gene transcription and
253 cytokine secretion compared to monomeric forms. In addition, the effect of dIgA2 was
254 stronger than dIgA1 and oriented towards a pro-inflammatory profile.

255 **IgA2 induce a stronger activation of cytotoxic CD8 T cells than IgA1**

256 To assess the quality of DC conditioning with the different IgA isotypes and isoforms, we
257 compared the ability of mIgA1 and mIgA2 to induce T cell proliferation in a mixed
258 lymphocyte reaction. Hardly any increase in the proportion of activated CD25⁺ CD4⁺ T cell
259 was observed in the presence of moDC incubated with IgA1 or IgA2 (**Fig. 5A**). Interestingly,

260 whereas only a limited effect was induced by mIgA1, a significant 1.4-fold increase of
261 CD25⁺CD8⁺ T cell proportion was observed after mIgA2 stimulation (**Fig. 5B**).

262 We then used an established model of *in vitro* priming to test the influence of IgA1 and IgA2
263 isotypes on the induction of CD8 T cells specific for a model antigen (e.g. Melan-A) from
264 naïve T cells (Lissina et al., 2016). Melan-A-specific CD8 T cells were primed in both the
265 presence of mIgA1 or mIgA2 (**Fig. 5C**). Interestingly, the presence of mIgA2, but not mIgA1,
266 yielded a higher expression of the transcription factor T-bet (**Fig. 5D, Supplementary Figure**
267 **S5a**) within primed T cells, which was not the case for Eomes (**Fig. 5E**). This was
268 accompanied by trends towards higher expression in granzyme B (**Fig. 5F, Supplementary**
269 **Figure S5a**) and perforin (**Fig. 5G, Supplementary Figure S5a**) expression in Melan-A
270 specific T cells in mIgA2 conditions, unlike mIgA1 conditions. The effect of IgA2 was
271 enhanced with its dimeric form whereas dIgA1 conserve an absence of T cell activation
272 (**Supplementary Figure S5b**). Taken together, these findings show that both monomeric
273 IgA1 and IgA2 can promote the induction of antigen-specific CD8 T cell responses, but with
274 a highest potential and Th1 bias for the IgA2 isotype.

275

276

277 **DISCUSSION**

278 In this study, we aimed to clarify the ability of different IgA isotypes and isoforms to interact
279 with putative receptors expressed on moDC and the related immune effector function. We
280 have found that IgA1 preferentially bind the Fc α RI whereas IgA2 affinity is higher for DC-
281 SIGN. In addition, their respective affinities are increased with the dimerization. We also
282 highlighted that IgA modulated the expression of their own receptors in CD1a⁺ and CD1a⁻
283 cells, two moDC subsets which differently behaved with IgA. Indeed, we demonstrated that
284 IgA1 stimulated DC, especially CD1a⁻ cells, toward an anti-inflammatory response whereas
285 IgA2 would be rather pro-inflammatory and that these responses are enhanced by dimeric
286 forms. Such immune profiles may engage various pathways leading to the observed priming
287 of functional cytotoxic CD8⁺ T cells.

288 “Classical” moDC called mDC1 were described as CD1a expressing cells, secreting a high
289 amount of IL-12p70 and inducing a Th1 differentiation (Cernadas et al., 2009). However, a
290 study described the presence of a functionally distinct cell subset, called mDC2 cells, which
291 did not express the CD1a marker (Chang et al., 2000). Our study further describes differences
292 between mDC1 and mDC2 (Chang et al., 2000; Gogolak et al., 2007) such as diverse
293 expression profiles of IgA receptors at steady state and differential responses to interaction
294 with IgA isotypes and isoforms. Indeed, expression of surface activation markers was
295 modified only on mDC2 after a mIgA stimulus at the opposite of LPS effect, suggesting that
296 this subset is more sensitive to the mIgA effect rather oriented towards an anti-inflammatory
297 pathway. Functional studies of individual mDC1 or mDC2 subsets could specify more
298 precisely their role in the modulation of immunity in response to interaction with IgA
299 molecules.

300 The Fc α RI (CD89), the transferrin receptor (CD71) and the DC-specific ICAM-3 grabbing
301 nonintegrin (DC-SIGN/CD209) were found to be expressed respectively on blood myeloid
302 cells (Monteiro and Van De Winkel, 2003) and on moDC (Geijtenbeek et al., 2000a; Pasquier
303 et al., 2004) (Geijtenbeek et al., 2000b). We similarly observed their expression on CD1a⁺ and
304 CD1a⁻ moDC and additionally demonstrate that Dectin-1 (CD369) is expressed on moDC
305 cells. Fc α RI is a transmembrane receptor which interacts with the Fc domain of both IgA1
306 and IgA2, with a higher avidity for immune complexes than monomeric or dimeric IgA. The
307 presence of alternative IgA receptors was suggested by addition of anti-Fc α RI antibody on
308 moDC which did not abrogate IgA binding (Heystek et al., 2002). CD71 was described as an

309 IgA1 specific receptor, with a higher avidity for monomeric IgA on Daudi cells (Moura et al.,
310 2001). Since incubation with mannose decreased SIgA binding on moDC, competition with
311 C-type lectins receptors which might bind glycosylations was suspected. Thus, DC-SIGN on
312 Chinese hamster ovary (CHO-S) and THP-1 cells and Dectin-1 on intestinal epithelial cells
313 were shown to specifically bind SIgA (Baumann et al., 2010; Rochereau et al., 2013). Our
314 study demonstrates a higher affinity of IgA1, especially dimeric IgA1, for CD89 and a
315 specific binding of IgA1 to CD71 together with a very low binding of IgA2 on CD71. We
316 also show here the expression of both DC-SIGN and Dectin-1 on moDC and their binding to
317 IgA, with a higher affinity of IgA2 and especially dimeric IgA2 for DC-SIGN. Thus, our
318 results suggest a potential regulatory function of IgA that depends more particularly on the
319 expression of DC-SIGN and Dectin-1 on DC. Since DC-SIGN (i) is highly expressed on
320 moDC (ii) preferentially binds IgA2, especially dIgA2 and (iii) its expression is increased by
321 dIgA2, one could hypothesize that these processes contribute to the stronger immune
322 activation observed with dIgA2. As DC-SIGN is involved in DC interaction with T cells *via*
323 ICAM3 (Geijtenbeek et al., 2000b), its up-regulation by dIgA2 could play a role in CD8 T
324 cell activation. Based on our observations, it would be interesting to study the pro- or anti-
325 inflammatory effect of IgA molecules in relationship to receptor expression in various cells
326 and tissues as for example in mucosa.

327 Except their role in IgA nephropathy (Fabiano et al., 2016), serum monomeric IgA1 were
328 thought to play a minor role in immunity whereas both the proportion and the function of
329 monomeric IgA2 remain to be clarified. Monomeric IgA induce anti-inflammatory response
330 in absence of antigen *via* the Fc α RI (Pasquier et al., 2005), for example by inducing death of
331 activated neutrophils (Wehrli et al., 2014). A role for other receptors has been suspected since
332 inhibition of Th17 cell response by mIgA occurred independently of Fc α RI and DC-SIGN
333 (Saha et al., 2017). Our results also demonstrate an anti-inflammatory response induced by
334 mIgA1 with (i) down-regulation of the CD86 co-stimulatory molecule and (ii) absence of pro-
335 inflammatory genes up-regulation and cytokine production. Interestingly, we also demonstrate
336 a mIgA1/CTL pathway with induction of (i) CCL8 and IL-16 expression, two T cell chemo-
337 attractants (Cruikshank et al., 2000) (ii) proteins involved in T cell activation such as CD40 or
338 TAPBP, a molecule involved in MHC-I processing (Sadasivan et al., 1996) and (iii) a mIgA1-
339 dependent CD8⁺ cytotoxic T cells differentiation and activation. In this context, further
340 investigations focusing on a potent regulatory role of this cell population, e.g. involving
341 killing pro-inflammatory cells, are worth to pursue.

342 One important function of dimeric IgA is to impede inflammation. This process is mediated
343 either by immune exclusion or by direct effects such as induction of tolerogenic DC *via* SIgA
344 binding on DC-SIGN (Diana et al., 2013). Interestingly, we demonstrate that dIgA1 amplify
345 the anti-inflammatory effect of mIgA1 on moDC. Indeed, dIgA1 (i) downregulate pro-
346 inflammatory genes in moDC, (ii) may induce T cell recruitment *via* CCL5 and IL-16
347 chemoattractant (iii) promote CD8 T cell response. The high secretion of IL-12p40 in absence
348 of IL-12p35 or p19 counterparts to form respectively IL-12p70 or IL-23(Teng et al., 2015)
349 could indicate the formation of the IL-12p80 homodimer, considered as a CD8 T cell or DC
350 chemoattractant (Cooper and Khader, 2007) (iv) trigger a poor diversity of cytokines secreted
351 in a very low quantity compared to dIgA2 except for IL-16 and IL-21. Besides, some studies
352 showed anti-inflammatory properties of TNF- α and IL-6 depending on their quantities and
353 timing of expression (Kassiotis and Kollias, 2001; Scheller et al., 2011) (Gillesen et al.,
354 1995).

355 Dimeric IgA are also involved in pro-inflammatory mechanisms, for example through the
356 recruitment and activation of neutrophils in mucosa (Heineke and van Egmond, 2017).
357 Besides, immune complexes could modulate the inflammatory effect described above.
358 Binding of antigens to mIgA1 forms immune complexes which are internalized by mature and
359 immature DC *via* Fc α RI to induce a pro-inflammatory response (Hansen et al., 2018; Pasquier
360 et al., 2004). It would be interesting to investigate the type and amplitude of immune response
361 induced by dIgA1 bound to their specific Ag to potentially observe the same pro-
362 inflammatory response as mIgA1. This concept would be in adequacy with the dual function
363 described for mucosal dimeric IgA. Indeed, interaction of IgA with commensal bacteria
364 induce tolerance whereas interaction with pathogens induce either immune exclusion or pro-
365 inflammatory response with recruitment of immune cells such as neutrophils (Pabst, 2012)
366 (Heineke and van Egmond, 2017).

367 A second explanation of the dual role of dimeric IgA could be that dIgA1 would be in charge
368 of anti-inflammatory responses whereas dIgA2 would induce a pro-inflammatory response.
369 Indeed, dIgA2 induce a clear pro-inflammatory response regarding the gene expression and
370 the cytokine secretion profiles of moDC. Proteins involved in the inflammatory NF- κ B
371 pathway such as RELB or NFKB1 are over-expressed and TNF- α and IL-6 are highly
372 produced by DC. In parallel, IL-12p40, which is a subunit of IL-23, is highly secreted
373 together with IL-23, indicating a potential role of Th17 after moDC activation by dIgA2
374 (Pfeifle et al., 2017). This result is in accordance with the Th17/IgA axis recently highlighted

375 (Milpied and McHeyzer-Williams, 2013). Recruitment of neutrophils by IgA in the intestine
376 is well documented (Heineke and van Egmond, 2017). In accordance with this finding, we
377 have observed that dIgA2 induce over-expression of neutrophil chemo-attractants such as
378 CXCL8, CXCL1, CXCL2 and CCL3 by moDC. In addition, an alternative observation related
379 to the dual role of IgA in the intestine is linked to the T cell-dependent (TD) or independent
380 (TI) induction of IgA production. Indeed, it is suggested that TD response induce high affinity
381 IgA responsible for the pro-inflammatory response to pathogens whereas low affinity IgA
382 induced by a TI pathway bind microbiota or inoffensive elements to trigger immune tolerance
383 (Pabst, 2012). In this context, our results would require more investigation to determine
384 whether the TI-induced IgA are mostly IgA1 and TD-induced IgA mostly IgA2.

385 All along our study, we pointed out a limited role of secretory component (SC) in moDC
386 activation when added to the dimeric form. We might make the hypothesis that SC does not
387 interfere with effects triggered by dIgA but could be required for immune exclusion
388 (Corthesy, 2010; Perrier et al., 2006) and for stabilizing dIgA in intestinal environment
389 (Crottet and Corthesy, 1998). mIgA1 and mIgA2 were also used to stimulate human mucosal
390 CD11c⁺ DC extracted from human biopsies. Our results tend to show similar results between
391 moDC and DC from human gut (**Supplementary Figure S3c**) but have to be confirmed on
392 these populations, especially to determine which DC subsets are implicated in IgA regulation.
393 Indeed, we observed different IgA isotypes and isoforms effects on the various moDC
394 subsets. Yet several DC have been described in intestinal mucosa such as (i) the CD103⁺ DC,
395 thought to be involved in Ag presentation in mesenteric lymph node (Farache et al., 2013) or
396 (ii) the CX3CR1⁺ DC, thought to be involved in Ag capture in *lamina propria* (Niess et al.,
397 2005). IgA receptors expression profiles on these populations together with their
398 inflammatory profile should be explored to confirm our results in a physiological model. The
399 functionality of cytotoxic T cells represented in the gut such as the intraepithelial CD8 $\alpha\alpha$
400 (Cheroutre et al., 2011) as well as the non-conventional intestinal T cells such as the Mucosal-
401 Associated Invariant T cells (MAIT) should also be considered to understand the impact of
402 IgA isotypes and isoforms. Indeed, supernatant of activated MAIT cells induces the
403 production of IgA by B cells (Bennett et al., 2017) and another study has described a
404 cytotoxic activity of MAIT cells linked to the presence of CD161 on these cells (Le Bourhis
405 et al., 2013).

406 **CONCLUSION**

407 In conclusion, we have demonstrated that while IgA can bind to different receptors displayed
408 on moDC, dimeric IgA1 present a better affinity for FcαRI and dimeric IgA2 for DC-SIGN.
409 Our data also highlight an optimization of the anti-inflammatory response induced by mIgA1
410 with dimeric IgA1 in the absence of antigen. In contrast, we have pointed out a strong pro-
411 inflammatory response induced by moDC activated with dimeric IgA2. Interestingly, both
412 processes lead to activation of cytotoxic CD8 T cells. We have also emphasized a regulatory
413 role of IgA which induced the overexpression of their own receptors on DC with various
414 efficiency depending on the isoform. Our study brings out novel information on the
415 relationship between IgA isotypes and isoforms and their functionality in the modulation of
416 immune responses. We pave the way toward investigations on IgA and receptors interaction
417 but also toward the IgA and CD8⁺ T cell pathway. This could explain some pathologies such
418 as inflammatory bowel diseases induced by an IgA-dependent dysbiosis or the IgA
419 nephropathy (Fabiano et al., 2016; Ludvigsson et al., 2014). Finally, our data are informative
420 for the choice of the appropriate isotype and isoform of IgA to serve as mucosal vaccine
421 vector (Rochereau et al., 2015; Rochereau et al., 2016) depending on the desired immune
422 response.

423 **ACKNOWLEDGMENTS**

424 The authors thank M. Zhiguo for his help for confocal microscopy visualization and analysis.
425 The study was supported by University Jean Monnet, FNS grant to BC and the Auvergne-
426 Rhône-Alpes region. RG was supported by a fellowship from the ARC1 and MSD (France).
427 This work was financed by research grants from the MSD Avenir program. The authors
428 declare no competing financial interests.

429 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

430 R. Gayet designed and performed the experiments and wrote, reviewed and edited the
431 manuscript. F. Nicoli designed and performed the experiments. M. Paul performed the
432 experiments. B. Chanut performed the experiments. D. Price provided the tetramer for the
433 cytotoxic activity measurement. C. Guillon designed the experiments and reviewed the
434 manuscript. L. Papagno designed and performed the experiments and reviewed and edited
435 manuscript. B. Corthesy designed the experiments and reviewed the manuscript. G. Bioley

436 designed the experiments and reviewed and edited the manuscript. S. Paul designed the
437 experiments and reviewed and edited the manuscript.

438 MATERIALS AND METHODS

439 Flow cytometry

440 Cell staining was performed in a buffer containing PBS, FBS (2%) and EDTA (1mM). Dead
441 cell exclusion was performed with 7AAD (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) or with a
442 LIVE/DEAD™-488nm staining (Invitrogen, Toulouse, France) for MLR experiment. Staining
443 antibodies were diluted at 1/200 except specified and cell staining was analyzed with a BD
444 FACS Canto II cytometer (BD Biosciences). The following antibodies were used for studying
445 the IgA-receptor profile of human moDC: Anti-CD89 BV510 (BD Biosciences), anti-CD71
446 FITC (BD Biosciences), anti-CD369 PE (BD Biosciences), anti-CD209 BV421 (BD
447 Biosciences), FITC mouse IgG2a, κ isotype control (BD Biosciences), BV421 mouse IgG1, κ
448 isotype control (BD Biosciences), PE mouse IgG2a, κ isotype control (BD Biosciences), BV510
449 mouse IgG1, κ isotype control (BD Biosciences). The following antibodies were used for
450 testing maturation and phenotype of human moDC: anti-CD209/DC-SIGN BV421 (BD
451 Biosciences), anti-CD1a APC-Vio770 (Miltenyi Biotec, Paris France), anti-CD14 PE (Miltenyi
452 Biotec), anti-CD11b PE-Vio770 (Miltenyi Biotec), anti-HLA-DR BV510 (BD Biosciences),
453 anti-CD80-PE-Vio770 (Miltenyi Biotec), anti-CD86-FITC (Miltenyi Biotec), anti-CD40-PE
454 (Miltenyi Biotec). The following antibodies were used for testing maturation and phenotype of
455 DC from human gut: anti-CD68 FITC (BD Biosciences), anti-CD1c PE (BD Biosciences), anti-
456 CD11b APC (BD Biosciences), anti-CD11 PE-Cy7 (BD Biosciences), anti-CD103 BV421 (BD
457 Biosciences), anti-CX3CR1 BV510 (BD Biosciences), anti-HLA-DR APC-H7 (BD
458 Biosciences), anti-CD80 APC (Biolegend, San Diego, USA). The following antibodies were
459 used for testing proliferation and activation of human T cells after MLR: anti-CD3 BV510 (BD
460 Biosciences), anti-CD8 PE-Cy7 (BD Biosciences), anti CD4 APC (BD Biosciences), anti-CD25
461 PE (BD Biosciences), anti-Ki67 BV421 (BD Biosciences)

462 Human IgA

463 Endotoxin-free human monomeric anti-hCD20 mIgA1 and mIgA2 were produced in CHO cells
464 and purified by affinity chromatography with peptide M. (Invivogen, Toulouse, France). The
465 dimeric dIgA1 (Nordic Mubio, Susteren, Netherland) were mAb taken from a patient myeloma
466 with a tested purity around 98%. The dimeric dIgA2 were mAb obtained from an IgA2
467 hybridoma (clone HF2) immortalized from plasma cells taken from the *lamina propria* of a
468 Crohn's disease patient (DDXK-HuBBB, Dendritics Lyon, france). Clone HF2 supernatant was
469 concentrated in 100K Amicon (Millipore, France), filtered in 0.22 μ m and purified by affinity
470 chromatography with peptide M agarose (InvivoGen). Secretory IgA (SIgA) were formed by

471 combining equimolar quantity of dimeric IgA and secretory component obtained after culture of
472 2H2 hybridoma (Crottet et al., 1999).

473 **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgA/receptors affinity**

474 96-well maxisorp plates (ThermoFisher) were coated O/N with either the CD89 or the CD369
475 receptors-Fc (R&D systems, Lille, France) or with IgA (for the CD209 and CD71 ELISA).
476 CD89 and CD369 concentrations began at 6×10^{-7} mol/L and serial dilutions were performed
477 at 1/3 whereas IgA concentration was stable at 6×10^{-8} mol/L in PBS. After 2 hours of
478 blocking (PBS, tween 0.05%, BSA 1%), the plates were washed three times with PBS
479 supplemented with Tween (0.05%). Either the IgA (6×10^{-8} mol/L) or the CD209 or CD71
480 (serial dilutions beginning at 4.8×10^{-8} mol/L) receptors-Fc were added and incubated during
481 2h. After three washes, plates were incubated either with an anti-human IgA HRP (Sigma-
482 Aldrich) or with an anti-human CD209 (Life technologies, Illkirch, France) or with an anti-
483 human CD71 antibody (Life technologies). After three washes, plates previously incubated
484 with the anti-human CD209 or CD71 were incubated with anti-rabbit IgG coupled to
485 horseradish peroxidase (HRP) (Cell signaling technology). Plates were eventually incubated
486 with TMB (Tebu-bio laboratories) after 4 last washes during 30min maximum and the
487 reaction was stopped with hydrochloric acid. The optical density (OD) was read at 450nm
488 (TECAN).

489 **Microscale Thermophoresis**

490 The recombinant receptors Fc α RI (Bio techne R&D systems, Lille, France), Dectin-1 (R&D
491 systems), DC-SIGN (R&D systems) and the human transferrin receptor CD71 (R&D systems)
492 all display a N-terminal histidine tag. Coupling of receptor (200nM) with the RED NT-647
493 (100nM) was performed using « Monolith NT™ His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA »
494 (NanoTemper technologies, München, Germany) following the manufacturer's protocol.
495 Labeled receptors at 25nM final were added separately to a range of human monomeric IgA1
496 or IgA2 (InvivoGen) 2-fold dilutions from 25 μ M to 0,3nM in PBS, Tween 0.05%, then
497 loaded in standard capillaries (NanoTemper) for MST measurement. The strength of
498 receptor/ligand interaction was measured from the diffusion of the labeled molecule in
499 function of ligand concentration when a temperature gradient was applied on the capillaries,
500 using a thermophoresis reader (Monolith NT.115, NanoTemper). K_D were calculated from the
501 titration curves using the MO.Affinity Analysis Software (NanoTemper).

502 **Monocyte derived dendritic cells (moDC) preparation**

503 Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from buffy coats of healthy
504 volunteers (EFS Auvergne-Rhône-Alpes) by density gradient centrifugation over a lymphocyte
505 separation medium (Eurobio; Abcys, Courtaboeuf France). Monocytes (CD14⁺) were positively
506 sorted from PBMC with magnetic beads according to manufacturer's instructions (Miltenyi
507 Biotec, Paris France). Differentiation of moDC was induced by culture of monocytes with
508 complete RPMI medium (RPMI 1640, 10% FBS, 1% penicilline/streptomycine) supplemented
509 with 100ng/mL of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)
510 (Miltenyi Biotec) and 50ng/mL of human interleukin (IL)-4 (Miltenyi Biotec) for 6 days with
511 addition of fresh medium at day 3. The monocyte differentiation into moDC (CD14⁻, CD11b⁺,
512 CD209⁺ and CD207⁻) was checked by flow cytometry.

513 **Human intestinal biopsies**

514 With the patient's agreement, ileum and colon biopsies were sampled. Samples were chopped
515 with a scalpel in a petri dish containing complete RPMI medium. After the mechanic
516 digestion, enzymatic digestion was performed with 10 U/mL of collagenase and 1/500 DNase
517 (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) for 20min at 37°C under agitation. Samples
518 were ground in Medicon (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) and 30µm filtered (BD
519 Biosciences) after 3 washes. Cells were centrifuged at 200g for 5min and resuspended into
520 hyper complete RPMI medium (RPMI 1640, 10% FBS, 1% penicilline/streptomycine, 2mM
521 L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 10mM Hepes, 1mM sodium pyruvate).

522 **moDC immunostaining for confocal microscopy**

523 LabTek® slides (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) were treated with 500µL of
524 Poly-L-lysine (Sigma) and incubated 1hr at 37°C. Slides were washed in PBS and dried 1-
525 2hrs under a safety cabinet. 1x10⁶ moDC/compartiment were seeded in complete RPMI
526 medium O/N at 37°C. After 2 gently washes with PBS, cells were incubated with 6µg of
527 antibodies in 200µL of complete RPMI at 37°C during 1hr. After 2 PBS washes, cells were
528 fixed 5min (PBS, 4% formaldehyde), washed again and non-specific sites were blocked (PBS,
529 BSA 1%) during 15min at RT. Cells were permeabilized (PBS, BSA 1%, Triton 0.1%) 2min
530 and washed 2 times with PBS. Primary Ab were added 1hr at 4°C : 5µg/mL of rabbit anti-
531 human CD71 (Thermofisher, Illkirch, France), 20µg/mL of rabbit anti-human CD209
532 (Thermofisher), 5µg/mL of rabbit anti-human CD369 (Thermofisher), rabbit anti-human
533 CD89 (1/500, Abcam, Paris, France), 5µg/mL of goat anti-human IgA Alexa 555 (Southern
534 Biotech, Birmingham, USA). Cells were washed 2 times with PBS and incubated 45min at

535 4°C with 5µg/mL of the secondary antibody goat anti-rabbit IgG Alexa 488 (Southern
536 Biotech). Cells were washed with PBS and the nucleus was stained 5-10 min with Draq5
537 (1/1000, Abcam). After 2 washes, cells were mounted between slide and slip cover with
538 vectashield (Vector laboratories) and eventually observed with the FLUOVIEW FV1200 laser
539 scanning confocal microscope at RT (Olympus IX83, Tokyo, Japan) and equipped with the
540 FV10-ASW4.1 imaging software (Olympus, Hamburg, Germany). The objective was an
541 Olympus UPlanSApo 60x/1.35 Oil ∞ /0.17/FN26.5. Image processing was performed with
542 ImageJ Software.

543 **moDC maturation**

544 moDC were cultured at 1×10^6 cells/mL in 24 wells plates in complete RPMI medium. A
545 treatment with 50µg/mL of polymyxin B (InvivoGen) was done except for comparison between
546 mIgA1 and mIgA2 (Fig. 2 and 3). Reagents were then added at indicated concentrations for
547 moDC stimulation during 24hrs: 500ng/mL of Lipopolysaccharides from E. coli (Sigma),
548 cytokines activator cocktail composed by 25ng/mL of human IL-1β (Miltenyi), 100ng/mL of
549 human IL-6 (Miltenyi) and 50ng/mL of human Tumor Necrosis Factor (TNF)-α (Miltenyi), the
550 various IgA at 12µg/mL.

551 **Expression profile by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction** 552 **(qRT-PCR)**

553 RNA from frozen pellets of $1-5 \times 10^5$ activated moDC were extracted thanks to a Quick-RNA
554 MicroPrep Kit (Zymo Research). Total RNA quantification was performed with a 2000c
555 nanodrop (Thermos scientific). RNA quality was assessed (Biorad, 700-7103) with the
556 Experion™ system (Biorad, Marnes-La-Coquette, France). Quantification of a RNA panel
557 described in **Suppl. Fig 4** was done with Qiagen kits for Human dendritic cells (330404,
558 330523, 330231) and the Applied Biosystems® 7500 system. qRT-PCR results were analysed
559 with the data Analysis Center of Qiagen following supplier instructions.

560 **Cytokine and chemokines titration**

561 The evaluation of multiple cytokines/chemokines was performed with a Luminex 100
562 instrument (Luminex, Austin, Tex) in combination with the personalized Bio-Plex human
563 cytokine panel composed by IL-12p40, IL-12p70, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IL-23 and
564 TGF-β, IFN-α and IFN-β for monomeric forms or IFN-γ, IL-16 for comparison between IgA
565 isoforms (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif). Dosages were performed as specified by
566 the manufacturer on pure supernatant of activated moDC previously frozen. Cytokine and

567 chemokine concentrations were determined with one measure for each condition. IL-16
568 secretion in supernatant was determined with an ELISA kit on supernatant in duplicate
569 following the specifications of the manufacturer (Abcam, Paris, France).

570 **Mixed lymphocyte reaction (MLR)**

571 Negative cells recovered after CD14 sorting of PBMC were cultured in complete RPMI
572 medium with 2,5ng/mL (50 UI/mL) of recombinant human IL-2 (rIL-2, R&D system). The
573 medium was changed every 3 days until the differentiation and activation of moDC. Before
574 incubation with moDC, cells were assessed to be mostly live T cells (CD3⁺CD8⁺ or
575 CD3⁺CD4⁺) by flow cytometry. In a 96-wells plate, 1x10⁵ activated moDC were cocultured
576 with 5x10⁵ allogenic T cells in complete RPMI medium supplemented with rIL-2. A positive
577 control was performed with T cell incubated without moDC in medium supplemented with
578 phytohemagglutinin (PHA) at 5µg/mL (Sigma Aldrich, L8754). Five days after T cell
579 stimulation, surface CD3, CD4, CD8 and CD25 staining were performed and cells were fixed
580 and permeabilized (BD). A Ki-67 BV 421 staining was performed in order to check the
581 proliferation of T cells.

582 ***In vitro* priming of antigen-specific CD8⁺ T-cell precursors**

583 Naïve precursors specific for the HLA-A2-restricted Melan-A epitope ELA (ELAGIGILTV;
584 Melan-A/MART-1 residues 26–35A27L) were primed *in vitro* using an accelerated dendritic
585 cell coculture protocol as previously published (Lissina et al., 2016). Briefly, thawed PBMCs
586 were resuspended in AIM medium, supplemented with FLT3L (50 ng/ml; R&D Systems),
587 and plated out at 2.5×10⁶ cells/well in a 48-well tissue culture plate. After 24 hours, the ELA-
588 20 peptide was added (1 µM) and the maturation of resident dendritic cells was induced using
589 a cocktail of cytokines including TNF (1000 U/mL), IL-1β (10 ng/mL), IL-7 (0.5 ng/mL) and
590 prostaglandin E2 (PGE2; 1 µM) (R&D Systems). Alternatively, maturation of DC was
591 induced using ssRNA40 (0.5 µg/mL; Invivogen) or 12µg of IgA isotypes and isoforms. On
592 day 2, fetal calf serum (FCS) was added to 10% by volume per well. Fresh RPMI-1640
593 (Gibco) enriched with 10% FCS was used to replace the medium every 3 days. ELA-specific
594 CD8⁺ T-cell frequency and phenotype were determined on day 10 by flow cytometry.

595 Directly conjugated mAbs were purchased from commercial sources as follows: 1) anti-CD8-
596 APC-Cy7, anti-CCR7-PE-Cy7, and anti-granzyme-B-V450 (BD Biosciences); 2) anti-
597 CD27-AlexaFluor 700 (BioLegend); 3) anti-CD45RA-PerCP Cy5.5, anti-T-bet-Alexa Fluor
598 647, Eomes PE-eFluor 610, anti-perforin-FITC (eBiosciences). The amine-reactive viability
599 dye Aqua (Life Technologies) was used to eliminate dead cells from the analysis. Intracellular

600 staining for T-bet and Eomes was performed using the Transcription Factor Buffer Set (BD
601 Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Intracellular staining for granzyme
602 B and perforin was compatible with this procedure. Staining with all other reagents was
603 conducted according to standard protocols. Data were acquired using an LSR Fortessa flow
604 cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software version 9.3.7 (Tree Star).

605 **Statistical analysis**

606 All statistical analyses were performed with InStat software (version 5.02; GraphPad Software,
607 La Jolla, Calif). The normality was tested for each data set with both Shapiro-Wilk and
608 Agostino-Pearson tests. When data could be modeled by a normal distribution, the following
609 tests were performed depending on the comparison: Student t-test (two means comparison),
610 one-way ANOVA (multiple mean comparison) with Bonferroni correction (comparison of all
611 pair of data sets) or Dunnet's correction (comparison to a control group). Alternatively, non-
612 parametric tests were performed: Mann-Whitney test (two means comparison), Kruskal-Wallis
613 (multiple mean comparison) with or without Dunn's correction (comparison of all pair of data
614 sets). In case of comparison of two independent variables, a two-way ANOVA test was done.
615 Results were represented as Mean \pm SEM. P values of less than 0.05(*), less than 0.01(**), and
616 less than 0.001(***) were considered significant. Statistically significant differences between
617 groups are emphasized by bars connecting the relevant columns. If not, the comparison was
618 automatically with the control group (NS).

619

620

621 **FIGURE LEGENDS**

mIgA1		mIgA2	
dIgA1	↑	CD1a ⁺	↑
SIgA1	↑	CD80	↑
dIgA1	↓	CD1a ⁻	↓
SIgA1	↓	CD80	↓
dIgA1	↑ (**)	CD1a ⁺	↑
SIgA1	↑ (**)	CD86	↑
dIgA1	↑ (*)	CD1a ⁻	↑
SIgA1	↑ (*)	CD86	↑
dIgA1	↑ (**)	CD1a ⁺	↑ (*)
SIgA1	↑ (**)	HLA-DR	↑
dIgA1	↑	CD1a ⁻	↑ (*)
SIgA1	↑	HLA-DR	↑ (**)
dIgA1	↑ (**)	CD1a ⁺	↑ (*)
SIgA1	↑ (***)	CD40	↑ (**)
dIgA1	↑ (***)	CD1a ⁻	↑
SIgA1	↑ (***)	CD40	↑

622 **Table 1. Effect of monomeric and dimeric IgA on the expression of moDC activation**
 623 **markers**

624 Relative modifications of moDC activation markers expression were obtained by comparing
 625 independently IgA1 (n=17 donors) and IgA2 (n=8 donors) isoforms effect to each other on
 626 moDC markers MFI by flow cytometry. Arrows represent the increase (up arrows) or
 627 decrease (down arrows) tendencies in relative markers expression on either CD1a⁺ or CD1a⁻
 628 cells 24hrs after stimulation with 12µg of IgA. Two-way ANOVA test was used to determine
 629 the significance of mean differences. MFI= Mean fluorescent Intensity.

630 **Figure 1. Different binding of IgA isotypes and isoforms to IgA receptors on moDC.**

631 (A, B) Confocal microscopy of IgA receptors on monocytes derived dendritic cells (moDC)
 632 upon treatment with 12µg of monomeric (mIgA), dimeric (dIgA) or secretory (SIgA) IgA1 or
 633 IgA2. From top to bottom: CD89, CD369, CD209 and CD71 were stained (green) on moDC
 634 after one hour of incubation with IgA. Colocalizations (yellow) between receptors and IgA
 635 (red) were evaluated on live cells stained for their nucleus with Draq 5 (blue) thanks to
 636 merged pictures. Pictures are representative of three independent experiments performed with
 637 three different donors. Magnification (x60) (C, D, E, F) ELISA assays were performed to

638 compare mIgA1 (continuous red line) and mIgA2 (continuous green line) with dIgA1 (dotted
639 red line) and dIgA2 (dotted green line) binding to CD89, CD369, CD209 and CD71 (from the
640 left to the right). Decreasing concentrations of receptors were used with a stable amount of
641 IgA with either a coating with receptors (C and D) or with IgA (E and F). A one site binding
642 site model was determined from one experiment performed in duplicate for each
643 receptors/IgA couples with GraphPad[®] software. (G) After 24hrs of incubation with the
644 different IgA isoforms and isotypes (data pooled), total moDC from 8 donors were separated
645 depending on the number of IgA-receptors expressed on their surface (CD89, CD209, CD369
646 and CD71) by flow cytometry. Proportion of IgA⁺ cells in each subset was then measured by
647 flow cytometry. A Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test was performed. (H,
648 I) IgA⁺ moDC from 8 donors incubated 24hrs with the different IgA were divided depending
649 their receptors expression profile observed by flow cytometry. (*) p≤0.05, (**) p≤0.01 and
650 (***) p≤0.001.

651 **Figure 2. Relation between receptors expression on moDC and IgA internalization.**

652 (A, B, C, D) Mean fluorescence intensity (MFI) was measured as a marker of CD71 (A),
653 CD89 (B), CD209 (C) and CD369 (D) expression on surface moDC by flow cytometry at
654 steady state. Normality and Mann-Whitney tests were used to compare the two means
655 obtained from 8 donors. (E) Percentages of human IgA⁺ and CD1a positive (CD1a⁺) or
656 negative (CD1a⁻) cells among live cells after 24hrs of incubation with the different IgA
657 determined by flow cytometry. (n=8). Two-way ANOVA was performed to compare the
658 multiple means. (F, G, H, I) MFI of CD89, CD369, CD209 and CD71 receptors on moDC
659 stimulated 24hrs with IgA1 and IgA2 isoforms were normalized relatively to non-stimulated
660 (NS) moDC staining by flow cytometry (illustrated by the line at 100%). Only the expression
661 of receptors displayed on CD1a⁺ or CD1a⁻ cells having endocytosed IgA (IgA⁺) were
662 displayed (n=8 donors). Relative expression means were compared with a two-way ANOVA.
663 (*) p≤0.05, (**) p≤0.01 and (***) p≤0.001.

664 **Figure 3. moDC activation by IgA1 and IgA2 isoforms**

665 (A) Relative modifications of moDC activation markers expression were obtained by
666 comparing LPS (500ng/mL) or mIgA (12µg/mL) stimulated moDC to non-stimulated (NS)
667 moDC MFI after 24hrs of stimulation (n=17 donors). Only the significantly modified markers
668 were represented in the pie charts after either one-way ANOVA with Dunnett's multiple
669 comparison test or Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test depending on results
670 of normality tests (Shapiro-Wilk and Agostino-Pearson). The increase/decrease of markers

671 expression between them was normalized (percentages displayed on pie chart). (B) The same
672 analysis was performed with either IgA1 (n=19 donors) or IgA2 (n=8 donors) isoforms
673 treatments compared to non-stimulated moDC. (C, D) Activation marker MFI obtained by
674 flow cytometry after moDC activation by either dIgA1 or dIgA2 treatments were normalized
675 relatively to MFI of non-stimulated moDC (illustrated by the line at 100%). Expressions were
676 compared with Student t tests and only the significant differences on CD1a⁺ (C) or CD1a⁺ (D)
677 cell surface were displayed (n=8). (*) p≤0.05, (**) p≤0.01 and (***) p≤0.001.

678 **Figure 4. Transcriptomic and cytokine profiles of moDC activated by the various IgA**
679 **isoforms and isotypes.**

680 (A) RNA expression of moDC stimulated with mIgA1, mIgA2 or LPS was compared to non-
681 stimulated moDC from 3 different volunteers. (B, C) moDC from 3 others donor were
682 stimulated with either IgA1 isoforms (B) or IgA2 isoforms (C) and RNA expression of moDC
683 stimulated with dIgA and sIgA was compared to moDC stimulated with mIgA. Analysis of
684 qRT-PCR results was performed with the help of the Qiagen Data Analysis Center in order to
685 determine the correspondence between Ct and genes fold-regulation. Genes displaying 2-folds
686 up or down-regulated expressions were considered as affected by moDC stimulation. (D, E)
687 Cytokine concentrations from stimulated or not moDC supernatants were determined in
688 monoplicate by Luminex or ELISA assays. Either one-way ANOVA with Dunnett's multiple
689 comparison test or Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test depending on results
690 of normality tests (Shapiro-Wilk and Agostino-Pearson) were performed for each
691 cytokines/chemokines. Cytokine profiles are shown as radar charts; each axis displays the
692 mean quantity (in pg/mL) of each cytokine/chemokine 24hrs after moDC stimulation from 14
693 different donors. The scale of each axis being different, the values of both minimum and
694 maximum were indicated into brackets [min: max]. (*) p≤0.05, (**) p≤0.01 and (***)
695 p≤0.001.

696 **Figure 5. Activation of cytotoxic CD8 T cells in the presence of mIgA1 or mIgA2.**

697 (A, B) Proportion of CD4⁺ (A) or CD8⁺ (B) CD25⁺ T cells in a mixed lymphocytes reaction
698 with moDC activated with mIgA1 or mIgA2 was determined by flow cytometry and
699 normalized relatively to proportion of CD4⁺/CD8⁺ CD25⁺ T cells incubated with non-
700 stimulated moDC (illustrated by the line at 100%). A Kruskal-Wallis with Dunn's multiple
701 comparison test was performed to compare mIgA treatment with no treatment (n=5 donors).
702 (C, D, E, F, G) Expression of CD8 (C), transcription factors (D, E) and cytotoxins in antigen
703 specific T cells (F, G) were determined by flow cytometry after *in vitro* priming in the

704 presence of mIgA1 or mIgA2. Data are normalized compared to non-stimulated conditions
705 (illustrated as 0%). We performed a one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison
706 test (n=9). (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$ and (***) $p \leq 0.001$.
707

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1: Analysis of IgA binding to receptors by in vitro imaging and microscale thermophoresis.

(a) Area containing two moDC after binding with IgA1 (1h) and stained for the human IgA (red) and for the Fc α RI (green). While a DC displayed a double staining, another cell (white dotted square) was stained for IgA but not for the Fc α RI (x60). This picture is representative of several experiments also performed with DC-SIGN, Dectin-1 and CD71. (b, c, d, e) Histidine-tagged receptors were coupled with a fluorochrome and the delay of fluorescence recovery after warming was measured after binding with several concentrations of monomeric IgA1 or IgA2. Measures at each ligand concentration are displayed as mean \pm SD of 3 different experiments. A one-site binding kinetic modeling was performed in order to calculate a K_D (mol/L). A too low signal was observed for the binding of mIgA2 to CD71, impeding its analysis.

Figure S2: IgA modified the expression of their receptors on the surface of CD1a⁻ and CD1a⁺ moDC.

(a) After 6 days of incubation with GM-CSF and IL-4, differentiation of monocytes into moDC was checked by flow cytometry with the upregulation of CD11b, DC-SIGN (CD209) and the loss CD14/CD207. (b) mDC1 and mDC2 have the same IgA-receptor expression profile on their surface at steady state when compared to isotype control in flow cytometry. (n=8 donors). (c, d) Expressions of CD71 and Fc α RI (CD89) were compared on mDC1 and mDC2. MFI=Mean fluorescent Intensity. (n=8 donors). (e, f, g, h) Expressions of IgA receptors were compared on mDC1 and mDC2 24hrs after stimulation with cytokine cocktail, monomeric IgA (mIgA)1 or 2, dimeric IgA(dIgA)1 or 2, secretory IgA(SIgA)1 or 2 by flow cytometry. MFI obtained for all the conditions were normalized relatively to the non-stimulated condition. (n=8 donors). (i) IgA⁺ moDC from 8 donors incubated 24hrs with the dIgA1/2 or SIgA1/2 were divided depending their receptors expression profile observed by flow cytometry. Two-way ANOVA tests were performed from the GraphPad software. (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$ and (***) $p \leq 0.001$.

Figure S3: Effect of IgA stimulation on DC.

(a, b, c) moDC (a, b) or DC from gut surgeries of Crohn's disease patients (c) were stimulated 24hrs with monomeric IgA (mIgA) (a, c) or with all the isotypes and isoforms (b). Expression of the CD86, HLA-DR, CD40 and CD80 activation markers was measured by flow cytometry and compared/normalized relatively to the non-stimulated (NS) condition (threshold at

100%). (a, n=17 donors) (b, n=17 donors for IgA1 and 8 for IgA2) (c, n=10 patients). Either one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test or Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test depending on results of normality tests (Shapiro-Wilk and Agostino-Pearson) were performed. (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$ and (***) $p \leq 0.001$.

Figure S4: Transcriptomic and cytokine profiles of IgA activated moDC.

(a, b, c) List of genes negatively (red) or positively (green) modified more than 2-fold or not compared to the non-stimulated moDC (a) or to mIgA-activated moDC (b, c). Measured were realized by qRT PCR thanks to RNA from moDC stimulated 24hrs with the various IgA. (n=3 donors) each table was realized from the same donors. (d) Supernatants of moDC activated 24hrs with the various IgA isotypes and isoforms were dosed for the presence of multiple cytokines thanks to a BioPlex kit for measurement and analysis. Only the cytokines showing a quantifiable concentration were represented in pg/mL. A Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test was performed. (n=8).

Figure S5: Activation of cytotoxic CD8 T cells in the presence of IgA1 or IgA2 isotypes and isoforms.

(a) Expression of CD8, transcription factors and cytotoxins in antigen specific T cells were determined by flow cytometry after *in vitro* priming in the presence of a cytokine activation cocktail, a TLR8 ligand, mIgA1 or mIgA2. These data show results obtained from one representative donor. (b) Expression of CD8, transcription factors and cytotoxins in antigen specific T cells were determined by flow cytometry after *in vitro* priming in the presence of polymyxin B together with a cytokine activation cocktail, a TLR8 ligand, mIgA1, dIgA1, mIgA2 or dIgA2 (12 μ g). These data was obtained from one donor.

REFERENCES

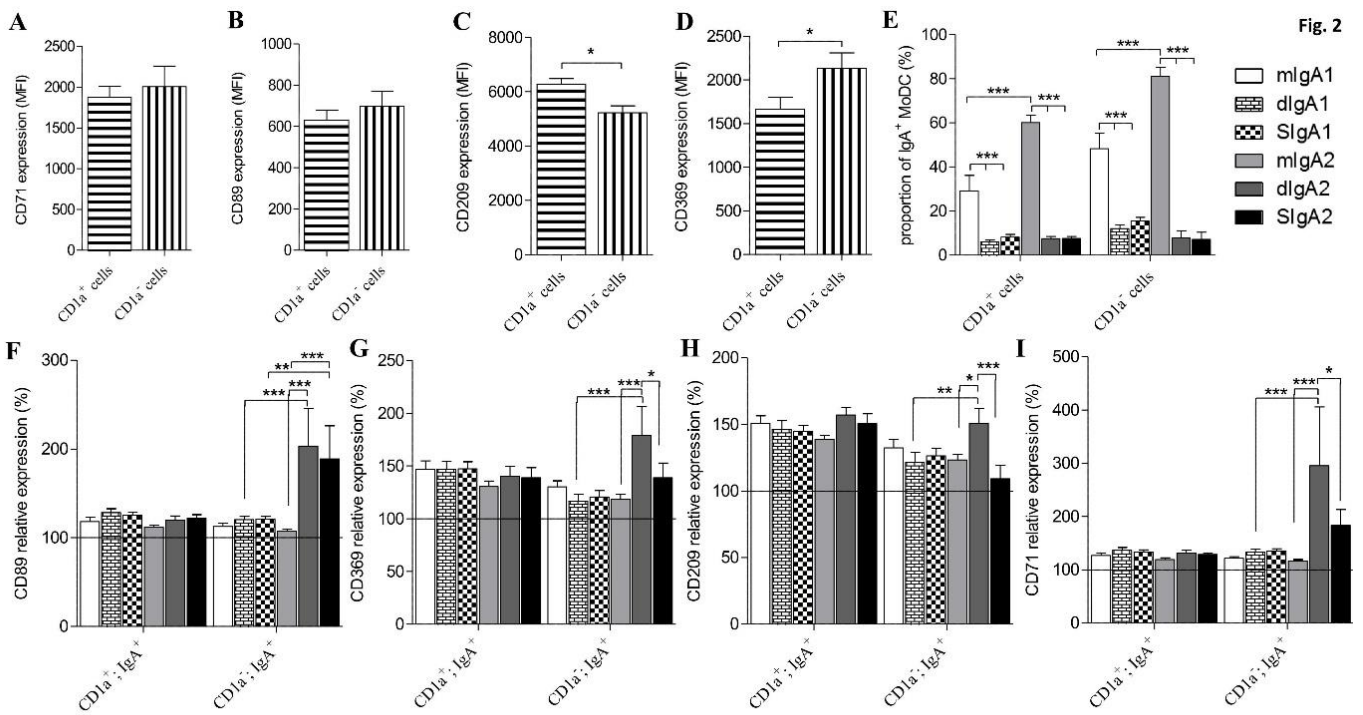
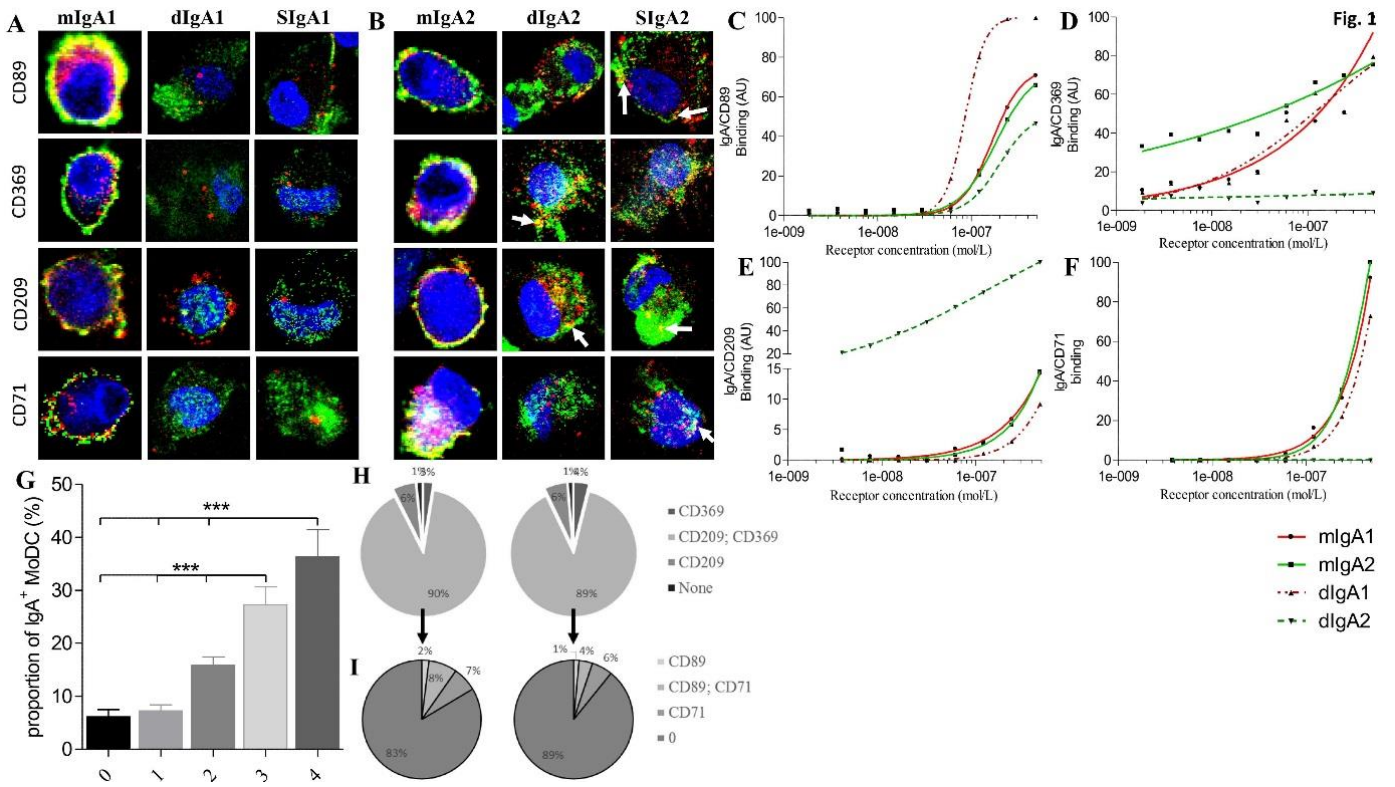
- Baumann, J., C.G. Park, and N.J. Mantis. 2010. Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: implications for immune surveillance in the intestine. *Immunol Lett* 131:59-66.
- Bennett, M.S., S. Trivedi, A.S. Iyer, J.S. Hale, and D.T. Leung. 2017. Human mucosal-associated invariant T (MAIT) cells possess capacity for B cell help. *J Leukoc Biol* 102:1261-1269.
- Brandtzaeg, P., and H. Prydz. 1984. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature* 311:71-73.
- Bunker, J.J., S.A. Erickson, T.M. Flynn, C. Henry, J.C. Koval, M. Meisel, B. Jabri, D.A. Antonopoulos, P.C. Wilson, and A. Bendelac. 2017. Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science* 358:

- Cernadas, M., J. Lu, G. Watts, and M.B. Brenner. 2009. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 155:523-533.
- Chang, C.C., A. Wright, and J. Punnonen. 2000. Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *J Immunol* 165:3584-3591.
- Cheroutre, H., F. Lambomez, and D. Mucida. 2011. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 11:445-456.
- Cooper, A.M., and S.A. Khader. 2007. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol* 28:33-38.
- Corthesy, B. 2010. Role of secretory immunoglobulin A and secretory component in the protection of mucosal surfaces. *Future Microbiol* 5:817-829.
- Crottet, P., and B. Corthesy. 1998. Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab')₂: a possible implication for mucosal defense. *J Immunol* 161:5445-5453.
- Crottet, P., S. Cottet, and B. Corthesy. 1999. Expression, purification and biochemical characterization of recombinant murine secretory component: a novel tool in mucosal immunology. *Biochem J* 341 (Pt 2):299-306.
- Cruikshank, W.W., H. Kornfeld, and D.M. Center. 2000. Interleukin-16. *J Leukoc Biol* 67:757-766.
- Diana, J., I.C. Moura, C. Vaugier, A. Gestin, E. Tissandie, L. Beaudoin, B. Corthesy, H. Hocini, A. Lehuen, and R.C. Monteiro. 2013. Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice. *J Immunol* 191:2335-2343.
- Fabiano, R.C., S.V. Pinheiro, and E.S.A.C. Simoes. 2016. Immunoglobulin A nephropathy: a pathophysiology view. *Inflamm Res* 65:757-770.
- Farache, J., I. Koren, I. Milo, I. Gurevich, K.W. Kim, E. Zigmond, G.C. Furtado, S.A. Lira, and G. Shakhbar. 2013. Luminal bacteria recruit CD103⁺ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity* 38:581-595.
- Geijtenbeek, T.B., D.J. Krooshoop, D.A. Bleijs, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C.G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000a. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1:353-357.
- Geijtenbeek, T.B., R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, G.J. Adema, Y. van Kooyk, and C.G. Figdor. 2000b. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585.
- Gillessen, S., D. Carvajal, P. Ling, F.J. Podlaski, D.L. Stremlo, P.C. Familletti, U. Gubler, D.H. Presky, A.S. Stern, and M.K. Gately. 1995. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 25:200-206.
- Gogolak, P., B. Rethi, I. Szatmari, A. Lanyi, B. Dezso, L. Nagy, and E. Rajnavolgyi. 2007. Differentiation of CD1a⁻ and CD1a⁺ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma. *Blood* 109:643-652.
- Hansen, I.S., L. Krabbendam, J.H. Bernink, F. Loayza-Puch, W. Hoepel, J.A. van Burgsteden, E.C. Kuijper, C.J. Buskens, W.A. Bemelman, S.A.J. Zaat, R. Agami, G. Vidarsson, G.R. van den Brink, E.C. de Jong, M.E. Wildenberg, D.L.P. Baeten, B. Everts, and J. den Dunnen. 2018. FcalphaRI co-stimulation converts human intestinal CD103(+) dendritic cells into pro-inflammatory cells through glycolytic reprogramming. *Nat Commun* 9:863.
- Heineke, M.H., L.P.E. van der Steen, R.M. Korthouwer, J.J. Hage, J.P.M. Langedijk, J.J. Benschop, J.E. Bakema, J.W. Slootstra, and M. van Egmond. 2017. Peptide mimetics

- of immunoglobulin A (IgA) and Fc α RI block IgA-induced human neutrophil activation and migration. *Eur J Immunol* 47:1835-1845.
- Heineke, M.H., and M. van Egmond. 2017. Immunoglobulin A: magic bullet or Trojan horse? *Eur J Clin Invest* 47:184-192.
- Heystek, H.C., C. Moulon, A.M. Woltman, P. Garonne, and C. van Kooten. 2002. Human immature dendritic cells efficiently bind and take up secretory IgA without the induction of maturation. *J Immunol* 168:102-107.
- Huang, J., A. Guerrero, E. Parker, J.S. Strum, J.T. Smilowitz, J.B. German, and C.B. Lebrilla. 2015. Site-specific glycosylation of secretory immunoglobulin A from human colostrum. *J Proteome Res* 14:1335-1349.
- Kassiotis, G., and G. Kollias. 2001. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193:427-434.
- Kerr, M.A. 1990. The structure and function of human IgA. *Biochem J* 271:285-296.
- Kett, K., P. Brandtzaeg, J. Radl, and J.J. Haaijman. 1986. Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues. *J Immunol* 136:3631-3635.
- Kubinak, J.L., and J.L. Round. 2016. Do antibodies select a healthy microbiota? *Nat Rev Immunol* 16:767-774.
- Le Bourhis, L., M. Dusseaux, A. Bohineust, S. Bessoles, E. Martin, V. Premel, M. Core, D. Sleurs, N.E. Serriari, E. Treiner, C. Hivroz, P. Sansonetti, M.L. Gougeon, C. Soudais, and O. Lantz. 2013. MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS Pathog* 9:e1003681.
- Lissina, A., O. Briceno, G. Afonso, M. Larsen, E. Gostick, D.A. Price, R. Mallone, and V. Appay. 2016. Priming of Qualitatively Superior Human Effector CD8⁺ T Cells Using TLR8 Ligand Combined with FLT3 Ligand. *J Immunol* 196:256-263.
- Lu, J., K.D. Marjon, L.L. Marnell, R. Wang, C. Mold, T.W. Du Clos, and P. Sun. 2011. Recognition and functional activation of the human IgA receptor (Fc α RI) by C-reactive protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4974-4979.
- Ludvigsson, J.F., M. Neovius, and L. Hammarstrom. 2014. Association between IgA deficiency & other autoimmune conditions: a population-based matched cohort study. *J Clin Immunol* 34:444-451.
- Lycke, N.Y., and M. Bemark. 2017. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. *Mucosal Immunol* 10:1361-1374.
- Macpherson, A.J., M.B. Geuking, and K.D. McCoy. 2012. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol* 33:160-167.
- Macpherson, A.J., B. Yilmaz, J.P. Limenitakis, and S.C. Ganai-Vonarburg. 2018. IgA Function in Relation to the Intestinal Microbiota. *Annu Rev Immunol*
- Milpied, P.J., and M.G. McHeyzer-Williams. 2013. High-affinity IgA needs TH17 cell functional plasticity. *Nat Immunol* 14:313-315.
- Mkaddem, S.B., I. Christou, E. Rossato, L. Berthelot, A. Lehuen, and R.C. Monteiro. 2014. IgA, IgA receptors, and their anti-inflammatory properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 382:221-235.
- Monteiro, R.C., and J.G. Van De Winkel. 2003. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 21:177-204.
- Moura, I.C., M.N. Centelles, M. Arcos-Fajardo, D.M. Malheiros, J.F. Collawn, M.D. Cooper, and R.C. Monteiro. 2001. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* 194:417-425.

- Niess, J.H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B.A. McCormick, J.M. Vyas, M. Boes, H.L. Ploegh, J.G. Fox, D.R. Littman, and H.C. Reinecker. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254-258.
- Pabst, O. 2012. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 12:821-832.
- Pasquier, B., P. Launay, Y. Kanamaru, I.C. Moura, S. Pfirsch, C. Ruffie, D. Henin, M. Benhamou, M. Pretolani, U. Blank, and R.C. Monteiro. 2005. Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of Fc γ ITAM. *Immunity* 22:31-42.
- Pasquier, B., Y. Lepelletier, C. Baude, O. Hermine, and R.C. Monteiro. 2004. Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells. *J Leukoc Biol* 76:1134-1141.
- Perrier, C., N. Sprenger, and B. Corthesy. 2006. Glycans on secretory component participate in innate protection against mucosal pathogens. *J Biol Chem* 281:14280-14287.
- Pfeifle, R., T. Rothe, N. Ipseiz, H.U. Scherer, S. Culemann, U. Harre, J.A. Ackermann, M. Seefried, A. Kleyer, S. Uderhardt, B. Haugg, A.J. Hueber, P. Daum, G.F. Heidkamp, C. Ge, S. Bohm, A. Lux, W. Schuh, I. Magorivska, K.S. Nandakumar, E. Lonnblom, C. Becker, D. Dudziak, M. Wuhler, Y. Rombouts, C.A. Koeleman, R. Toes, T.H. Winkler, R. Holmdahl, M. Herrmann, S. Bluml, F. Nimmerjahn, G. Schett, and G. Kronke. 2017. Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat Immunol* 18:104-113.
- Rochereau, N., D. Drocourt, E. Perouzel, V. Pavot, P. Redelinghuys, G.D. Brown, G. Tiraby, X. Roblin, B. Verrier, C. Genin, B. Corthesy, and S. Paul. 2013. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol* 11:e1001658.
- Rochereau, N., V. Pavot, B. Verrier, A. Ensinas, C. Genin, B. Corthesy, and S. Paul. 2015. Secretory IgA as a vaccine carrier for delivery of HIV antigen to M cells. *Eur J Immunol* 45:773-779.
- Rochereau, N., V. Pavot, B. Verrier, F. Jospin, A. Ensinas, C. Genin, B. Corthesy, and S. Paul. 2016. Delivery of antigen to nasal-associated lymphoid tissue microfold cells through secretory IgA targeting local dendritic cells confers protective immunity. *J Allergy Clin Immunol* 137:214-222 e212.
- Sadasivan, B., P.J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies, and P. Cresswell. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5:103-114.
- Saha, C., M. Das, V. Patil, E. Stephen-Victor, M. Sharma, S. Wymann, M. Jordi, C. Vonarburg, S.V. Kaveri, and J. Bayry. 2017. Monomeric Immunoglobulin A from Plasma Inhibits Human Th17 Responses In Vitro Independent of Fc α RI and DC-SIGN. *Front Immunol* 8:275.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813:878-888.
- Teng, M.W., E.P. Bowman, J.J. McElwee, M.J. Smyth, J.L. Casanova, A.M. Cooper, and D.J. Cua. 2015. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med* 21:719-729.
- Wehrli, M., F. Cortinas-Elizondo, R. Hlushchuk, F. Daudel, P.M. Villiger, S. Miescher, A.W. Zuercher, V. Djonov, H.U. Simon, and S. von Gunten. 2014. Human IgA Fc receptor Fc α RI (CD89) triggers different forms of neutrophil death depending on the inflammatory microenvironment. *J Immunol* 193:5649-5659.

- Woof, J.M., and M.A. Kerr. 2006. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* 208:270-282.
- Woof, J.M., and J. Mestecky. 2005. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 206:64-82.
- Zhou, M., and R.M. Ruprecht. 2014. Are anti-HIV IgAs good guys or bad guys? *Retrovirology* 11:109.



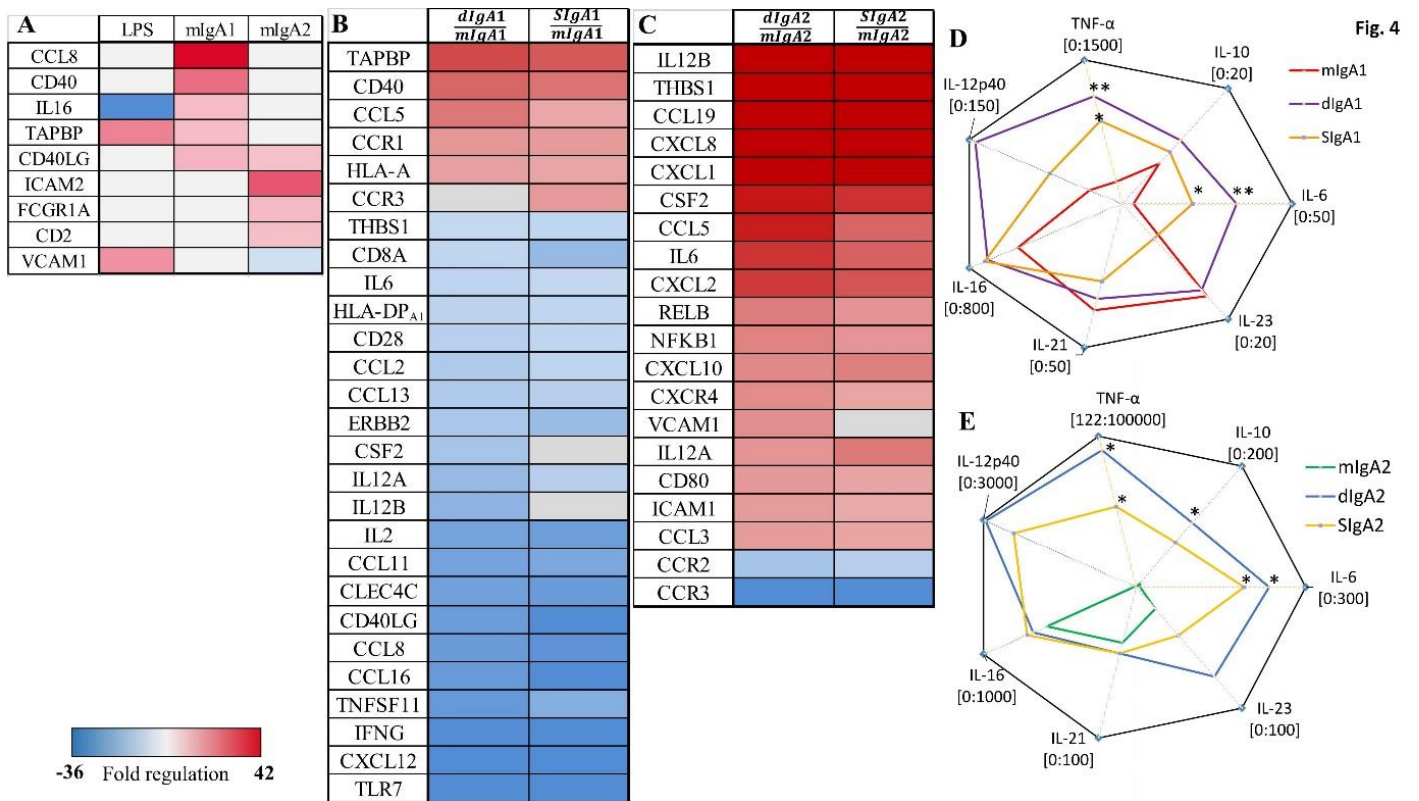
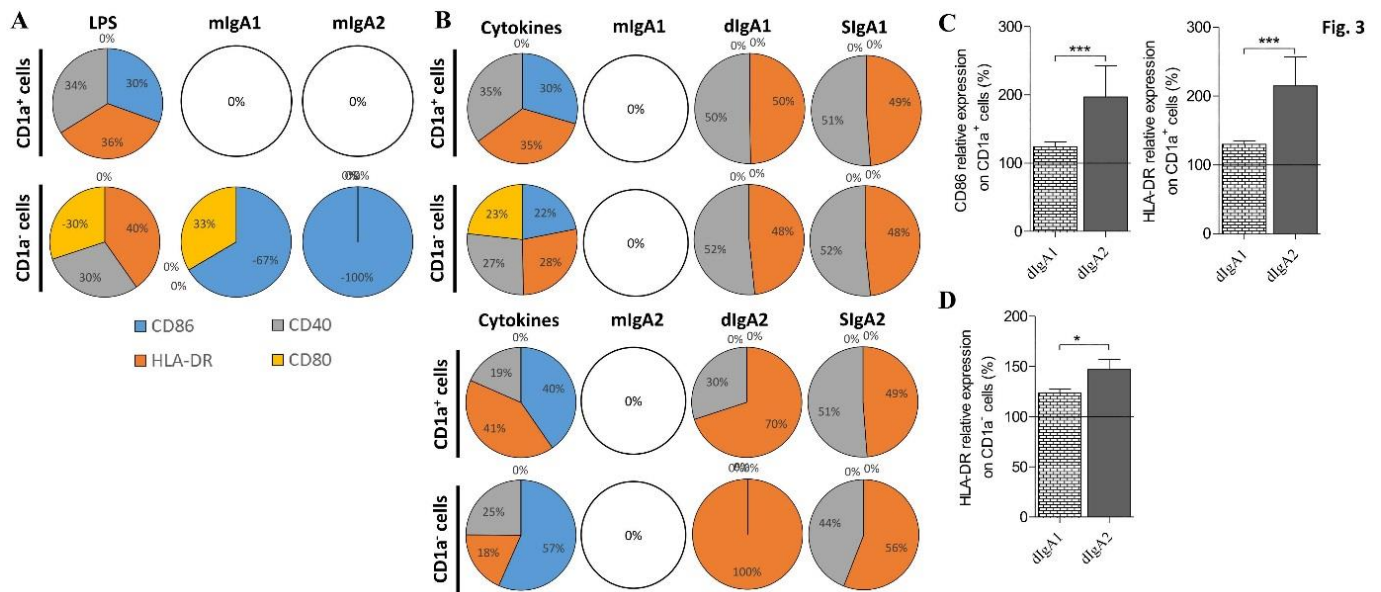
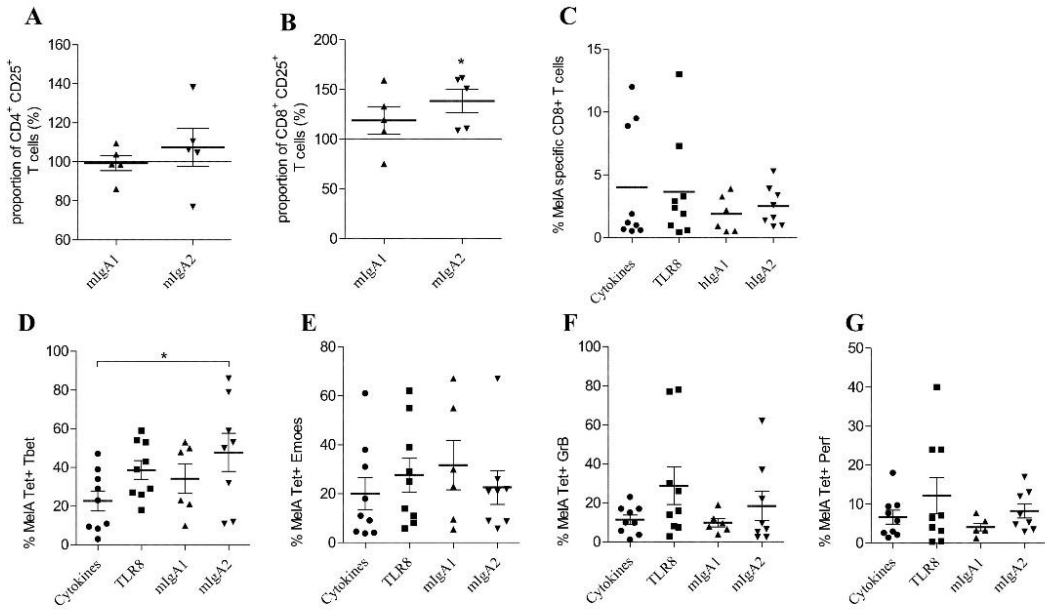
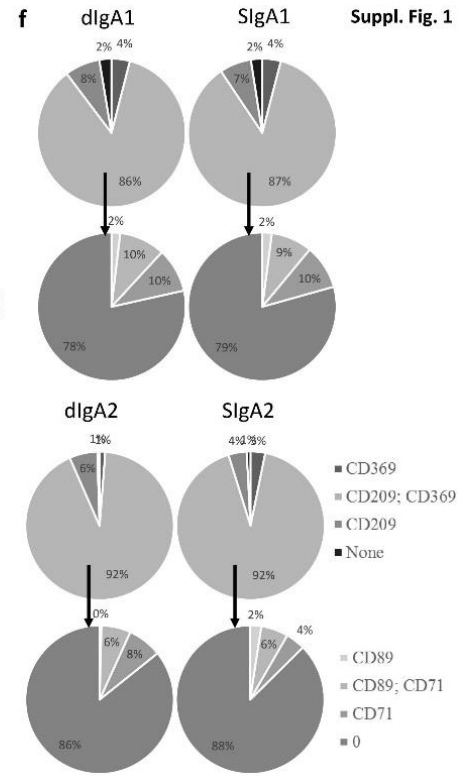
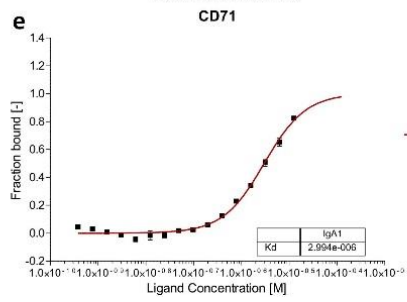
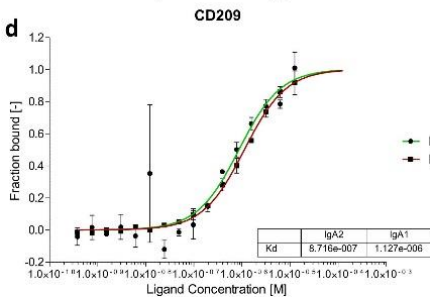
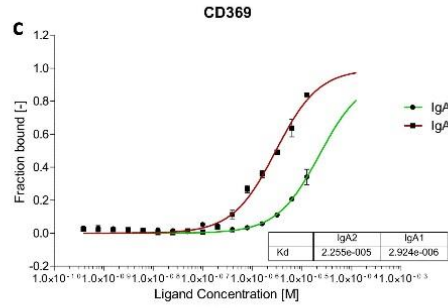
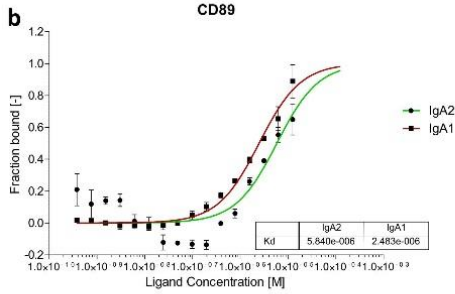
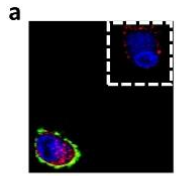
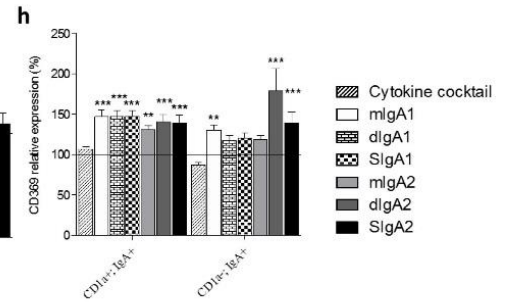
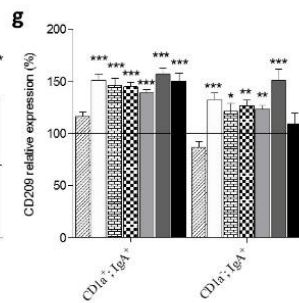
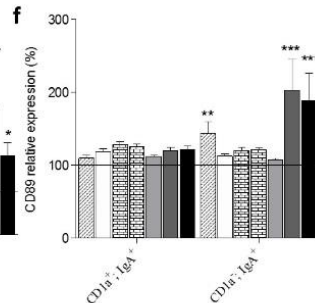
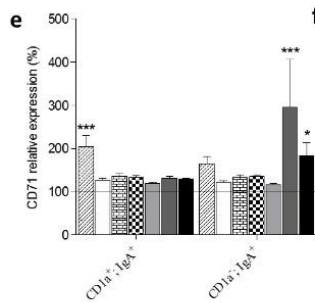
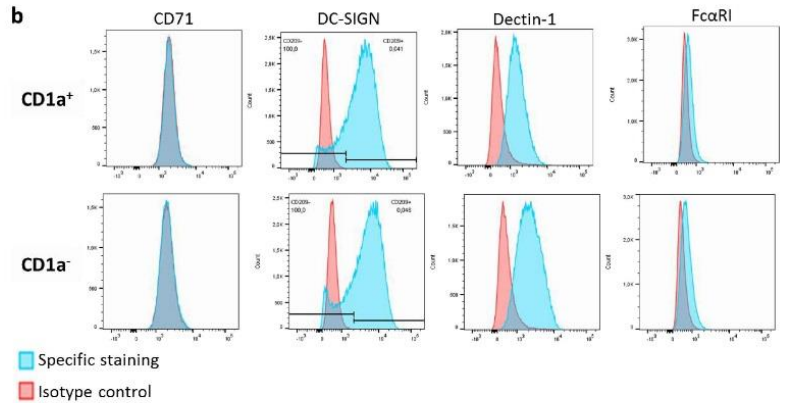
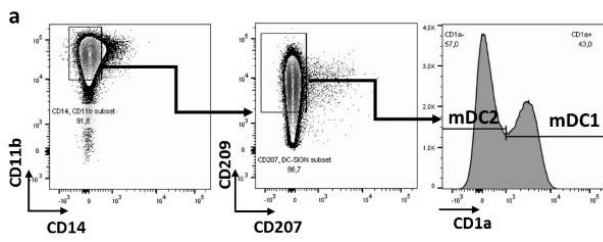


Fig. 5

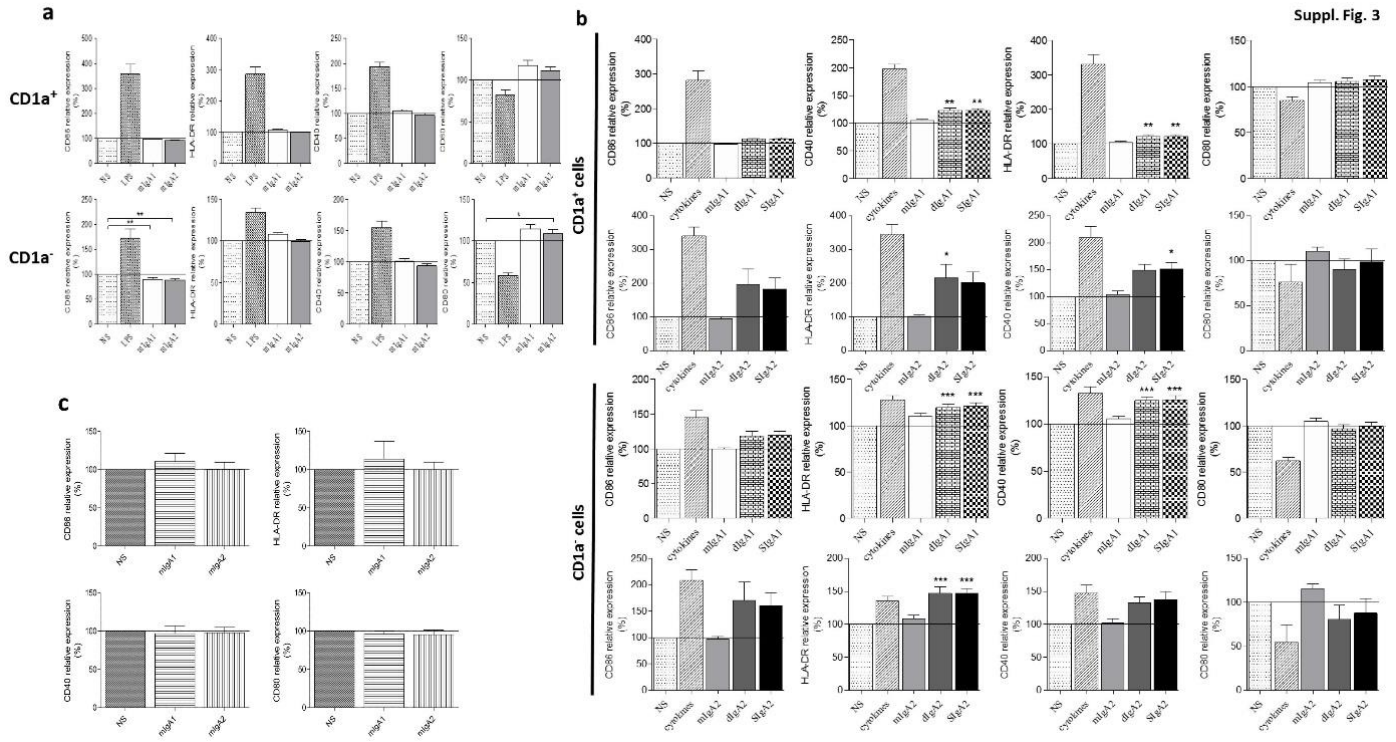




Suppl. Fig. 2

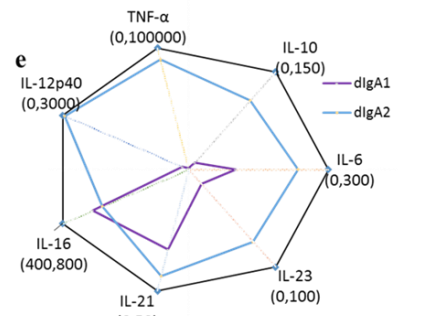
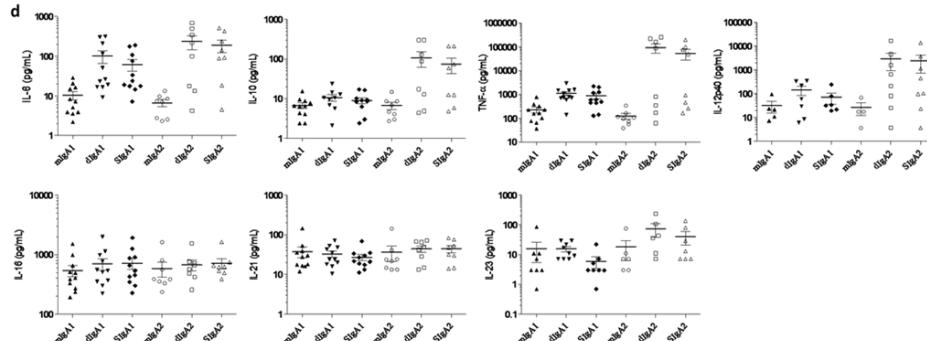


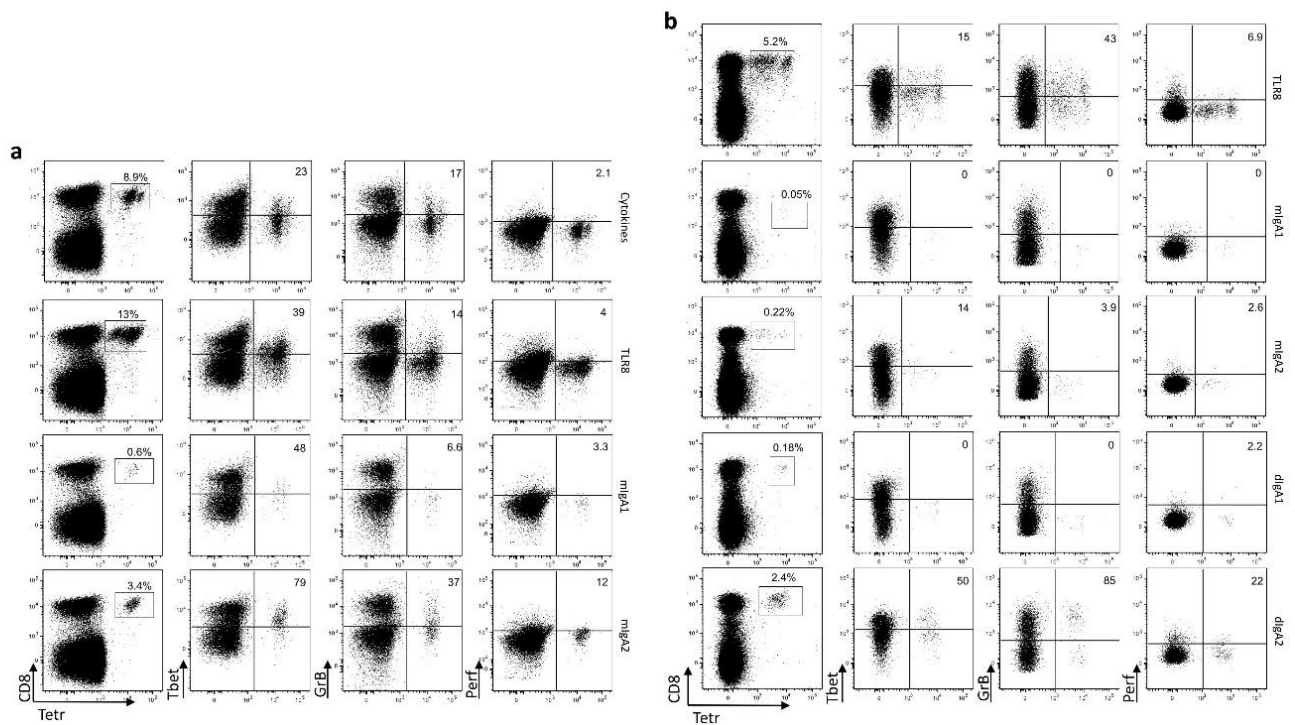
Suppl. Fig. 3



a				b				c							
	LPS	mlgA1	mlgA2		dlgA1	SlgA1			dlgA2	SlgA2					
CCL11	-1.2285	-1.0832	1.1317	CCL11	-4.7988	-4.5273	FCER1A	-1.5504	-1.5569	CCL11	1.1466	1.0401	FCER1A	-1.8017	-1.5837
CCL13	-5.1943	1.0055	1.1187	CCL13	-2.7882	-2.4714	FCER2	1.7339	1.6756	CCL13	-1.3098	-1.1199	FCER2	-1.7084	-1.7063
CCL16	1.261	1.2935	1.1317	CCL16	-5.2271	-6.242	FCGR1A	1.5845	1.1848	CCL16	-1.0913	1.0401	FCGR1A	-1.1777	-1.1173
CCL19	508.374	1.0314	-1.0954	CCL19	-1.1455	-1.1639	FLT3	-1.8502	-1.8346	CCL19	-15.8993	10.0097	FLT3	1.1492	1.0918
CCL2	-4.1037	-1.253	-1.8796	CCL2	-2.7436	-2.2439	FLT3LG	1.7851	-1.5569	CCL2	-1.325	-1.2924	FLT3LG	1.4214	1.0234
CCL3	3.596	1.0434	1.0584	CCL3	1.5845	1.3177	HLA-A	2.215	2.0965	CCL3	2.3468	2.1834	HLA-A	1.3232	1.1329
CCL5	1047.75	-1.3062	-1.6835	CCL5	3.1984	2.0534	HLA-DMA	-1.274	-1.2763	CCL5	5.3295	3.6217	HLA-DMA	-1.1324	-1.0842
CCL7	3.059	1.2935	-1.1419	CCL7	1.0923	1.0507	HLA-DPA1	-2.307	-2.1715	CCL7	1.4149	1.488	HLA-DPA1	1.0098	1.0257
CCL8	-1.2314	28.2068	1.1317	CCL8	-5.191	-5.867	HLA-DMB	1.5881	1.3673	CCL8	1.9779	1.5948	HLA-DMB	2.3322	2.0046
CCR1	-2.8887	1.7507	1.6723	CCR1	2.4634	2.2642	ICAM2	-1.7728	-1.8218	CCR1	-1.4668	-1.4506	ICAM2	-1.356	-1.4573
CCR2	-2.8224	1.9697	1.2874	CCR2	1.4479	1.9372	ICAM3	1.4479	1.9372	CCR2	-3.0582	-2.4794	ICAM3	1.4682	1.4044
CCR3	-1.7987	1.1055	1.3151	CCR3	1.0624	1.0629	IFNG	1.4337	1.0172	CCR3	-14.2149	-12.3805	IFNG	1.287	1.3503
CCR5	-1.6821	1.4859	1.6154	CD1A	1.3541	1.1931	IL10	6.8357	-1.0488	CD1A	-1.0762	-1.0234	IL10	1.4868	1.3074
CD1A	-8.2773	1.8678	1.6065	CD1B	1.347	1.1931	IL12A	1.3501	-1.0632	CD1B	1.105	1.2512	IL12A	2.5152	3.1675
CD1B	-97.2474	-1.0296	1.213	CD1C	1.1837	1.0415	IL12B	-42.9052	-1.0107	CD1C	1.2108	-1.1674	IL12B	42.3415	14.8597
CD1C	-114.319	1.0338	1.2657	CD1D	-1.2025	-1.3031	IL16	-1.4177	-1.0832	CD1D	-1.0814	1.4208	IL16	4.77	3.7321
CD1D	-2.195	-1.5178	-1.2353	CD1E	1.1953	1.3423	IL2	-1.4177	-1.0832	CD1E	1.1439	1.3472	IL2	-1.1039	1.0281
CD2	-1.2926	1.7711	2.0878	CD1F	1.554	-1.4797	IL6	10.1477	1.0267	CD2	1.1439	1.3472	IL6	4.77	3.7321
CD209	-19.0307	-1.0319	-1.0197	CD209	-1.1832	-1.3031	CXCL8	47.3868	-1.1111	CD209	-1.2478	-1.2283	CXCL8	1.1214	1.7536
CD28	-8.7155	1.4122	1.7075	CD28	-2.442	-2.1866	IRF7	16.8703	1.8506	CD28	-1.0822	1.1199	IRF7	1.3904	1.6825
CD4	-2.8552	1.8222	1.8455	CD4	1.4181	1.3299	IRF8	1.4877	-1.1111	CD4	1.0191	1.0116	IRF8	1.0948	1.1121
CD40	1.6776	4.6547	1.3741	CD40LG	3.6224	3.2746	ITGA1	1.2313	1.2559	CD40	1.75	1.7492	ITGA1	-1.5397	-1.3755
CD40LG	-1.5731	2.3916	2.0026	CD40LG	-5.1195	-7.3039	ITGB2	1.2374	1.1524	CD40LG	-1.1271	-1.0668	ITGB2	-2.769	-1.162
CD44	-1.0646	1.1392	-1.0435	CD44	1.4852	1.2757	LRP1	1.3479	1.2524	CD44	1.29	1.1434	LRP1	-1.9716	-1.6133
CD74	-1.8395	1.4587	1.4193	CD74	-1.3815	-1.2559	LYN	-1.0963	-1.1214	CD74	1.0949	1.0497	LYN	1.29	1.1594
CD80	8.1855	1.0196	1.1449	CD80	1.0673	-1.1772	MF	-1.7892	-1.7679	CD80	2.4016	2.1435	MF	-1.2535	-1.2555
CD86	2.9617	-1.1397	-1.3027	CD86	-1.356	-1.5497	NFKB1	1.6518	1.479	CD86	1.3324	1.181	NFKB1	2.983	2.514
CD8A	-1.8136	1.5171	1.9121	CD8A	-2.1876	-3.6604	PTPRC	-1.6579	-1.6193	CD8A	1.105	1.0767	PTPRC	-1.0979	-1.0497
CDK4	-1.4145	-1.0984	-1.0057	CDK4	-1.5433	-1.5004	RAC1	-1.4976	-1.4227	CDK4	-1.0396	-1.0305	RAC1	1.0797	1.0473
CDKN1A	2.6143	-1.1214	-1.0033	CDKN1A	1.4143	1.0009	RELA	-1.0938	-1.1663	CDKN1A	1.5376	1.4473	RELA	3.0539	2.6539
CEBPA	-6.2923	1.2728	1.1343	CEBPA	1.0772	1.0196	RELB	1.123	-1.0248	CEBPA	-1.274	-1.1975	RELB	1.0334	-1.0743
CLEC4C	-1.4177	-1.0832	1.1317	CLEC4C	-9.223	-5.9979	STAT3	1.0772	1.0196	CLEC4C	-1.0913	1.0401	STAT3	1.3362	1.162
CSF1R	-3.147	1.9999	1.4391	CSF1R	1.0502	-1.0014	TAP2	1.8201	1.659	CSF1R	-1.4006	-1.3851	TAP2	1.362	1.162
CSF2	1.8395	1.1004	1.371	CSF2	-3.0511	-1.5004	TAPBP	4.2594	3.8852	CSF2	5.5047	4.8568	TAPBP	1.4648	1.4044
CXCL1	13.8621	1.1157	-1.6075	CXCL1	1.5663	-1.2817	TGFB1	-1.0042	-1.0908	CXCL1	8.6578	7.078	TGFB1	-1.6827	-1.3629
CXCL10	123.904	-1.2075	-1.469	CXCL10	1.216	-1.0487	THBS1	-2.0505	-2.1317	CXCL10	2.7843	3.0314	THBS1	18.9922	10.3867
CXCL12	1.1512	-1.0832	1.1317	CXCL12	2.0991	1.0482	TLR1	1.0051	-1.0499	CXCL12	1.2989	1.7211	TLR1	-1.2391	-1.2864
CXCL2	4.9123	-1.1477	-1.5984	CXCL2	1.1413	1.452	TLR2	-1.0276	-1.013	CXCL2	4.6396	4.0371	TLR2	1.0334	-1.0743
CXCR1	-28.9118	-1.0343	-1.3087	CXCR1	1.5663	1.5066	TLR7	-10.0515	-6.3035	CXCR1	-1.8523	-1.817	TLR7	-1.03	-1.3535
CXCR4	4.0085	-1.1035	1.1422	CXCR4	1.1492	1.1524	TLR9	1.0999	-1.8515	CXCR4	2.727	2.1535	TLR9	-1.1832	-1.6974
ERBB2	-1.4145	1.2995	1.3304	ERBB2	-2.9133	-3.487	TNF	1.8199	1.8633	ERBB2	1.1024	1.2775	TNF	1.499	1.3629
FAS	3.8275	-1.0512	-1.241	FAS	-1.2221	-1.3001	TNFSF11	-5.3369	-4.2535	FAS	-1.0348	-1.181	TNFSF11	1.226	1.488
							VCAM1	1.3954	1.1551				VCAM1	2.6402	1.5894

Suppl. Fig. 4





CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La plus forte affinité des IgA1 pour le Fc α RI et des IgA2 pour DC-SIGN sera confirmée en thermophorèse avec des IgA dimériques et sécrétoires. Par ailleurs, la thermophorèse utilisant des ligands et récepteurs libres et la sensibilité de la technique de l'ELISA étant limitée, il serait nécessaire de renouveler les tests d'affinité avec une troisième technique telle que la SPR (surface plasmon resonance) sur un système Biacore. Une étude complète de l'expression des différents récepteurs aux IgA sur les populations de DC intestinales pourrait permettre de différencier des populations plus aptes à fixer les IgA1 que les IgA2 par exemple. Ces études ne sont pas aisées à réaliser car l'accès à de tels échantillons et à de telles cellules est limité, mais elles pourraient mettre en évidence une interaction IgA/récepteurs/cellules qui déterminerait le sort de la réponse immunitaire à l'image du Fc α RI qui induit une réponse inflammatoire en cas de fixation d'une IgA sérique complexée et tolérogène avec une IgA seule sur des modèles de cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) (327). Nous souhaiterions également refaire nos

expériences avec des IgA spécifiques d'antigènes de commensaux ou de pathogènes seuls ou sous forme de complexes immuns afin d'observer si les IgA ont un effet intrinsèque sur le système immunitaire. La relation entre l'interaction des IgA monoclonales couplées à leur antigène et les cellules immunitaires et les récepteurs exprimés par ces cellules pourrait aussi être étudiée afin de voir des profils phénotypiques plus ou moins propices à la captation des ces IgA.

Il faudrait par ailleurs tester d'autres IgA1 et IgA2 ayant la même spécificité afin de pouvoir généraliser l'impact des isoformes et isotypes d'IgA. Par exemple, nous pourrions utiliser des IgA1 et 2 dimériques de patients sans inflammation aigue du colon – comme c'est le cas pour les patients Crohn (328) – à partir de plasmocytes immortalisés au laboratoire. La SC pourrait être rajoutée et la chaîne J supprimée, même si aucune enzyme spécifique n'a été décrite à ce jour mise à part la subtilisine qui dégrade aussi les IgA (329). Les IgM sont produites sous forme sécrétoire dans les sécrétions muqueuses après transcytose (330) et peuvent activer la voie du complément (331). Il serait très intéressant de comparer leur effet par rapport aux IgA dans l'intestin.

Les neutrophiles sont particulièrement importants dans l'axe IgA/inflammation (150). Puisque nous avons observé l'activation de gènes codant pour des chémotactants des neutrophiles après stimulation avec des IgA2 dimériques, un autre axe de recherche serait d'analyser le recrutement et l'activation des neutrophiles *in vivo*. Nous pourrions peut-être mettre en évidence un effet spécifique des IgA2, et non des IgA1, sur les neutrophiles. Nous avons par ailleurs observé une activation à la fois de LT et du CD40 induites par les IgA. L'axe CD40/CD40L étant impliqué dans l'activation des lymphocytes B, nous pourrions tester cette hypothèse avec par exemple un test de fonctionnalité des lymphocytes B de type ELISPOT avec nos IgA. Enfin, afin de mieux caractériser la réponse humorale induite par la stimulation avec des IgA, les cytokines impliquées dans la commutation de classe des Ig telles que BAFF, APRIL (332-334) ou l'enzyme AID impliquée dans l'hypermutation somatique (335) pourraient être dosées. Le transcriptome des

cellules dendritiques ayant fixées des IgA de plus ou moins forte affinité pour leurs antigènes serait intéressante à étudier par PCR pour relier l'effet pro- ou anti-inflammatoire à la plus ou moins forte affinité des IgA. Comme précédemment, la comparaison avec les IgM pourrait apporter plus d'information sur ces molécules dont le rôle n'est pas complètement déterminé dans leur forme sécrétoire au niveau des muqueuses.

De nombreuses perspectives s'ouvrent à nous pour consolider et approfondir les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, afin de mieux comprendre la fonctionnalité des IgA dans les muqueuses.

*Chapitre VI : Étude d'une nouvelle stratégie vaccinale
contre Salmonella*

PREAMBULE

Au vu des propriétés particulièrement intéressantes des IgA et en particulier de leur capacité à traverser les muqueuses par l'intermédiaire des cellules M, ce mécanisme a été utilisé afin de coupler la protéine de capsid p24 du VIH sur une IgA sécrétoire murine et induire une réponse cellulaire et humorale muqueuse après vaccination chez la souris (172). Durant mon travail de thèse, nous avons souhaité évaluer cette stratégie vaccinale (172) contre l'entérobactérie *Salmonella*. Par ailleurs, les SIgM sont aussi présentes dans la lumière intestinale et possèdent cette capacité de transcytose inverse (article en cours de préparation). Nous avons voulu également tester cette nouvelle forme de vectorisation. Enfin, la création d'un vaccin protégeant contre plusieurs sérovars de *Salmonella* étant un objectif principal dans la recherche vaccinale, nous avons souhaité évaluer la capacité des anticorps sécrétoires SIgA et SIgM à délivrer plusieurs antigènes sous forme d'un vaccin multivalent. Une première étape de mon travail a donc consisté dans l'expression et la purification d'antigènes vaccinaux de *Salmonella*.

Expression et purification des antigènes SseB et OmpC

Les antigènes SseB et OmpC induisent une réponse humorale et cellulaire spécifique après immunisation par voie systémique chez la souris. Dans un premier temps, nous avons produit et purifié ces antigènes protéiques de *Salmonella* Typhimurium à partir de plasmides. Ces derniers ont été fournis par les Dr Corthésy et Kumar et les insertions ont été vérifiées par digestion enzymatique (**Figure 29A**). Afin de déterminer si les différentes protéines observées sur gel SDS PAGE après purification de l'OmpC étaient des oligomères d'OmpC ou d'autres protéines issues d'une purification non totale de l'antigène, l'échantillon de purification a été analysé en spectrométrie de masse par ionisation (LTQ Velos Thermo). La protéine OmpC est identifiée en

tête de liste avec une couverture de séquence de 72.5%. Cependant, l'échantillon n'est pas pur puisque beaucoup d'autres protéines de *S. Typhimurium* ont été identifiées (**Figure 29B**). Bien que la purification de SseB soit plus complète, une forte concentration d'endotoxines (>500EU/mL) a été mesurée, présageant aussi un fort taux dans l'OmpC. Afin d'éviter une activation biaisée des cellules, notamment lors des tests *in vitro*, nous avons détoxifié les antigènes. Bien que la quantité en endotoxines diminuait fortement, une perte de plus de 75% des antigènes a été observée lors du processus (**Figure 29C**), conduisant à l'utilisation de polymyxine B (PMB) pour la suite de notre étude pour inhiber la fixation des endotoxines aux récepteurs d'activation. Ainsi, nos protéines produites contiennent en grande majorité nos deux antigènes SseB et OmpC mais aussi d'autres protéines minoritaires ainsi que des endotoxines, autant d'éléments à prendre en compte lors des tests d'activation ou lors des phases de vaccination.

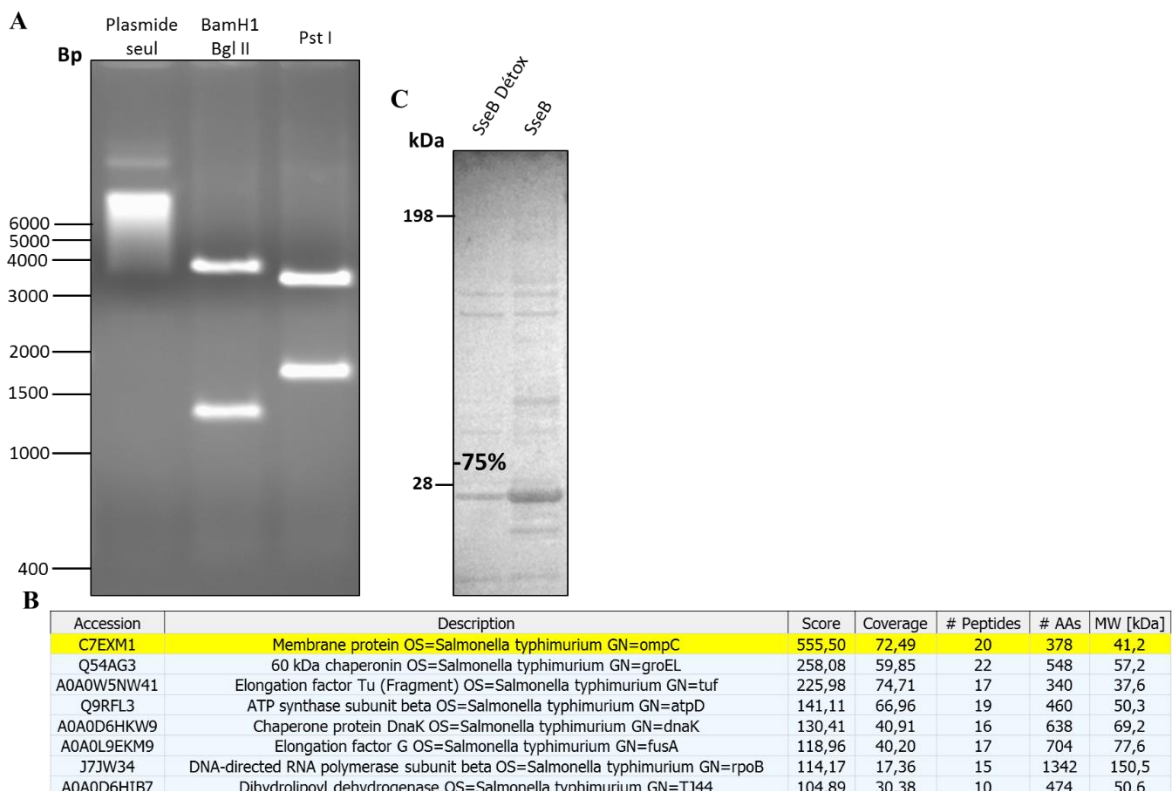


Figure 29: Purification des protéines SseB et OmpC.

(A) Le gène codant pour l'OmpC est inséré dans le plasmide pET-20b et son insertion est vérifiée par digestion soit avec les enzymes BamHI/Bgl II soit avec Pst I. La taille des fragments

attendus est de 1234 et 3618pb pour BamHI/Bgl II et 2594 et 2258 pb pour Pst I. (B) Analyse MS du produit de purification de l'OmpC. La comparaison avec la banque de données « uniprot-SalmonellaTyphimurium.fasta » (8541 entrées) a souligné 124 protéines potentiellement présentes dans l'échantillon. Seules les protéines avec un score >100 ont été montrées. (C) SDS PAGE montrant l'antigène SseB détoxifié de ses endotoxines (SseB Détox, gauche) et l'antigène SseB juste après sa purification (droite).

Mise en place du modèle infectieux à *Salmonella* chez la souris

Afin de vérifier l'effet protecteur d'un vaccin contre *Salmonella*, j'ai mis en place un modèle infectieux murin avec *S. Typhimurium* mimant l'effet de *S. Typhi* chez l'homme. Afin de déterminer la dose nécessaire pour reproduire les symptômes observés chez l'homme en cas de fièvre typhoïde, des souris ont été infectées par voie orale avec des concentrations allant de 1×10^5 Cfu (Colony-forming unit)/mL à 1×10^8 Cfu/mL de *Salmonella*. La survie des souris commençait à diminuer à partir de J6 mais l'injection de 1×10^4 et 1×10^5 Cfu induisait une mortalité de moins de 50% alors qu'aucune souris ne survivait après J9 avec une dose de 1×10^7 Cfu. (**Figure 30A**). 25% des souris survivait après une infection avec 1×10^6 Cfu de *S. Typhimurium*, indiquant une dose optimale pour l'étude d'une protection comprise entre 5×10^6 Cfu/mL et 1×10^7 Cfu/mL. Nous avons ensuite déterminé les phases d'infection de *Salmonella* en déterminant la charge bactérienne dans différents organes au cours du temps après infection. Une rapide infection des tissus intestinaux est apparue avec 5×10^4 Cfu dans les PP et deux fois plus de bactéries dans les MLN 5 jours post-infection. La voie systémique a aussi été rapidement touchée puisqu'au même jour, le foie (6×10^4 Cfu) et plus fortement la rate (4×10^5 Cfu) étaient infectés par *Salmonella*. Ces résultats indiquent une infection aussi bien muqueuse que systémique par *S. Typhimurium* chez la souris, récapitulant les effets de *S. Typhi* chez l'Homme (**Figure 30B**). Une forte diminution du nombre de *Salmonella* dans les différents organes est observée au 6^{ème} jour sauf dans les fèces et l'intestin où la quantité de *Salmonella* est doublée, indiquant une éventuelle réponse

immunitaire efficace contre la bactérie sauf dans son environnement de réplication. Enfin, une ré-augmentation de la quantité de *Salmonella* dans le foie (2 fois) et la rate (3 fois) combinée à la disparition de la bactérie dans les muqueuses indiquerait un échappement de *Salmonella* à la réponse systémique et donc à un envahissement fatal (**Figure 30B**).

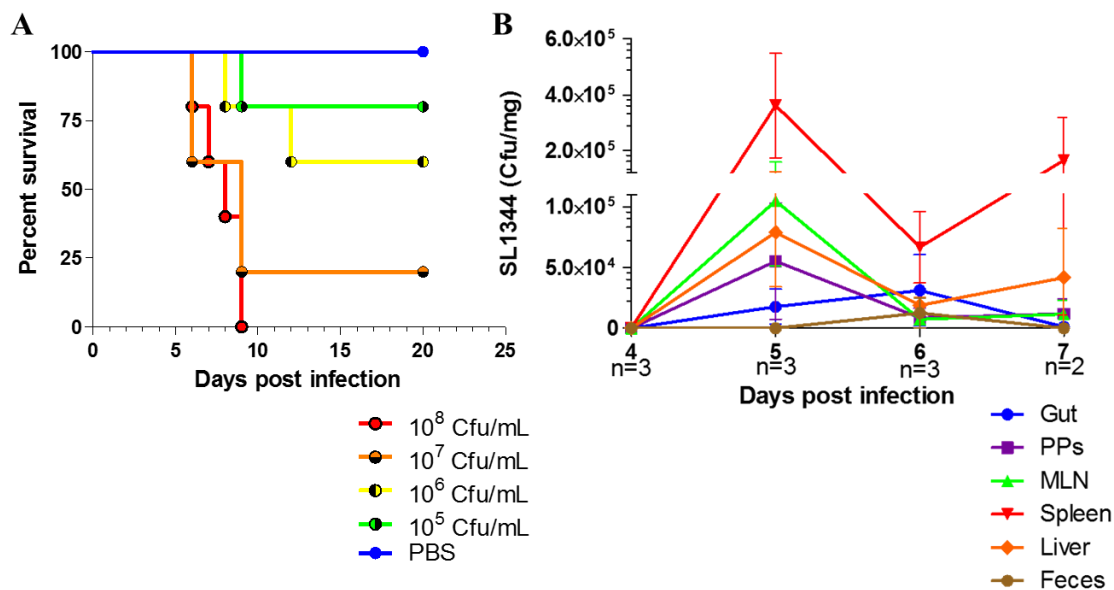


Figure 30: L'infection de souris par *S. Typhimurium* induit les mêmes effets que celle de l'Homme par *S. Typhi*.

(A) La survie des souris est analysée en fonction du temps en jours. CfU= colony-forming unit. n=6 (B) La charge bactérienne de la souche de *S. Typhimurium* SL1344 est déterminée dans les fèces, l'intestin (gut), les plaques de Peyer (PP), les ganglions mésentériques (MLN), la rate (Spleen) et le foie (Liver) en fonction du temps en jours (days) post-infection.

ARTICLE ET RESUME

Après la mise en place d'outils nécessaires à l'évaluation de notre approche, nous nous sommes replacés dans le contexte vaccinal muqueux contre *Salmonella* avec pour objectif de formuler un vaccin administré par voie orale ou nasale potentiellement multivalent utilisant des IgA ou des IgM comme vecteurs de délivrance des antigènes SseB et OmpC.

Nous avons pu montrer la liaison de 4 molécules d'antigène sur les régions Cα1 ou variables des chaînes lourdes d'une SIgA. Dans un second temps, nous avons confirmé le transport *in vitro* et *in vivo* des antigènes par les SIgM et plus efficacement par les SIgA vers le dôme sous épithélial des PP. Nous avons ensuite mis en évidence l'absence de réponse immunitaire et de protection suite à une immunisation orale avec SseB et OmpC indépendamment couplés à la SIgA, suggérant une trop faible immunogénicité *via* cette voie d'immunisation. Enfin, nous avons mis en évidence une solide réponse humorale et cellulaire contre les antigènes SseB et OmpC à la fois systémique et muqueuse après vaccination par voie intranasale avec les SIgA et SIgM comme vecteurs, et de manière plus efficace avec un vaccin multivalent.

The use of secretory Igs is a new mucosal strategy for a vaccine against *Salmonella*

Rémi GAYET¹, Gilles BIOLEY², Fabienne JOSPIN¹, Katell BATHANY³, Nicolas ROCHEREAU¹, Eva MICHAUD¹, Simhan KRISHNASWAMY⁴, Blandine CHANUT¹, Blaise CORTHESEY², Stéphane PAUL¹.

Affiliations:

¹ GIMAP/EA3064, Université de Lyon, CIC 1408 Vaccinology, F42023 Saint-Etienne, France;

² R&D Laboratory of the Division of Immunology and Allergy, CHUV, Centre des Laboratoires d'Épalinges, 1066 Epalinges, Switzerland

³ CBMN UMR5248, CNRS/Université de Bordeaux/INP, Centre de Génomique Fonctionnelle, 33076 Bordeaux, France

⁴ Department of Genetic Engineering, School of Biotechnology, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, India

* Corresponding author: Stéphane PAUL; stephane.paul@chu-st-etienne.fr
Faculté de médecine de St-Etienne, Laboratoire GIMAP
10 rue de la Marandière, 42270 St Priest-en-Jarez
Tel: +33 (0) 4 77 42 14 84; Fax: +33 (0) 4 77 42 14 86

Introduction

The enterobacteria genus *Salmonella* species *enterica* subspecies *enterica* comprises several serovars such as Typhimurium (*S. Typhimurium*), Enteritidis (*S. Enteritidis*), Typhi (*S. Typhi*), and Paratyphi A (*S. Paratyphi A*). These serovars are the main ones responsible for pathologies in humans. Indeed, 93 million of gastroenteritis cases and 150,000 deaths caused by *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* were reported as (336). In contrast, *S. Typhi* and *S. Paratyphi A* induce the systemic typhoid fever, which presents a 1% mortality rate, leading to 200,000 deaths (337). Appearance of multi-drug resistant (MDR) strains forced the international community to work on a prophylactic multivalent vaccine, particularly a mucosally delivered one, able to protect against the four major pathogenic serovars (274). However, several obstacles have to be overcome such as the divergence between *Salmonella* strains and unfriendly environment of the

mucosa for vaccine formulations. For example, while *S. Typhi* are human specific bacteria, *S. Typhimurium* infection in mice reproduce the human enteric fever symptoms.

The mucosal immune system comprises the gut-associated lymphoid tissue (GALT), the nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) and the genital-associated lymphoid tissue (GENALT). All these three compartments are distinct from the systemic compartment and constituted by specialized sites responsible for the induction of mucosal immune responses (30): Peyer's patches (PP) (338). The transit of bacteria and antigens (Ag) through microfold (M) cells in the follicular-associated epithelium (FAE) of PP triggers an immune response adapted to the encountered pathogen mostly *via* dendritic cells (DC) which subsequently stimulate T and B cells. The design of enteric vaccines requires to overcome some constrains such as to protect the Ag against gut conditions, to target the PP or to break mucosal compartmentation and immune tolerance. Thus, only a few mucosal vaccines, especially enteric, are licenced with both a low efficacy and poorly understood mechanisms (Czerkinsky, 2015, Vaccines against enteric infections) (Clemens, 2011, Evaluation of vaccines against enteric infections).

An efficient response against *Salmonella* is characterized by the induction of a T helper (Th)-1 response linked to the secretion of both cytokines such as interferon gamma (IFN- γ) and interleukin 17 (IL-17) by T cells (305, 310), and immunoglobulins (Igs) such as IgA and IgM by plasma cells (339, 340). In particular, secretory IgA (SIgA) are highly involved in protection of mucosal surfaces *due to* the following characteristics: (i) a high stability in the mucosal environment (341), (ii) a strong neutralization effect thanks to immune exclusion (130), and (iii) their ability to trigger immune responses by targeting pathogen-derived Ag through M cells and by performing reverse transcytosis in PP (11). In addition, the main known role of SIgM in mucosa is to induce a complement-dependent pathogens lysis (184).

Such features associated with SIgA led to the hypothesis that these molecules could be used as a vector to deliver Ag from mucosal pathogens such as HIV or *Salmonella* into PPs (11, 173). This

approach has been described as inducing a sustained mucosal humoral and cellular immune response against the Ag. In this context, we aimed to design a vaccine against *Salmonella* based on the use of SIgM and SIgA as vectorization platforms. SseB and the outer membrane protein C (OmpC) of *Salmonella* have been shown to induce secretion of IgA, IgM and a Th-1 response together with a protection against *Salmonella* when injected in mice through a systemic administration route (314, 323, 342). They therefore represent valuable vaccine Ags. In this study, we assess the immunogenic potential of these Ags coupled to SIgs separately but also combined in a multivalent vaccine delivered *via* mucosal routes.

Results

Dimeric IgA may carry up to four vaccine antigens.

As we aim to perform a multivalent vaccine, we wondered how many antigens could be complexed with SIgA. The 21kDa *Salmonella* SseB protein was coupled with a reagent allowing its covalent binding with SIgA *via* amide and thioester bonds, resulting in SIgA-SseB (**Fig. 1A**). In order to follow SIgA-SseB *in vivo*, we wondered whether SIgA could be bound with a cyanine 3 (Cy3) molecule. Although the size of SseB increased from 21 to around 30kDa due to the binding to Cy3, complexation with SIgA was still possible (**Fig. 1B**). We then determined the quantity and localization of antigens bound to SIgA by mass spectrometry. A treatment with papain led to IgA fragmentation into 50kDa Fc and Fab fragments (**Fig. 1C and Suppl 1S1**). We presumed dissociation between some light (LC) and heavy chains (HC), leading to a 28kDa fragments of variable HC (VHC) (**Fig. 1C**). Emergence of 71kDa fragments with dIgA coupled with SseB might suggest both a binding of two 21kDa antigens with one VHC and a binding of one SseB protein on a Fab fragment (**Fig. 1C and D**). Thus, our results indicated that SIgA were able to bind at least four antigens.

Transport of SIgA-based vaccine is more efficient than SIgM-based vaccine across the follicle associated epithelium.

We wondered whether IgA and IgM could transport various antigens to subepithelial dome (SED) of PP by specifically targeting M cells. We performed ligated loop experiments on mice intestinal segments containing a PP and injected mouse SIgA or SIgM coupled with either SseB or with OmpC antigens. No SseB-Cy3 or OmpC-Cy3 molecules coupled or not with SIg were observed in mouse villi (**Supplementary Figure 2**). In contrast, an increased number of fluorescent spots was observed in PP of mice injected with SIgA-SseB compared with SseB alone (**Fig. 2A**). The same result was noticed with the OmpC antigen (**Fig. 2B**), suggesting a specific and efficient crossing of IgA into PP whatever the antigen bound. Despite that a higher amount of SIgM-SseB-Cy3 was observed compared to SseB-Cy3, a lower number of fluorescent spots was present in PP compared to SIgA-SseB-Cy3 (**Fig. 2A**). The same results were obtained with OmpC (**Fig. 2B**), suggesting a better antigen transport with SIgA than with SIgM in the gut mucosa. We confirmed these results in an *in vitro* human model of follicle associated epithelium (FAE) by comparing FAE with or without M cells. We described an increase of M cells-specific SseB crossing from apical layer to basal area of 35% and 50% with SIgM-SseB and SIgA-SseB respectively compared to SseB alone (**Fig. 2C**). Likewise, no increase of OmpC transport through M cells was observed with SIgM-OmpC whereas a 40% increase was shown with SIgA-OmpC (**Fig. 2D**). Thus, we underscored the ability of IgM, but more importantly of IgA, to transport SseB and OmpC across M cells within the FAE into the SED of PP.

SIgA-SseB is poorly immunogenic in the gut when orally administrated.

Since SIgA-SseB was transported to SED in mice PP, we investigated whether this vaccine candidate could induce a protective immune response against *Salmonella* infection when orally administrated. We firstly assessed the activation of CD11c⁺ dendritic cells (DC) in mice PP 20 hours after stimulation with SIgA-SseB or SseB alone in presence of polymyxin B, avoiding

endotoxins activation biases. We noticed over-expressions of CD80, CD86, CD40 and I-A/I-E activation markers by respectively 10% (**Fig. 3A**), 20% (**Fig. 3B**), 40% (**Fig. 3C**) and 100% (**Fig. 3D**) on DC stimulated with SseB, suggesting an immunogenic effect of this antigen. In contrast, only a 25% down-regulation of the CD86 co-stimulatory molecule, with no changes for the other markers, was observed when DC from mice PP were stimulated with SIgA-SseB (**Fig. 3B**). We analyzed the immune response of mice after a scheme of immunization comprising three oral injections and one boost of the vaccine formulation comprising 10 μ g of SseB following by a challenge with *S. Typhimurium* SL1344 (**Fig. 3E**). Absence of SseB-specific serum IgG (**Fig. 3F**), genital IgA (**Fig. 3G**) or intestinal IgA (**Fig. 3H**) was observed in mice immunized either with SseB or SIgA-SseB. Survival of SIgA-SseB-immunized mice began to decrease at day 5 compared to day 9 for control group after infection with *Salmonella* and no mouse survived to infection after 9 days whereas more than 60% of non-treated mice were alive at this moment (**Fig. 3I**). In contrast, no difference in mice survival was observed between groups immunized with SseB and treated with PBS. Oral immunization of mice with SIgA-OmpC or with the cholera toxin (CT) as adjuvant did not induce humoral and cellular response (**Suppl Fig. S3**).

Our results pointed out an absence of immune response in mice orally immunized with SIgA-OmpC or with SIgA-SseB, correlated with a higher susceptibility to *Salmonella* infection for the SIgA-SseB formulation. This suggests a poor immunogenicity of Ag when coupled with SIgA may be due to the relatively low amount of Ag used which did not resist the deleterious environment of the gastrointestinal tract.

SIgA- and SIgM-coupled SseB and OmpC induce a high humoral systemic immune response after nasal vaccination.

Since the NALT presents similarities with the GALT, especially for the immune response induced in PP, we wondered whether our vaccine strategy could induce a systemic immune response after nasal immunization (**Fig. 4A**). Immunization of mice with SseB or OmpC without CT did not

induce humoral or cellular response compared to PBS injection. In contrast, addition of CT a 5- (Fig. 4B) to 7-fold (Fig. 4C) increase of antigen specific IgG. Compared to SseB/CT, immunization of mice with SIgA-SseB/CT increased the level of SseB-specific serum IgG by 29-fold (Fig. 4B) whereas SIgA-OmpC/CT did not modify the amount of OmpC- specific IgG. Immunization of mice with SIgM-SseB/CT or SIgM-OmpC/CT induced the same secretion of Ag-specific serum IgG and as SIgA-SseB/CT or SIgA-OmpC/CT respectively (Fig. 4)

SseB/CT administration displayed a 4-fold and 2-fold increase in CD8⁺ and CD4⁺ T cell proliferation respectively, whereas OmpC/CT induced a 1.4-fold increase of both subsets of T cells (Fig. 4D, E and Suppl. Fig. 4). In terms of cytokine production, OmpC/CT induced a 2-fold reduction of IFN- γ secretion by OmpC-specific T cells (Suppl. Fig. 4) whereas activation of SseB-specific T cells induced both 10-fold increase of IFN- γ and 100-fold increase of IL-17A production to reach approximately 1000pg/mL (Fig. 4F and Suppl. Fig 4). SIgA-SseB/CT immunization did not modify the proliferation and cytokine secretion of splenic T cells (Fig. 4F, D, H). In contrast, a 1.6-fold higher proliferation of CD8⁺ T cells was observed with SIgA-OmpC/CT (Fig. 4E). Nevertheless, a 300-fold decrease of IL-17A secretion by activated OmpC-specific cells from SIgA-OmpC/CT immunized mice was noticed (Fig. 4I). Coupling of Ag with SIgM did not modify Ag-specific T cell proliferation and cytokine secretion observed with the coupling of the different Ag with SIgA (Fig. 4). Thus, SIgA and SIgM induced the similar effect when used as vaccine vectors with CT *i.e* an increased of the humoral systemic response induced by SseB but a decrease of the OmpC-dependent cellular response.

Nasal delivery of antigens with secretory Igs increase significantly the mucosal humoral and cellular immune responses.

Although *Salmonella* may invade systemic compartment, their entry route is the gut mucosa. Hence we wondered whether nasal vaccination with our vaccine formulations could induce a mucosal immune response. Firstly, SseB/CT immunized mice presented an 8-fold increase of

SseB-specific IgG and IgA secretion in feces (**Fig. 5A, C and Suppl. 5S1**) whereas immunization with OmpC/CT did not increase the secretion of OmpC-specific IgG and IgA in the feces and vagina (**Fig. 5B, D and Suppl. 5S1**). compared to Ag alone. We only focused on conditions with CT later on. SIgA-SseB/CT decreased SseB-specific IgA secretion by 2 folds in feces and vagina compared to SseB/CT immunization (**Fig. 5A and C**). The same OmpC-specific IgG and IgA responses in feces and vagina of SIgA-OmpC/CT- as OmpC/CT-immunized mice was observed (**Fig. 5B, D and Suppl. Fig. 5**). SIgM-SseB/CT-immunized mice presented a 2-fold increase in SseB-specific IgA in feces compared to SIgA-SseB/CT-immunized mice (**Fig. 5A**).

SseB/CT induced a 2-fold proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in MLN (**Fig. 5E, G**) and an increase of their IFN- γ and IL-17A (**Fig. 5I and Suppl. Fig. 5**) secretion up to 6-fold compared to PBS-immunized mice. Despite no IFN- γ or IL-17A were secreted after restimulation of OmpC-specific T cells (**Fig. 5J and Suppl. Fig. 5**), a 7-fold increase of CD4⁺ T cells from OmpC/CT-immunized mice was observed compared to PBS-immunized mice (**Fig. 5F**). Although the same CD4⁺ T cells proliferation was observed (**Fig. 5E**), 2-fold and 1000-fold decreases of CD8⁺ T cell proliferation and IL-17A secretion respectively were measured after stimulation of SseB-specific T cells from SIgA-SseB/CT-immunized mice compared to SseB/CT-immunized mice (**Fig. 5G**). In contrast, a 1.5-fold stronger OmpC-specific CD4⁺ T cells proliferation and IL-17A secretion by these cells from SIgA-OmpC/CT- compared to OmpC/CT-immunized mice was displayed (**Fig. 5F and H**). In addition, restimulation of OmpC-specific T cells from SIgM-OmpC/CT-immunized mice decreased their secretion of IL-17A by 10 folds compared to T cells from SIgA-OmpC/CT-immunized mice (**Fig. 5J**). Thus, coupling SseB with SIgA conserved a potent humoral response but globally decreased the SseB immunogenicity in GALT, especially for the cellular response whereas SIgA optimized the OmpC cellular response in mucosa. Our results also indicated that SIgM is a better vector than SIgA for the humoral response induced by SseB but is worse for the cellular response induced by OmpC in the mucosa.

Multivalent vaccine with SIgA combines the advantages of all the antigens

We then wondered whether SIgA could be an efficient platform for vaccination with multiple antigens. Immunization of mice with SIgA-OmpC-SseB/CT induced the same production of SseB- or OmpC-specific serum IgG as the respective vaccines SIgA-SseB/CT or SIgA-OmpC/CT (**Fig. 6A**). In addition, similar increase of CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cell proliferation between either SIgA-SseB/CT or SIgA-OmpC/CT and SIgA-OmpC-SseB/CT immunizations was observed (**Fig. 6B**). Furthermore, SIgA-OmpC-SseB/CT induced a 100-fold increase of IL-17A secretion by SseB-specific T cells compared to SIgA-SseB/CT (**Fig. 6C**). Thus, the multivalent vaccine (MV) conserved or increased the systemic immunogenic effects of Ag already induced when separately coupled on SIgA.

Even if mice immunized with SIgA-OmpC-SseB/CT showed a 2-fold decrease of SseB-specific IgA in vaginal secretion compared to SIgA-SseB/CT immunized mice, they conserved a 2-fold increase of these specific IgA relatively to PBS-immunized mice (**Fig. 6D**). In contrast, a 1.4-fold increase of SseB-specific IgA in feces was observed with the SIgA-OmpC-SseB/CT compared to SIgA-SseB/CT (**Fig. 6E**). In addition, MV did not modify the secretion of OmpC-specific IgA in feces or vaginal secretion compared to SIgA-OmpC/CT immunized mice (**Fig. 6D, E**). SIgA-OmpC-SseB/CT induced a similar proliferation of SseB-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells from MLN as SIgA-SseB/CT (**Fig. 6F, G**). However, IL-17A and IFN- γ secretion by specific T cells were respectively 20-fold and 10-fold increase with the MV (**Fig. 6H and Suppl. Fig. 6**). SIgA-OmpC-SseB/CT immunization also induced a 2-fold increase of OmpC-specific CD4⁺ T cell proliferation but similar secretions of IL-17A and IFN- γ compared to the SIgA-OmpC/CT immunization (**Fig. 6F, H**). Our results indicated that multivalent vaccine conserved or optimized the mucosal immune response induced by the antigens coupled on SIgA.

Discussion

We have demonstrated the binding of four antigens on one secretory IgA (SIgA) near the Cα1 or variable regions of the heavy chain. In addition, SIgA and SIgM coupled with *Salmonella*-derived SseB or OmpC *Salmonella* proteins allowed the transport of these antigens into SED of PP. However, oral immunization with SIgA-SseB did not protect against a *Salmonella* infection whereas nasal immunization induced a robust systemic and mucosal humoral and cellular response. Besides, the systemic response was mainly based on humoral immunity whereas the mucosal response rather on both humoral and cellular immunity. We also underlined that multivalent vaccine containing both SseB and OmpC coupled to SIgA was similarly or even more immunogenic. Finally, we demonstrated a potential role of SIgM as a relevant vaccine vector like SIgA.

One question raised by our result is the poor immunogenic effect induced by SIgA-SseB with oral injection in contrast to the inflammatory response with nasal administration. The NALT and GALT PP structure was described as similar, but while the DC populations in GALT are relatively well known (4), DC from NALT are poorly studied. A focus on the SIgA-SseB uptake by DC in NALT compare to the GALT might explain our observation. Another explanation could be a tolerogenic effect of oral administration. To test this hypothesis, investigation of tolerogenic markers such as IL-10, TGF-β or regulatory T cells could be informative. Finally, some solutions could be found to overcome the poor immunogenicity observed with oral immunization or to enhance the effect of nasal administration. Thus, another adjuvant might be used such as the double-mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin (dmLT) which was described as a potent inducer of mucosal IgA, IgG and Th-17 immune response (343) (344). Another manner to improve the immune response would be to increase the vaccine concentration or to enhance the recognition of Ag by immune system for exemple by changing the binding process of Ag on SIgA/SIgM.

Even if our vaccine strategy offers numerous opportunities, the immune response triggered remains to be further explored. Besides, *Salmonella* protective immune response is generally characterized by a secretion of IFN- γ but also IL-12 and TNF- α which have not been assessed here (305, 345). Furthermore, cytotoxic functionality of CD8 T cells could be tested since these cells are involved in *Salmonella* protection (346). Finally, the immune exclusion effect of IgA secreted after immunization should be investigate regarding the importance of this feature in protection (131). This could allow to determine the potential mechanisms of protection mediated by the vaccine. Indeed, this latter could (i) impede *Salmonella* entrance or (ii) only slow down its dissemination, leaving the time for the induced adaptive immune system to eradicate the bacteria or (iii) directly induce an efficient response able to kill the bacteria in the mucosa or the systemic compartment.

SIgM are found in mucosal secretion at a reduced abundance as compared to SIgA but they can display similar functions such as opsonization of *Salmonella*, leading to a protection against infection in mice (347) or complement activation (184). We showed that in spite of a lower antigen transport efficiency than SIgA, SIgM increased the immunogenicity of SseB and OmpC when nasally administered. It might be interesting to compare IgM and IgA uptake in GALT and NALT to explain this difference. The higher immune response triggered with IgM could also be due to their function, mostly involving the classical complement pathway whereas IgA are only involved in alternative and lectin pathway (348) (349), suggesting to measure the immune cell recruitment through this mechanism.

Another advantage to use SIgM is the abundance of antigen binding sites. Indeed, SIgM are mostly found in a pentameric form in mucosa, providing potentially ten antigens binding sites compared to four with SIgA. This could explain the higher immune response observed with SIgM and counterbalance the reduced ability of SIgM to cross the FAE. We showed that combination of one antigen inducing a high humoral response such as SseB with another antigen such as

OmpC, which triggers a stronger cellular response when coupled on SIgA induced both types of immune responses. This is of great interest as these antigens are conserved between *Salmonella* serovars. However, the protection capacity of such vaccine formulation against several serovars such as *S. Enteritidis*, Typhimurium, Paratyphi remains to be assessed with appropriate animal models (274). The possibility to combine several antigens could also be a suitable strategy to use one antigen of each serovar. This process could be applied to other pathogens for which it is complicated to find an antigen inducing both humoral and cellular responses and being conserved between strains.

In addition, our vaccination strategy showed an enteric mucosal response in spite of a nasal administration. It would be interesting to test this vaccine strategy with other enteric pathogens such as *Shigella flexneri*, which behave similarly to *Salmonella* in the gut (350, 351). In addition, we could imagine an induction of immune response in respiratory tract, potentially protective against airway pathogens. Finally, a systemic response was identified, suggesting that our method might be efficient against pathogens *Salmonella* that invade the systemic compartment. Thus, using SIgA or SIgM as vaccine vectors could be a way to overcome some limitations imposed by the various route of administration. In this context, it could be informative to compare our delivery system to some others used in mucosal vaccination such as lipid or protein nanoparticles (274). Besides, SseB immunogenicity was already tested complexed in lipid microbubbles and nasally administrated in mice (352). The amplitude of specific IgA, IgG and T cell responses obtained should be compared to with SIgA/SIgM vectors.

Figure legends

Figure 1: Chemical binding of antigens to IgA.

(A) amino-dependent binding was assessed on a 4-12% SDS PAGE gel. 1:SseB, 2:SIgAC5, 3:SIgAC5 bound to SseB, 4:SseB bound to SIgAC5. (B) Fixation of SseB coupled with the cyanin

3 via a carboxyl-dependent bond to SIgAC5 was checked with a Western Blot against Cy3 molecule, 5:SseB-Cy3, 6:SIgAC5-SseB-Cy3. (C) Comparison of mass spectrometry spectra of dimeric IgAC5 (dIgAC5, on the top) and dIgAC5 coupled with SseB (on the bottom) after a papain digestion. Lc: Light chain, Jc: J-chain, Hc: Heavy chain, Fab/Fc: fragment Fab or fragment Fc. (D) Proposition of a binding model for the antigen with IgA. Ag: antigen according to the results of (C).

Figure 2: SIgA and SIgM are able to transport antigens from intestinal lumen to the basal surface of epithelium.

(A, B) Anesthetized mice were injected with Cy3-bound antigens coupled or not with an Ig vector in a ligated loop performed at the level of a Peyer's patch. Yellow spots represent fluorescent Ag in the tissue. FAE: follicle-associated epithelium, SED: Sub epithelial dome. Pictures are representative of experiments performed in duplicate and on at least 2 mice for each condition. (C, D) Mono- and co-cultures of Caco-2 cells with or without Raji cells (presence of M cells or not, respectively) were incubated for 90 min at 37°C with SseB-Cy3 (C) or OmpC-Cy3 (D) associated or not with SIgAC5 or SIgM (n=2). The transport of Cy3-labeled antigens in the basolateral area was evaluated by an ELISA (anti-Cy3 detection) after a treatment of samples with SDS and a dialysis step.

Figure 3: Oral immunization of mice with SIgA-SseB showed characteristics of a poor immunogenic response against SseB.

(A, B, C, D) Expression of activation markers on dendritic cells (DC) (CD11c⁺) was analysis by flow cytometry after a 24hrs stimulation with SseB coupled or not with SIgAC5 or with CpG. The Mean Fluorescent Intensities (MFI) were normalized relatively to the non-stimulated DC in order to avoid the inter-individuals heterogeneity (n=6). (E) Oral immunization scheme of mice with PBS, SseB or SIgAC5-SseB and then challenged with *S. Typhimurium* (Salmo) or not (PBS). (n=6 per group). (F, G, H) Seric humoral SseB-specific IgG (F) and mucosal humoral

SseB-specific IgA (G: feces, H: vagina washing) responses were assessed by ELISA assay two weeks after the boost. (I) Survival of mice was recorded after oral immunization and challenge with *S. Typhimurium*.

Figure 4: Nasal immunization of mice with different antigens bound to various vectors induced a high humoral systemic response against these antigens.

(A) Nasal immunization scheme of mice with SseB or OmpC, bound or not to SIgAC5 or SIgMHF5 and with or without adjuvant. CT= Cholera toxin (n=5 per group). (B, C) SseB- (B) or OmpC-specific IgG (C) from serum of immunized mice were quantified by ELISA assay and compared to the level of antigen-specific IgG from PBS-immunized mice. (**) $p \leq 0.01$. (D, E, F, G) T cells from spleen of immunized mice were re-activated *in vitro* by either SseB (D, F) or OmpC (E, G). Proliferation of CD4⁺ (D, E) or CD8⁺ (F, G) T cells was assessed 4 days post activation by flow cytometry with a ki-67 intracellular staining. The proportion of ki-67 positive cells was activated by Ag was normalized relatively to the proportion of ki-67 positive T cells re-activated with PBS. (H, I) IL-17A secretion by splenic T cells re-activated with either SseB (H) or OmpC (I) was measured by ELISA assay and secretion of PBS-activated T cells was subtracted (Δ concentration).

Figure 5: Nasal immunization of mice with different antigens bound to SIgA or SIgM induced a high cellular mucosal response against these antigens.

(A, B, C, D) SseB- (A, C) or OmpC-specific (C, D) IgA from feces (A, B) or vaginal secretion (C, D) of mice immunized with different Ag formulations were quantified by ELISA assay and compared to the rate of antigen-specific IgA from PBS-immunized mice. (*) $p \leq 0.05$. (E, F, G, H) CD4⁺ (E, F) or CD8⁺ (G, H) T cells from mesenteric lymph node (MLN) of immunized mice were re-activated by either SseB (E, G) or OmpC (F, H). Proliferation of T cells was assessed 4 days post activation by flow cytometry with a ki-67 intracellular staining. The proportion of ki-67 positive cells was activated by Ag was normalized relatively to the proportion of ki-67 positive

T cells re-activated with PBS. (I, J) IL-17A secretion by T cells from MLN re-activated with either SseB (I) or OmpC (J) was measured by ELISA assay and secretion of PBS-activated T cells was subtracted (Δ concentration). CT= Cholera toxin (n=5 mice per group).

Figure 6: Multivalent vaccine conserved or optimized the humoral and cellular response induced in systemic and mucosal compartments compared to monovalent ones.

(A) The levels of SseB- or OmpC-specific IgG from serum of mice immunized with SIgA-SseB/CT or SIgA-OmpC/CT was compared with SIgA-SseB-OmpC/CT immunized mice by ELISA. (B) SseB- or OmpC-specific CD4⁺ T cells from spleen of SIgA-SseB/CT, SIgA-OmpC/CT or SIgA-SseB-OmpC/CT-immunized mice were re-activated by either SseB or OmpC. Proliferation of T cells was assessed 4 days post activation by flow cytometry with a ki-67 intracellular staining. MFI (Mean fluorescent intensities) were normalized relatively to ki-67 expression of T cells re-activated with PBS. (C) IL-17A secretion by T cells from spleen re-activated with either SseB or OmpC was measured by ELISA assay and secretion of PBS-activated T cells was subtracted (Δ concentration). (D, E) The levels of SseB- or OmpC-specific IgA from feces or vaginal secretion of mice immunized with SIgA-SseB/CT or SIgA-OmpC/CT was compared with SIgA-SseB-OmpC/CT as in (A). (F, G) Proliferation of SseB- or OmpC-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells from MLN of SIgA-SseB/CT, SIgA-OmpC/CT or SIgA-SseB-OmpC/CT-immunized mice was measured as in (B). (*) $p \leq 0.05$. (H) IL-17A secretion by SseB- or OmpC-specific T cells from MLN was measured as described in (C). CT= Cholera toxin (n=5 mice per group).

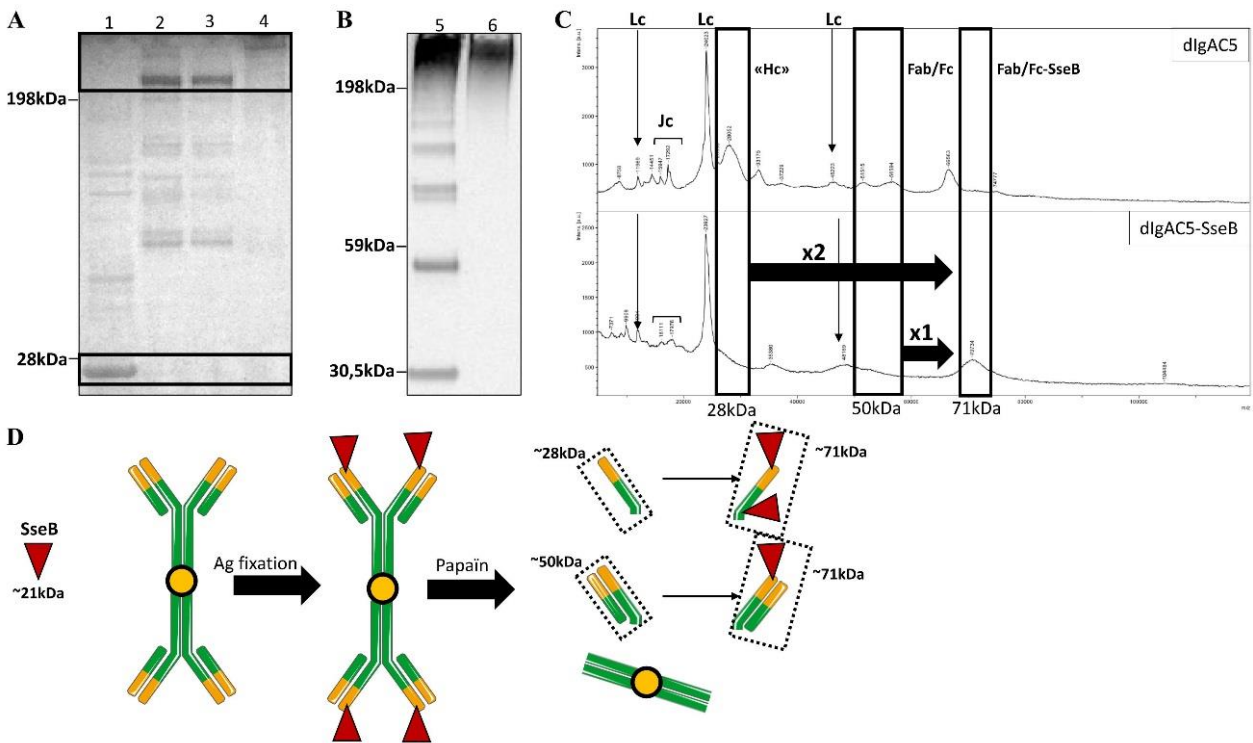


Fig. 1

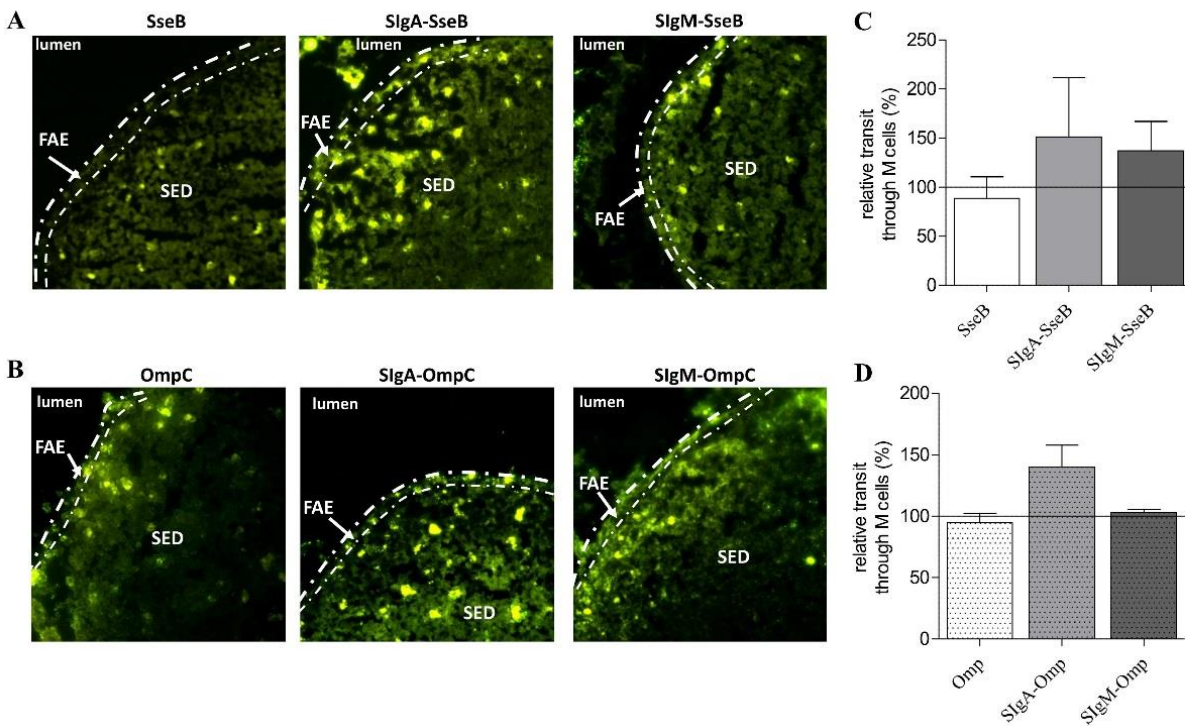


Fig. 2

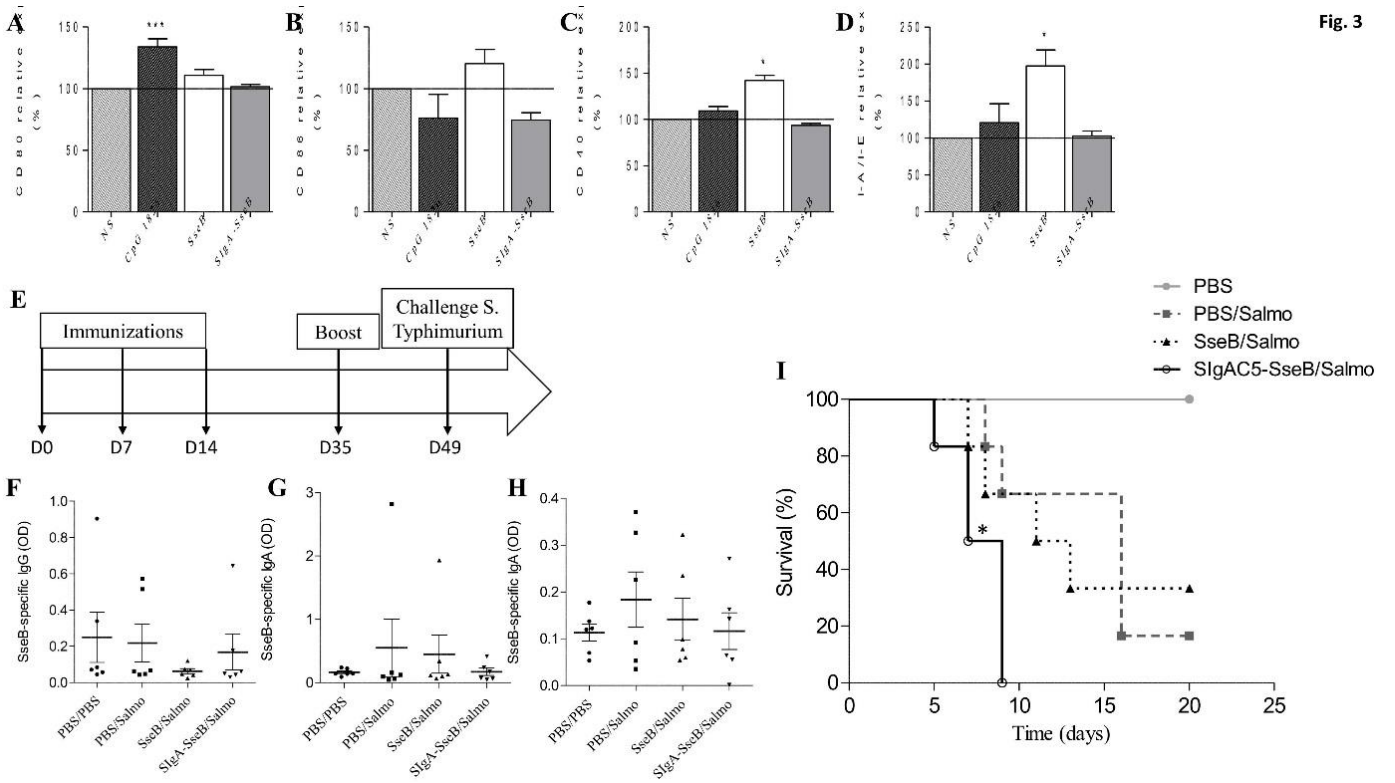


Fig. 3

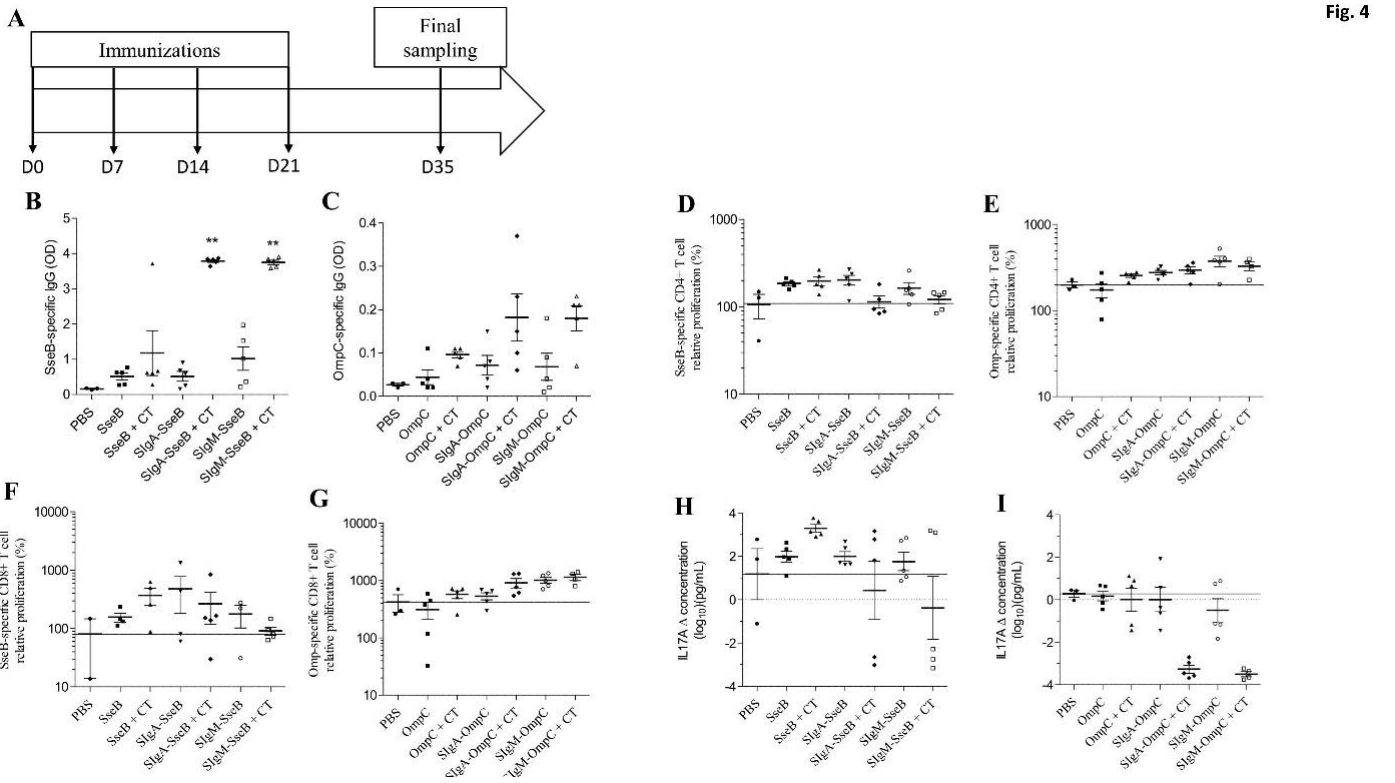


Fig. 4

Fig. 5

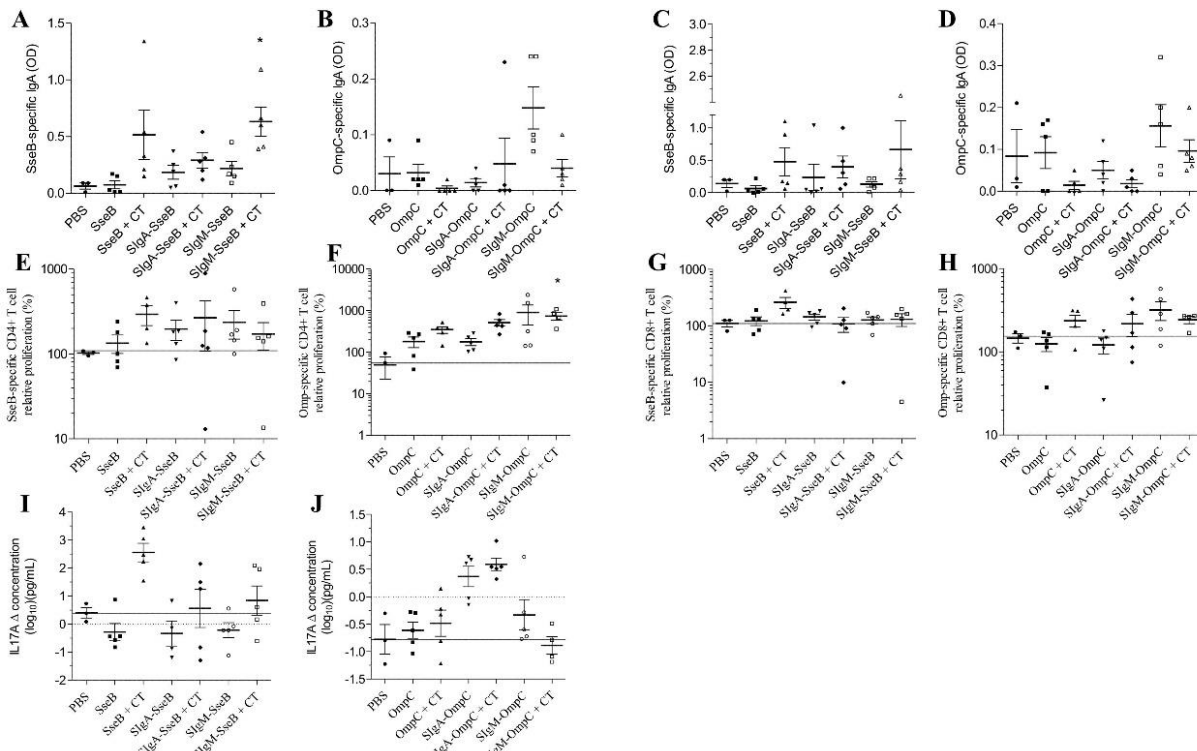
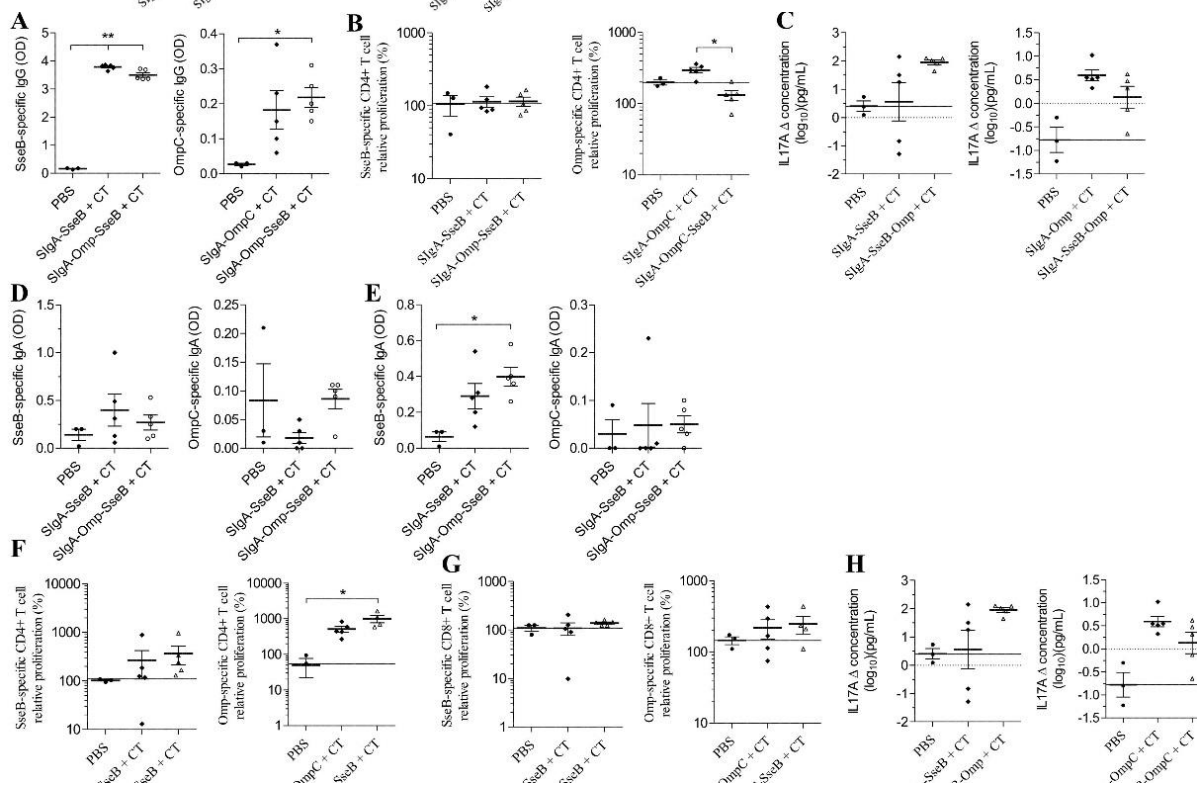
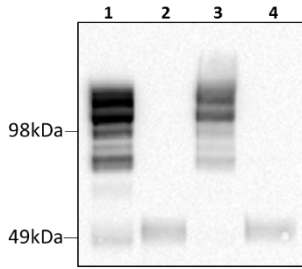
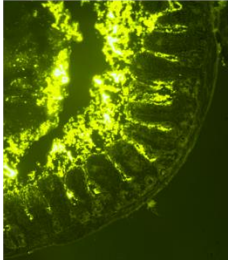


Fig. 6

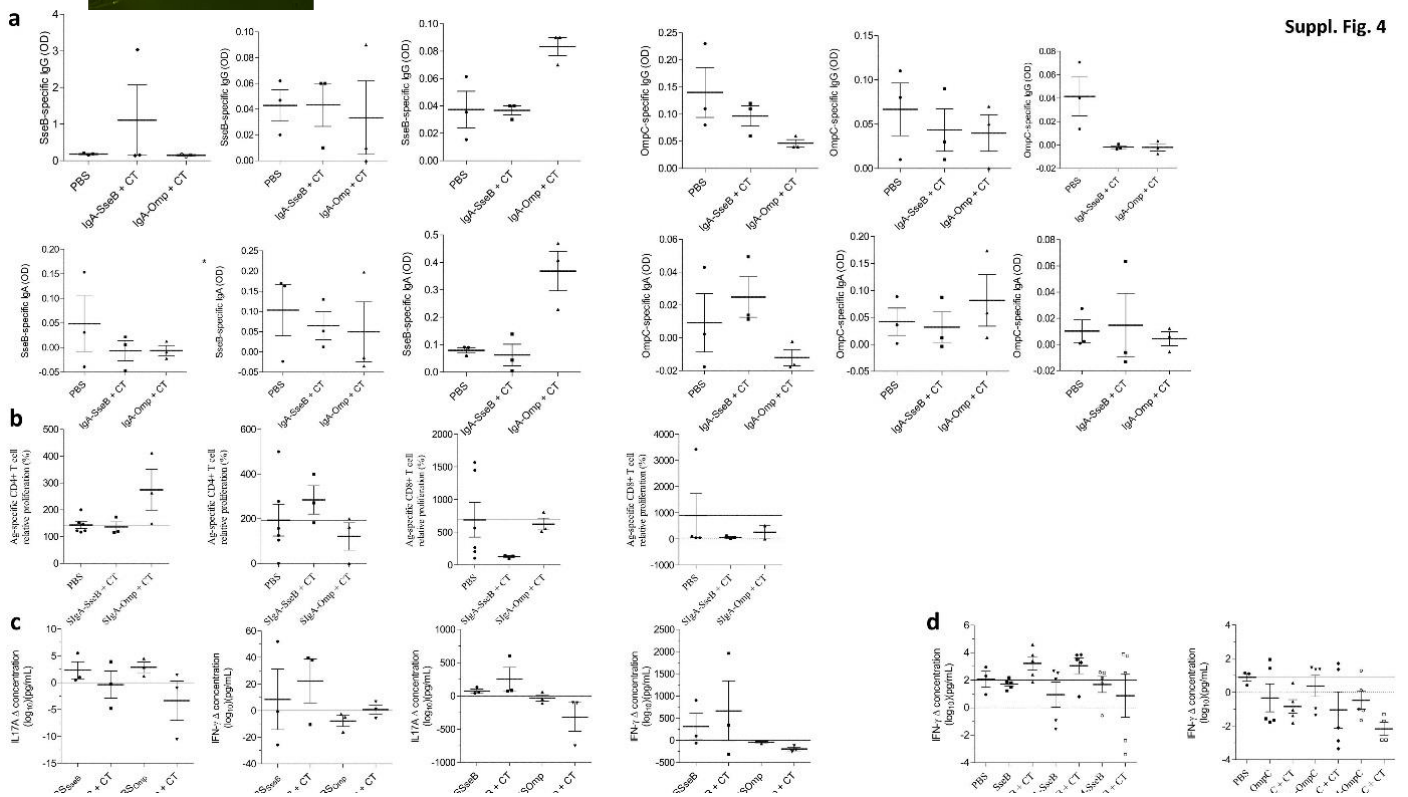




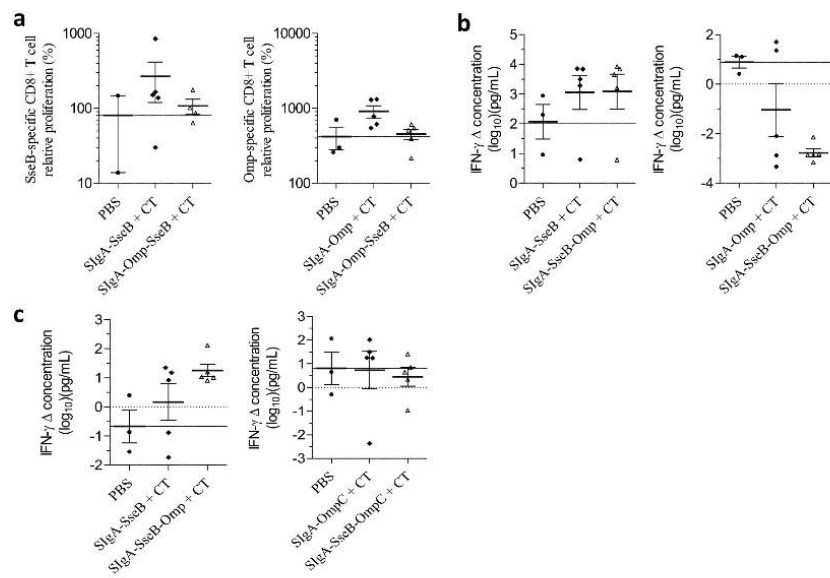
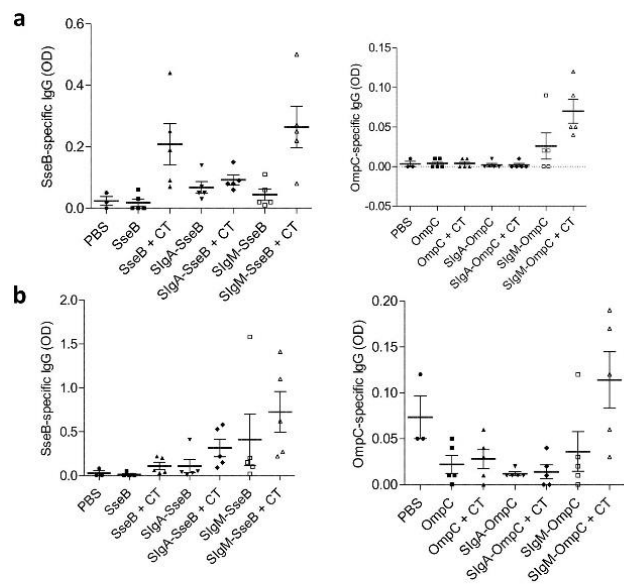
Suppl. Fig. 1



Suppl. Fig. 2



Suppl. Fig. 4



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Test de protection et meilleure caractérisation du vaccin multivalent

Nous avons observé des réponses humorales et cellulaires spécifiques des antigènes testés, tant au niveau muqueux que systémique, améliorées par l'utilisation des SIgA et des SIgM comme vecteurs. Cette stratégie est encore plus efficace lors de l'utilisation d'un vaccin multivalent en terme d'immunogénicité. La prochaine étape est de déterminer si cette réponse est protectrice contre une infection à *Salmonella*. Il serait aussi intéressant de tester l'infection par plusieurs souches de *Salmonella* mais cela revient à choisir des modèles différents puisque les sérovars ne peuvent pas tous être étudiés avec le même modèle.

La détermination du nombre d'antigènes pouvant potentiellement être couplés aux IgA et IgM et la mise en place d'un vaccin multivalent (MV) pose la question de la proportion de chaque antigène sur les IgA et IgM. Une prochaine étape serait donc de déterminer ce chiffre en digérant le MV et en observant la taille des différents fragments par Western blot ou spectrométrie de masse puisque l'on connaît les tailles des deux antigènes. En effet, la quantité d'antigène qui est administré lors de la vaccination peut influencer la réponse immunitaire induite.

Effet neutralisant des IgA sécrétoires

Nos vaccins induisent une réponse IgA muqueuse spécifique des différents antigènes. Sachant que les IgA sont connus pour leur fonction d'exclusion immune (353), une perspective à court terme serait de tester le pouvoir neutralisant des IgA induites par l'immunisation avec le vaccin. Ainsi, une vérification par western-blot permettrait de savoir dans un premier temps si les IgA retrouvées dans les fèces sont sécrétoires. Dans un second temps, nous avons mis en place une méthode permettant de mesurer le pouvoir neutralisant des IgA contre *Salmonella* avec la souche

SL1344-GFP⁺ de *S. Typhimurium*. Une étude a montré que les IgA Sal4 spécifiques du LPS de *Salmonella* permettaient l'agglutination des bactéries, empêchant leur entrée dans les PP et protégeant contre une infection (347). Nous avons confirmé l'agglutination de la SL1344-GFP⁺ en présence de cette IgA (**Figure 31A**) en microscopie à épifluorescence. La complexation de la SL1344-GFP⁺ avec l'IgASal4 diminuait par 2 la proportion de cellules intestinales humaines Caco-2 GFP⁺ comparé à l'absence d'IgA ou à la complexation avec l'IgAC5 spécifique de *Shigella flexneri* (**Figure 31B**). Ainsi, nous pourrions utiliser notre modèle afin de comparer l'effet des IgA sécrétées par les souris vaccinées avec l'IgASal4. Nous pourrions aussi comparer notre modèle avec une technique plus souvent utilisée consistant à infecter des cellules avec une *Salmonella* non GFP et compter le nombre de plages de lyses.

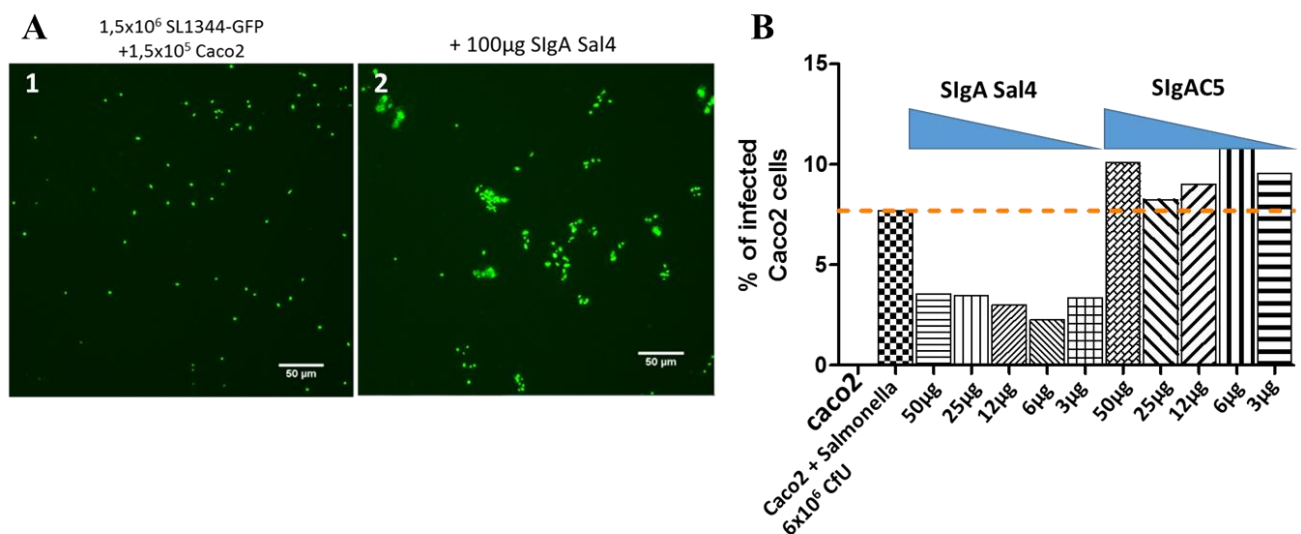


Figure 31: La complexation de Salmonella avec des IgA spécifiques de la bactérie limite l'infection de cellules intestinales humaines.

(A) La lignée de cellules épithéliales humaine Caco-2 est infectée 2h avec la souche SL1344-GFP⁺ de *S. Typhimurium* complexée (2) ou non (1) préalablement avec l'IgASal4 spécifique du LPS de *Salmonella*. (B) La proportion de cellules Caco-2 infectées (GFP⁺) est déterminée par cytométrie en flux avec ou sans complexation avec des IgA spécifiques de *Salmonella* ou de *Shigella*.

Réponse intestinale tolérogène versus nasale pro-inflammatoire

La grande interrogation de notre étude reste l'absence de réponse immunitaire et même la plus forte susceptibilité à *Salmonella* lors de la vaccination orale. Nous avons testé plusieurs paramètres afin de déterminer la cause de cette apparente tolérance. A priori, elle n'est pas due à la quantité trop forte ou trop faible d'antigène administré, ni à la présence ou non d'adjuvant, ni à la souche de souris utilisée (**Table 10**). Il conviendrait donc d'étudier plus en détail la prise en charge du vaccin dans le GALT et dans le NALT pour comprendre l'absence d'induction de réponse dans l'intestin, par exemple en caractérisant les DC du NALT.

Table 10: Récapitulatif des expériences d'immunisation chez la souris avec les candidats vaccins.

Obectif	Voie d'administration	Schéma d'immunisation	Modèle murin	Antigène (quantité en µg)	CT (µg)	Réponse obtenue
Tester effet protecteur muqueux contre Salmonella	Orale	3 + 1 boost + challenge (Expérience répétée en duplicat)	Balb/c	SseB (50)	-	Pas de réponse IgG et IgA spécifique de SseB. Diminution de la survie des souris vaccinées
Eviter un effet tolérogène par manque de stimulus pro-inflammatoire	Orale	3 + 1 boost	Balb/c	SseB (60)	2	Pas de réponse humorale et cellulaire contre SseB
Eviter un effet tolérogène dû à la trop forte quantité d'antigène	Orale	3 + 1 boost	Balb/c	SseB (10)	2	Pas de réponse humorale
Comparer les effets liés aux lignées murines	Orale	3 + 1 boost	Balb/c Et C57Bl/6	SseB (6)	2	Pas de réponse humorale ni cellulaire
Tester une autre voie d'administration	Nasale	3 + 1 boost	Balb/c	SseB (4)	-	Légère réponse humorale muqueuse et forte réponse IgG spécifique de SseB dans le sang
Comparer plusieurs antigènes et vecteurs par voie nasale	Nasale/orale	4	Balb/c	SseB/OmpC (10)	2	Cf papier

SseB active les cellules dendritiques *via* les TLR4/2 ?

Nous avons vu que les antigènes SseB et OmpC induisaient une réponse immunitaire en administration nasale mais pas par voie orale. Ceci pourrait être expliqué par le type de cellules prenant en charge les antigènes mais aussi par le type de récepteurs aux antigènes présents dans les différents tissus. Nous avons donc testé l'effet activateur de SIgA-SseB sur une population de cellules dendritiques de la muqueuse orale : les cellules de Langerhans (LC) (CD207⁺ ; CD1a⁺).

Nous n'avons observé aucune modification des marqueurs d'activation CD80, CD86, HLA-DR ou CD40 avec le candidat vaccin ni avec SseB seul (**Figure 32A**). Les LC n'exprimant pas le TLR4 (354), nous nous sommes naturellement intéressés aux récepteurs reconnaissant SseB. L'utilisation de lignées cellulaires (HEK) n'exprimant qu'un seul TLR à la fois a montré une forte activation des lignées exprimant le TLR2 ou le TLR4 (**Figure 32B**). Bien que ces récepteurs soient impliqués dans la reconnaissance des endotoxines, l'utilisation de PMB tend à conclure que le déclenchement de la réponse immunitaire par SseB serait médiée par les TLR2 et 4. Cependant, il conviendrait de tester aussi les TLR activés par l'OmpC, d'autres PAMP comme les NLR par exemple et s'assurer de l'absence totale d'endotoxines pour tester l'activation des TLR sans biais en détoxifiant par exemple les échantillons.

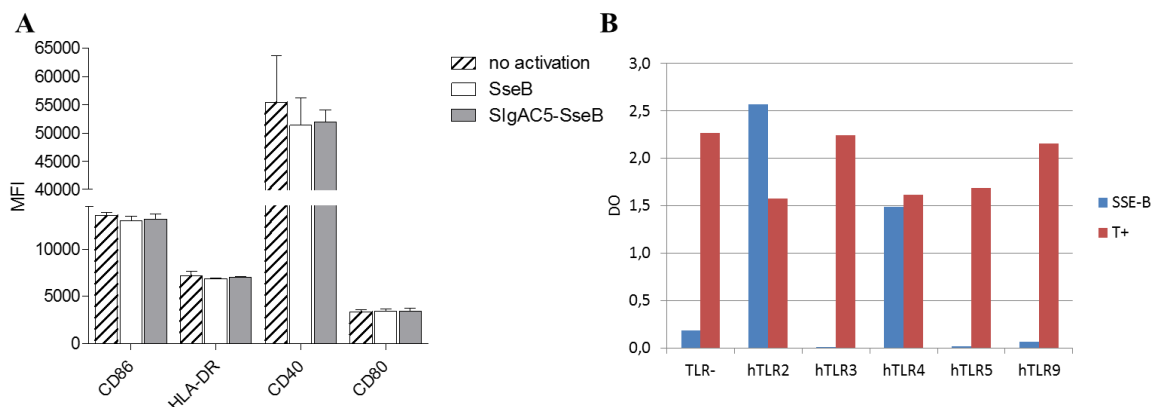


Figure 32: L'activation des cellules par SseB nécessite l'expression des TLR4 et 2.

(A) L'expression des différents marqueurs d'activation est analysée par cytométrie en flux après stimulation pendant 24h avec SseB ou SIgA-SseB. MFI=Mean Fluorescent Intensity. (B) Des cellules HEK n'exprimant qu'un seul Toll-Like Receptor (TLR) sont stimulées avec SseB (30µg/mL) ou des activateurs de chaque TLR pendant 24h. DO=densité optique.

Effet du vaccin sur des modèles de DC humaines

Il existe plusieurs allotypes d'IgA chez la souris avec des régions charnières plus ou moins grandes contenant des sites de O-glycosylation (355) mais aucune N-acetylgalactosamine n'y

était associée alors que la présence de N-glycans a été observée sur des IgA murines monoclonales (356). Ces indices laissent penser que l'IgA murine se rapprocherait de l'IgA2 humaine. Ainsi, nous nous sommes demandé si nos vaccins utilisant l'IgA murine pouvaient se lier sur des DC humaines. Etant donné l'absence d'interaction entre l'IgA murine et le Fc α RI humain (357) mais la structure relativement similaire avec l'IgA2 humaine, nous avons testé la fixation du vaccin sur DC-SIGN au regard de nos résultats sur l'IgA2 humaine. Nous avons observé une co-localisation entre SIgA-SseB et DC-SIGN sur des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes (moDC) (**Figure 33A**). Nous nous sommes ensuite demandé si les moDC pouvaient être activées par le candidat vaccin SIgA-SseB. Alors que SseB seul n'induisait pas de changement significatif d'expression des marqueurs d'activation, SIgA-SseB induisait une diminution et une augmentation de plus de 20% de l'expression respectivement du CD80 et du CD40 soit des tendances similaires au contrôle positif (**Figure 33B**). Ainsi, des cellules dendritiques humaines peuvent être activées par le vaccin. Comme pour la souris, l'étude de la prise en charge et de l'activation de cellules dendritiques humaines de l'intestin ou du tractus naso-pharyngé pourraient déterminer si notre stratégie est applicable aux muqueuses de l'Homme. Nous avons déjà pu observer les différentes populations de DC intestinales humaines CD103⁺ ou CX3CR1⁺ (**Figure 33C**).

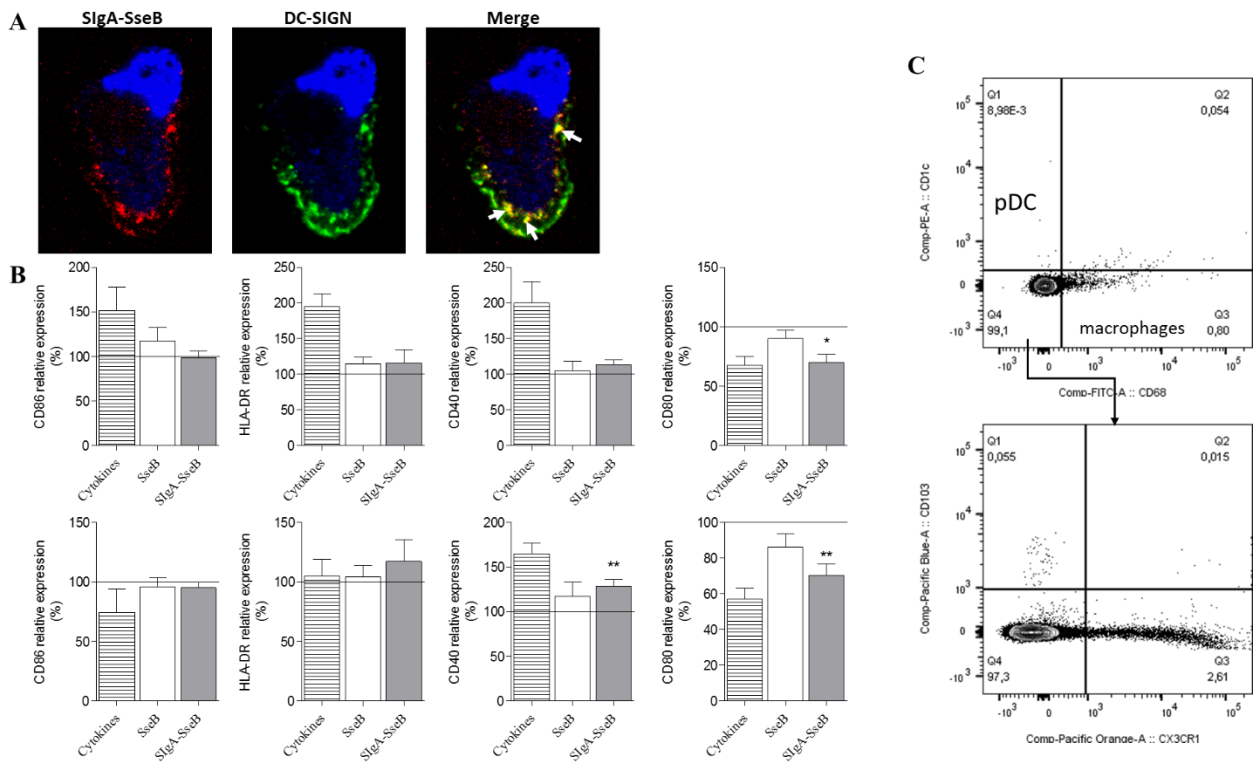


Figure 33: SIgA-SseB active des cellules dendritiques humaines.

(A) Des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes (moDC) sont incubées 1h avec le candidat vaccin SIgA-SseB couplé à la cyanine 3 (rouge). Les cellules sont fixées, perméabilisées et DC-SIGN est marqué (vert). Les co-localisations du vaccin avec DC-SIGN (flèches blanches) dans les cellules vivantes contenant un noyau (bleu) sont observées au microscope confocal. (n=2)(B) Des moDC sont stimulées 24h avec SseB ou SIgA-SseB (1 μ g d'antigène) en présence de polymyxine B (500ng/mL) puis l'expression des marqueurs d'activation à la surface des DC est mesurée par cytométrie en flux. Les MFI (Mean fluorescent Intensity) sont normalisées et comparées par rapport à celles observées sur les moDC non stimulées (seuil à 100%) afin de réduire les variations inter-donneurs. (n=6).(C) Phénotypes des populations cellulaires sur des chirurgies intestinales humaines par cytométrie en flux. pDC= cellules dendritiques plasmacytoïdes. (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$.

DISCUSSION GENERALE

Les IgA sont produites sous forme de monomères dans la circulation sanguine et sous forme sécrétoire dans les muqueuses, faisant de ces anticorps les plus représentés dans notre organisme (358). Les IgA sécrétoires sont responsables de la régulation de la réponse immunitaire intestinale tolérogène ou protectrice contre les microbes commensaux ou pathogènes (28). Ces travaux de thèse ont mis en évidence plusieurs points importants à avoir que : (i) les IgA1 ont un rôle globalement anti-inflammatoire alors que les IgA2 induisent une réponse pro-inflammatoire chez les cellules dendritiques dérivées de monocytes, (ii) les IgA sont capables d'induire l'expression de leur propres récepteurs, (iii) la vaccination contre *Salmonella* ciblant les cellules M du NALT via les SIgA et SIgM induit une réponse immunitaire effectrice systémique et muqueuse, (iv) un vaccin multivalent formé avec la SIgA et 2 antigènes conserve et optimise les propriétés immunogéniques des formulations vaccinales monovalentes.

A la lumière de nos données, plusieurs voies d'investigations s'offrent à nous. Nos expériences d'anse intestinale montrent que notre vaccin traverse le FAE seulement au niveau des PP mais ne déclenche pas de réponse immunitaire. Ces données sont en contradiction avec une étude infectant des souris avec le virus de la vaccine exprimant la p24 du VIH après immunisation orale avec l'antigène couplé à une SIgA. En effet, une réponse spécifique humorale (IgG et IgA) et cellulaire (LT sécréteurs d'IFN- γ) systémique et intestinale a été observée corrélée avec une protection après infection (172). Sur deux antigènes pouvant induire une réponse systémique (359) seule la p24 induit une réponse intestinale couplée ou non avec la SIgA. Les données surprenantes obtenues avec SseB pourraient indiquer une tolérance immunitaire au vu de la plus faible survie des souris immunisées avec SIgA-SseB. Par ailleurs, la même observation a été faite avec SIgA-OmpC injectée par voie orale. L'antigène utilisé pour vacciner par voie orale serait donc déterminant pour l'induction d'une réponse intestinale. Il serait intéressant de déterminer la cause de cette différence de réponse à savoir si elle est due : (i) seulement aux protéines SseB/OmpC (ii) aux bactéries *Salmonella* puisqu'il a été montré que *S. Typhimurium* induisait une réponse T

autoréactifs *via* Dectin-1 et une diminution de la production de cytokines par les LT suite à l'induction de PD-L1 (360, 361) (iii) au type de micro-organisme (iv) à la structure ou la présentation des antigènes (v) à la composition en cellules ou en micro-organismes commensaux du NALT par rapport au GALT puisque l'on sait que les microbiotes sont différents (362) (363).

Il est admis que les IgA intestinales induisant une réponse tolérogène contre le microbiote seraient prises en charge par des DC de la *lamina propria* alors que les IgA pro-inflammatoires passeraient par les PP et seraient donc captées par les DC du SED (33). Les SIgA couplées avec les antigènes de *Salmonella* transitent par les PP mais n'induisent pas de réponse inflammatoire. Ceci irait donc en contradiction avec le postulat précédent et pourrait être dû à un souci d'acheminement des Ag. Il est connu que les DC CX3CR1⁺ de la *lamina propria* sont plutôt résidents et déclenchent une réponse IgA TI locale alors que les DC CD103⁺ des PP auraient tendance à migrer dans les MLN afin d'activer une réponse IgA TD très spécifique (4). Nous pourrions imaginer que notre vaccin a été pris en charge par les « mauvaises » DC. En revanche, puisque nous observons une réponse immunitaire spécifique en ciblant le NALT, nous pourrions imaginer qu'un autre type de DC a capté notre vaccin. Une piste de recherche serait de définir les populations de cellules captant les IgA et déterminer leur réponse immunitaire locale et dans les autres muqueuses selon le tissu, les isotypes d'IgA, la présence ou l'absence d'antigène. Il serait par exemple intéressant d'observer si les DC de la *lamina propria* ont plus tendance à capter des IgA1 et celles des PP des IgA2 grâce par exemple à une plus forte expression du FcαRI par les premières et de DC-SIGN par les secondes.

Les IgM, comme les IgA, sont sécrétées par des plasmocytes très présents dans la muqueuse intestinale (181) et exportés sous forme de SIgM dans la lumière intestinale après fixation au pIgR (364). Les SIgM recouvrent les bactéries du microbiote, notamment celles déjà fixées par les SIgA et contribuent à augmenter la diversité du microbiote (181). Elles vont par ailleurs diminuer la réponse induite par le BCR à la surface des LB chez la souris et pourraient être

responsables d'une tolérance en limitant la présentation des antigènes du soi (365). De plus, les IgM pourraient compenser le manque d'IgA durant l'enfance pour la formation du microbiote (366). Les IgM ont aussi un rôle protecteur dans les muqueuses en activant la voie du complément par exemple contre des méningocoques du groupe B. (184). Le double rôle des IgA est donc retrouvé chez les IgM alors qu'un seul isotype a été décrit jusqu'à présent à la différence des IgA. La même étude que nous avons réalisée mais rapportée aux IgM pourrait apporter des informations sur leur fonction intrinsèque ou lors de l'interaction avec un antigène spécifique. Elle pourrait aussi informer sur l'interaction avec différents récepteurs comme le Fc receptor specific for IgM (FCMR) qui a été montré comme impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire médiée par les IgM (367). Enfin, la comparaison des DC prenant en charge les différents IgA et les IgM pourrait donner des indications quant au rôle régulateur de ces Ig et les quelques différences observées après vaccination avec l'un ou l'autre des vecteurs.

Les muqueuses étant des zones d'échanges privilégiées, de nombreux pathogènes s'en servent comme porte d'entrée. Les principaux sont (i) *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* chez les enfants et *S. aureus* chez les adulte pour le NALT, (ii) les bactéries *Shigella*, *Campylobacter* et les virus de l'Hépatite A et E pour le GALT, (iii) les bactéries *Chlamydia*, les virus herpes ou le VIH pour le GENALT. Des vaccins sont recherchés pour la plupart de ces pathogènes ou nécessitent de constantes améliorations du fait de l'évolution des pathogènes comme c'est le cas pour les virus influenza (368). La muqueuse nasale a été décrite à la fois particulièrement intéressante pour la vaccination muqueuse en touchant plusieurs tissus muqueux par une voie non invasive et de plus en plus accessible avec les nouveaux outils tels que les nanoparticules (352, 369). Nous avons confirmé cette tendance puisque nos vaccins, en particulier le multivalent (MV) induisaient une réponse systémique, intestinale et génitale. Bien que cette dernière soit légère et que la réponse au niveau des poumons mériterait d'être étudiée avec l'étude d'infiltrats leucocytaires et de sécrétions cytokiniques, on peut supposer une réponse

locale dans le NALT. Une fois cette future analyse effectuée, on peut supposer que l'utilisation des IgA/IgM pourrait permettre d'utiliser la voie nasale pour protéger contre un grand nombre de pathogènes muqueux. Il serait intéressant de tester notre approche avec des antigènes de certains pathogènes cités ci-dessus. Cependant, bien que la vaccination par voie nasale possède de nombreux avantages, elle peut être mal tolérée comme cela a pu être observé chez les enfants vaccinés contre la grippe qui présentaient une perte d'appétit, des céphalées et de la fatigue. Une autre alternative serait de tester la voie sublinguale qui permet la vaccination contre de nombreux pathogènes qui infectent les muqueuses mais aussi le compartiment systémique tout en nécessitant une faible quantité d'antigènes (162) (370).

Comme quatre antigènes peuvent être fixés sur les IgA, il serait possible de surmonter l'obstacle de la divergence entre les souches. Il serait néanmoins intéressant d'étudier une méthode permettant de fixer les antigènes de manière spécifique et stœchiométrique en contrôlant par exemple le type de liaison pour chaque antigène. Cette caractéristique pourrait même permettre de faire des vaccins personnalisables en couplant des antigènes par exemple de la grippe avec des antigènes de *Salmonella* injectés par voie nasale afin de protéger contre deux pathogènes (voire plus) différents. L'utilisation de l'IgM pourrait même augmenter les possibilités avec jusqu'à 10 sites de fixation dont la faisabilité reste à vérifier. Enfin, de récentes études ont mis en avant une nouvelle technique appelée MEFA (multiepitope fusion antigen) permettant de synthétiser une protéine vaccinale présentant plusieurs épitopes d'un seul pathogène comme *E. coli* entérohémorragique (371). L'utilisation de MEFA pour créer des « super antigènes » combinant plusieurs sérovars/souches amplifierait encore plus le spectre de protection tout en conservant une taille raisonnable.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des maladies dont l'étiologie est fortement liée à une dysbiose (Cf Annexe II). L'IgA est un garant de l'homéostasie intestinale grâce à son interaction avec les bactéries commensales (372). L'absence d'IgA conduit à une

colonisation anormale de certaines bactéries (128) et donc potentiellement à une MICI. Parmi les thérapies envisagées, la transplantation fécale pourrait rétablir un microbiote sain. Les limites de cette méthode restent inconnues mais on peut déjà imaginer une limite psychologique qui pourrait être surmontée par un traitement oral d'IgG ou d'IgA afin de rétablir la barrière intestinale et le microbiote (Cf Annexe II). Bien que peu de résultats encourageant n'aient été observés jusqu'à présent, notre étude des IgA1 et IgA2 dimériques et sécrétoires pourrait permettre de choisir les IgA à injecter chez les patients. Par exemple, cela pourrait passer par des IgA1 pro-toléro-gènes plutôt poly-réactifs et spécifiques de bactéries commensales si nous arrivons à décrire que la fixation d'un antigène spécifique n'abolit pas l'effet anti-inflammatoire. Les MICI sont caractérisées par une forte inflammation majoritairement médiée par le TNF- α (373), conduisant à des traitements avec des anti-TNF (Cf Annexe II). Nous avons observé une forte sécrétion de TNF- α après stimulation des DC avec les IgA2 mais aussi les IgA1 dimériques, en contradiction avec l'effet immunosuppresseur de ces dernières. Il conviendrait d'étudier plus en détails la sécrétion de cette cytokine notamment dans un contexte plus proche de la réalité par exemple avec des DC intestinales, des macrophages, d'autres populations leucocytaires mais aussi des entérocytes. Enfin, un des traitements envisagés qui montre des résultats encourageants est la transplantation fécale qui rétablit un microbiote sain à partir de celui d'un individu non malade. L'administration d'IgA pourrait avoir un intérêt à ce niveau en co-administrant par exemple une mixture de SIgA1 polyréactives à plusieurs antigènes commensaux d'un microbiote sain afin de créer une tolérance et protection vis-à-vis de ces microbes. Les IgA2 pourraient être couplés à des antigènes de bactéries non voulues afin de déclencher une réponse néfaste pour ces populations. Bien-sûr, cette théorie de microbiote personnalisé *via* les IgA1/2 reste à l'état embryonnaire et nécessite de s'assurer que la dichotomie anti-inflammatoire versus pro-inflammatoire des IgA1 et IgA2 est conservée en cas de fixation à un antigène et que les mêmes résultats sont obtenus en

présence de DCs intestinales. Par ailleurs, il faudrait déterminer si cette stratégie pourrait fonctionner par voie orale et nasale.

CONCLUSION GENERALE

Bien que les IgA et les IgM constituent une grande partie des anticorps produits dans l'organisme, surtout au niveau des muqueuses, les mécanismes régissant leur fonction de régulation de l'homéostasie restent à éclaircir. Ces travaux de thèse apportent de nouvelles informations sur les fonctions des différents isotypes et isoformes d'IgA. En effet, nous constatons un effet anti-inflammatoire des IgA1, exacerbé par la forme dimérique. A l'inverse, les IgA2 dimériques ont un effet pro-inflammatoire. Ces démonstrations pourraient expliquer le double rôle des IgA contre le microbiote ou les micro-organismes pathogènes. Nous avons démontré l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse et systémique contre des antigènes exprimés par *Salmonella* après injection par voie intranasale d'un vaccin utilisant les IgA et IgM comme vecteurs. L'utilisation de telles plateformes vaccinales permet de fixer plusieurs antigènes, notamment certains induisant plutôt une réponse humorale comme SseB et d'autres plutôt une réponse cellulaire comme OmpC. Les principales limites de cette thèse sont (i) l'utilisation d'un modèle de DC humaines non intestinales et (ii) l'absence de test de protection chez la souris mais aussi sur un modèle se rapprochant plus de l'humain. Finalement, une meilleure connaissance des IgA permettrait de mieux comprendre et donc lutter contre certaines pathologies des muqueuses comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin mais aussi de mettre en place une stratégie vaccinale prophylactique contre de nombreux pathogènes entériques et muqueux en général tels qu'*Helicobacter pylori* ou le VIH.

INDEX

Annexe I : Revue sur Salmonella



Vaccination against *Salmonella* Infection: the Mucosal Way

Rémi Gayet,^a Gilles Bioley,^b Nicolas Rochereau,^a Stéphane Paul,^a Blaise Corthésy^b

Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Saint-Etienne, France^a; R&D Laboratory, Division of Immunology and Allergy, CHUV, Centre des Laboratoires d'Épalinges, Epalinges, Switzerland^b

SUMMARY	1
INTRODUCTION	1
SAMPLING OF AND IMMUNE RESPONSES TO <i>SALMONELLA</i> IN THE HOST GUT	3
Interaction with and Uptake by the Host	3
GALT Features Important for Vaccine Design	4
Contribution of innate immunity	4
Role of adaptive immunity	6
(i) T lymphocytes	7
(ii) B lymphocytes	7
TOWARD NOVEL STRATEGIES FOR VACCINATION AGAINST TS AND NTS	8
Vaccines against TS: Ty21a and Vi Capsular Polysaccharide	8
Animal Models To Address Design of Vaccines against Human TS	9
Recent Developments in Human Vaccination	10
Vaccines Against NTS: Difficulties and Ongoing Efforts	11
Animal Models To Address Vaccine Design against Human NTS	12
<i>SALMONELLA</i> ANTIGENS AND THEIR USE IN VACCINE FORMULATIONS	13
DELIVERY VEHICLES FOR MUCOSAL VACCINATION	14
CONCLUSION	18
ACKNOWLEDGMENTS	19
REFERENCES	19

SUMMARY *Salmonella enterica* subspecies *enterica* includes several serovars infecting both humans and other animals and leading to typhoid fever or gastroenteritis. The high prevalence of associated morbidity and mortality, together with an increased emergence of multidrug-resistant strains, is a current global health issue that has prompted the development of vaccination strategies that confer protection against most serovars. Currently available systemic vaccine approaches have major limitations, including a reduced effectiveness in young children and a lack of cross-protection among different strains. Having studied host-pathogen interactions, microbiologists and immunologists argue in favor of topical gastrointestinal administration for improvement in vaccine efficacy. Here, recent advances in this field are summarized, including mechanisms of bacterial uptake at the intestinal epithelium, the assessment of protective host immunity, and improved animal models that closely mimic infection in humans. The pros and cons of existing vaccines are presented, along with recent progress made with novel formulations. Finally, new candidate antigens and their relevance in the refined design of anti-*Salmonella* vaccines are discussed, along with antigen vectorization strategies such as nanoparticles or secretory immunoglobulins, with a focus on potentiating mucosal vaccine efficacy.

KEYWORDS *Salmonella*, immunity, vaccination, gastrointestinal mucosa

INTRODUCTION

Salmonella enterica is a facultative intracellular Gram-negative bacterium which comprises 6 subspecies (*S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*, and *S. enterica* subsp. *salamae*). Among them, *S. enterica* subsp. *enterica* includes 1,531

serovars as of 2007, themselves divided in serogroups based on the antigenic variability of the O antigen in the outer membrane lipopolysaccharide (LPS). Several serovars are well known for their implication in food-related diarrhea-inducing diseases acquired via the fecal-oral route (1–3). The typhoidal *Salmonella* (TS) serovars *S. enterica* subsp. *enterica* Typhi (*S. Typhi*) (O:9) and *S. enterica* subsp. *enterica* Paratyphi A (*S. Paratyphi*) (O:2) exclusively infect humans and cause enteric fever, also referred to as typhoid fever. It is characterized by a systemic infection causing fever, respiratory distress, and hepatic, spleen, and neurological damage. TS-mediated infection strikes up to 21.7 million people in Africa, South and Central America, and Asia; the highest prevalence is reported in Southeast Asia (4), with a death rate of about 1%. Overall, this results in more than 200,000 deaths per year in countries with limited incomes (5). The nontyphoidal *Salmonella* (NTS) serovars *S. enterica* subsp. *enterica* Typhimurium (*S. Typhimurium*) (O:4) and *S. enterica* subsp. *enterica* Enteritidis (*S. Enteritidis*) (O:9) infect both humans and animals and are among the major causal agents of self-limiting gastroenteritis, a local infection that causes diarrhea (6). The areas where NTS disease is prevalent are located mostly in sub-Saharan Africa, as well as in south Asian countries, because of poor health care systems, malnutrition, and possible zoonotic transmission (7–9). Through food contamination, episodic outbreaks are also reported in developed countries, which may be caused by other serogroups, including O:7 and O:8 (10–13). In 2010, the estimated burden of NTS infection accounted for 93.8 million cases and 155,000 casualties (14). Infection by specific strains of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* may ultimately lead to systemic dissemination, referred to as invasive NTS. This results in high case fatality rates, especially for children below 3 years of age and for immunodeficient HIV- or malaria-infected individuals (7, 15), and adds 3.4 million cases and 681,316 deaths to the global NTS toll (16). The difference in disease symptoms resulting from TS and NTS can be explained by either mutation-induced loss of function or the deletion of around 11% of coding sequences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi*, which may be partly due to the host-specific adaptation of each particular serovar (17). Genome modifications include, for example, the expression of different virulence genes, such as the Vi capsular polysaccharide gene, which is expressed by particular *Salmonella* serovars, including, for example, *S. Typhi*, *S. Paratyphi B*, and *S. Dublin* (18–20). All the genetic, phenotypic, and pathogenesis differences indicate that TS and NTS have to be separately studied.

Currently, patients presenting either an acute invasive NTS- or TS-induced infection undergo antimicrobial treatment (21), often composed of fluoroquinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, or cephalosporins with a large spectrum of action. In spite of a good efficacy, these protocols are deemed to be increasingly limited in their use because of the appearance of multidrug resistance (MDR) for *S. Typhimurium* (22, 23), *S. Enteritidis* (24), *S. Typhi* (25–27), and *S. Paratyphi* (28). Several factors contribute to reduce the efficiency of a targeted antimicrobial treatment, such as, subpopulations of *Salmonella* showing increased survival after exposure to antibiotics (29), the presence in the host of more than one strain with different antibiotic sensitivity (30), and the possibility of transferring the resistance between bacteria (27, 31, 32).

The high morbidity and mortality and the inevitably increased exposure to MDR strains underscore the rationale fear of new epidemics (33). In this respect, vaccination remains a valid and needed approach for humans but also in the veterinary field, as NTS also affects livestock and farm poultry (34). As efforts toward the development of efficacious vaccines will inherently result in unexpected difficulties, the knowledge acquired in both *Salmonella* physiopathology and the host's mechanisms of defense is an essential asset to overcome them (35). The identification of relevant *Salmonella* antigens (Ags) and improved Ag delivery systems to be integrated within vaccine preparations will help to promote the activation of the host adaptive immune system. The gastrointestinal (GI) tropism of *Salmonella enterica* suggests that mucosal application of vaccines might be favored, with the aims of targeting specialized sampling sites such as Peyer's patches (PPs) (36) within the epithelium and of mobilizing a robust local T cell and antibody response in the gut-associated lymphoid tissue (GALT). However,

even if the GALT is the primary site where pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) are detected to trigger local responses (36), invading *Salmonella* will eventually have to be recognized by the systemic immune system as well. This emphasizes the likely need to include more than one Ag in vaccine formulations to prime multiple specific arms of the immune system at various stages of infection (37).

This review compiles the current knowledge acquired from past and present studies that have helped to define key parameters instrumental in the design of an efficient anti-*Salmonella* vaccine. Mechanisms of *Salmonella*-host interaction resulting in bacterial uptake, as well as the innate and adaptive anti-*Salmonella* protective immunity, are discussed first. Currently available vaccines and how to possibly overcome their limits are presented next. We finish by considering the potential of novel candidate *Salmonella*-derived Ags and their possible combination with recently developed mucosal delivery systems.

SAMPLING OF AND IMMUNE RESPONSES TO SALMONELLA IN THE HOST GUT

Interaction with and Uptake by the Host

After overcoming physicochemical obstacles protecting the epithelium (38), *Salmonella* (*S. Typhimurium* for most experimental investigations) penetrates the gut epithelium barrier by three routes, i.e., crossing via microfold (M) cells in PPs, intracellular invasion of epithelial cells, or through breaches in the epithelial lining.

M cells interspersed among the enterocytes covering the follicle-associated epithelium of the PPs and isolated lymphoid follicles are specialized cells that selectively sample intact microorganisms and/or soluble Ags and deliver the latter to the underlying lamina propria. Entry of non-self molecules is supported by the absence of MUC2 (a gel-forming mucin that is part of mucus) on the surface of M cells. Elsewhere along the gut, this main component of mucus physically decreases the attachment of bacteria on epithelial cells and contains antimicrobial defensins secreted by Paneth cells to chemically kill bacteria (39, 40). Following passage across M cells, the Ag is captured by Ag-presenting cells (APCs), including dendritic cells (DCs) and macrophages residing in the M cell pocket or located in the subepithelial dome region of PPs. Macrophages play a role in the elimination of engulfed bacteria and local production of cytokines, whereas DCs are key initiators of protective adaptive immune responses following migration to the mesenteric lymph nodes (MLNs). In the case of *Salmonella*, entry in M cells induces their rapid apoptosis and results in subsequent invasion of macrophages and gut epithelial cells via Toll-like receptor 5 (TLR5) located at the basolateral surface. Direct luminal engulfment of *Salmonella* by intestinal epithelial cells also occurs via disturbance of cellular actin polymerization and cytoskeleton organization (41) mediated by injection of effector proteins through the type III secretion system (T3SS). This triggers characteristic membrane ruffling, a prominent cellular change accompanied by induced cell death (42). The sum of these processes causes an increase of epithelium permeability leading to massive invasion and dissemination.

More direct sampling of bacteria occurs through luminal uptake as well: at steady state and following infection, lamina propria C-X-3-C motif chemokine receptor 1 (CX3CR1)-expressing DCs displaying transepithelial dendrites capture *Salmonella* directly from the lumen (43). In another mechanism, intestinal CD103⁺ DCs in the mouse lamina propria are recruited in the intestinal epithelium upon gut challenge with *S. Typhimurium*, inducing transepithelial protrusion of their dendrites to capture luminal bacteria (44). Mechanistically, it has been observed that transepithelial dendrite extension is induced via engagement by *Salmonella* of TLRs expressed by epithelial cells (45). It is noteworthy that whatever the DC subtype analyzed, these extensions appear without compromising the integrity of the epithelial barrier, most likely as a consequence of the formation of tight-junction-like structure linking the dendrites and the contiguous epithelial cells.

Recently identified mechanisms have shed additional light on the subtle complexity of the interaction between *Salmonella* and the host epithelium. In neonate mice, *Salmonella* invasion and proliferation are more pronounced than in older animals (46),

arguing that epithelial maturation and a lower turnover of epithelial cells contribute to limit bacterial aggressiveness. This refinement in the sensing of the bacterium by the host may account for the large number of different proteins expressed by *Salmonella* that bind to the extracellular matrix on epithelial cells. In addition, *Salmonella* may also be recognized by plasma membrane receptors. Among the several receptors present on the M cell surface recognizing PAMPs (47), glycoprotein 2 (GP2) associates with *Salmonella* via the FimH pilus component; the absence of GP2 in knockout mice leads to a drop of the *Salmonella* burden in PPs, resulting in a concomitant reduction of antibody production against the bacterium (48). Annexin A5, a protein expressed on the apical side of M cells, has been identified as a receptor for the lipid A domain of the LPS moiety found on Gram-negative bacteria (49). *Salmonella* flagellin was defined as a key actor in promoting M cell differentiation through its capacity to trigger secretion of C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20) by epithelial cells, a chemokine-inducing recruitment of DCs involved in the conversion of epithelial cells into M cells (50). Along the same line, the *Salmonella*-secreted SopB protein contributes to increase host invasion by converting epithelial cells in the follicle-associated epithelium into M cells (51). It remains to be determined whether this process is beneficial for *Salmonella* finding its entryway or whether this may be seen as a means for the host to increase Ag sampling and thus to reinforce the intensity of the local immune response. Of note, while *S. Typhimurium* remains the preferential serovar for studying infection, the path of epithelial entry of *S. Typhi* is less well known. *S. Typhi* can be taken up by M cells, but more comprehensive mechanical investigations are needed to resolve similarities and differences between the two serovars in view of designing an optimal vaccine that displays the highest spectrum of action. Altogether, based on the numerous strategies used by the host to sense *Salmonella* at the level of the epithelial barrier, targeting these pathways in order to elicit a strong mucosal response appears to be a promising approach.

GALT Features Important for Vaccine Design

The GALT is characterized by a complex network of cellular and molecular players which confer the capacity to differentiate harmless Ags such as nutrients or commensal bacteria from PAMPs carried by pathogens. The tolerogenic environment of the intestinal tract thus has to be seen as an additional challenge to overcome when it comes to defining vaccine formulation for oral administration. In this respect, understanding the nature of the immune responses during *Salmonella* infection is crucial for several reasons: (i) to engineer a vaccine which will elicit protective responses close as those induced by the invading bacterium, (ii) to select for the best Ag(s) to efficiently protect at the mucosal and systemic levels, (iii) to trigger specific and prolonged (memory) activation of the immune system, and (iv) to avoid immune tolerance or adverse effects associated with a defect in homeostasis. Nowadays, a relatively clear picture of the most important immune actors involved in fighting *Salmonella* infection has been established (Fig. 1).

Contribution of innate immunity. Cellular and molecular partners involved in innate mechanisms of protection against *Salmonella* have been extensively studied and have been discussed in detail in recent reviews (52–54). In the face of this extensive literature, we have chosen to deliberately deal with this aspect in the frame of *Salmonella* vaccination more succinctly.

In the absence of any contribution by Ag-specific T and B cells, innate immunity in the mouse depends on membrane-bound TLRs (55) and cytosolic nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) (56) recognizing bacterial PAMPs. Subsequent activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) mediates induction of proinflammatory cytokines, including interferon gamma (IFN- γ) (57, 58) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (59). In turn, this stimulates cellular effector mechanisms (35, 60) that compromise intracellular and extracellular *Salmonella* survival and proliferation. The relevance of these innate pathways is shown in humans suffering from rare primary immunodeficiencies, who exhibit severe systemic invasion by *Salmonella*. In human

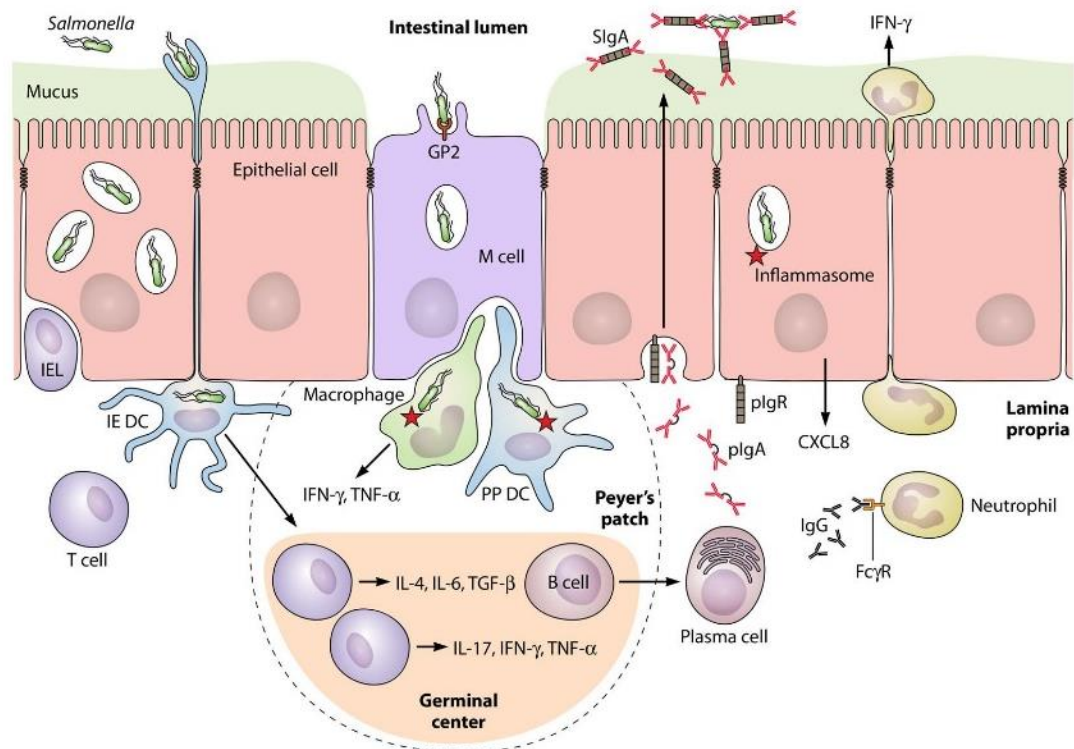


FIG 1 Schematic overview of the mucosal immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In the follicle-associated epithelium, bacterial sampling occurs via the GP2 receptor on M cells and to a lesser extent by direct luminal capture through dendritic cells (DCs) extending their dendrites across the epithelium (intraepithelial [IE] DCs). Uptake by macrophages in the Peyer's patch (PP) induces the onset of intracellular reactions mediated by the inflammasome network of proteins, resulting in the local production of numerous proinflammatory mediators. DCs in the subepithelial dome of PPs process M cell-transported *Salmonella* for presentation to T cells residing in the interfollicular region of the germinal center. This results in their differentiation into effectors with profiles reinforcing the inflammatory Th1/Th17 responses or favoring production of a Th pattern prone to prime B cells to switch to polymeric IgA (pIgA) production. T and plasma cells ensure local responses and dissemination to distant effector sites after migration to the mesenteric lymph nodes and circulation (not shown). Polymeric IgA is transcytosed from the lamina propria to intestinal secretions by the epithelial polymeric Ig receptor (pIgR); the resulting complex, called secretory IgA (SIgA), specifically recognizes *Salmonella* and prevents its attachment to the epithelium, a function referred to as immune exclusion. Natural IgM can similarly be transported by the pIgR and ensures a similar neutralizing function (not shown). Intraepithelial lymphocytes (IELs) participate in protection through their cytotoxic function and cytokine production. Upon epithelial sensing of *Salmonella*, released CXCL8 attracts neutrophils which participate in protection by locally secreting IFN- γ . Mucosal exudation of *Salmonella*-specific IgG from the circulation contributes to bacterial neutralization and activation of neutrophils via Fc γ receptors (Fc γ R) in the lamina propria. The figure is not drawn to scale.

patients presenting a deficiency in interleukin-12 (IL-12) or IFN- γ and in mice with either gene knocked out, increased susceptibility to infection by *Salmonella* has been reported (61). A mode of action of IFN- γ relies on the decrease of the intracellular tryptophan level and control of *S. Typhi* growth, as observed in infected volunteers (62). In comparison with wild-type (WT) animals, macrophage migration inhibitory factor-deficient mice orally infected with *S. Typhimurium* produce less IFN- γ and TNF- α , show increased bacterial loads in spleen and liver, and exhibit poor survival (63). Production of IFN- γ by either NK cells (64) or neutrophils (57) contributes to ensure protection, suggesting some degrees of redundancy in the source of these two essential protective cytokines.

Simultaneous deletion of TLR2, -4, and -5 in mice infected with *S. Typhimurium* leads to an absence of TNF- α and CCL2 production and results in poor survival rates in comparison with WT mice (55). Simultaneous deletion of TLR2 and TLR4 in bone marrow-derived macrophages (BMM) decreases secretion of nitric oxide (NO) and TNF- α in response to *S. Typhimurium* (65). TLR2-mediated recognition of curli amyloid fibrils contributes to the production of proinflammatory IL-17A and IL-22 after *Salmonella* entry in the intestinal mucosa (66). Consistent with this, epithelium-targeted deletion of the gene for the TLR adaptor molecule myeloid differentiation primary

response 88 (MyD88) in mice results in massive tissue damage and impaired goblet cell function after infection with *S. Typhimurium* (67). The deletion of *MyD88* in mice also induces a decrease of IFN- γ production and subsequent increase of systemic IL-10 (an anti-inflammatory cytokine) (68, 69). Thus, targeting the TLR/MyD88 pathway via a specific “adjuvant” ligand may serve as an interesting strategy to strengthen the innate arm of the immune response against *Salmonella*.

In addition, nonconventional T cells, often classified as cells with innate-like properties, such as major histocompatibility complex (MHC)-related protein 1 (MR1)-restricted mucosal associated invariant T (MAIT) cells, CD1d-restricted NKT cells, and γ/δ T cells, can play a role in protection against *Salmonella* infection (70). Recent data show that MAIT cells bind an *S. Typhimurium* Ag ligand presented in the MR1 context with high affinity (71, 72). Increased local recruitment of MAIT cells secreting principally IL-17A and to a lesser extent IFN- γ and TNF- α after *S. Typhimurium* infection in mice has also been recently reported (73). *In vitro* and *in vivo* experiments have shown an IL-12-dependent IFN- γ production by CD1d-restricted NKT cells following *S. Typhimurium* recognition (74, 75). Depletion of γ/δ T cells through treatment with T cell receptor (TCR)-specific monoclonal antibodies in mice decreases by 300-fold the 50% lethal dose of *S. Enteritidis* administered orally (76). In a mouse model allowing tracking of intraepithelial γ/δ T cells, deficient migration in the intestinal epithelium increases *S. Typhimurium* translocation and leads to salmonellosis of greater severity (77). Whether the activation status of these cells is a marker to be studied postvaccination and whether they might be targeted by vaccine formulations remain open at this stage.

Involvement of innate immunity is clearly instrumental as indicated by the many manners it contributes to *Salmonella* clearance. Along the same line, the TLR signaling circuit of the inflammasome pathway (78, 79) and several nonconventional T cell subsets may act in addition to or in synergy with adaptive mechanisms induced by vaccination, yet such a cross talk is in need of investigation. Targeting one or combining several innate immune pathways with PAMP-derived adjuvants integrated in vaccine formulations can be seen as a valuable exploratory process to convert a slightly protective vaccine to a highly efficient one. This would also contribute to addressing the challenge of identifying potent orally active and safe adjuvants for vaccination in humans.

Role of adaptive immunity. Innate immunity is an efficient first line of defense against pathogen infection; however, the establishment of a full specific and long-lasting protection relies on the induction of both humoral and cellular immunity. Understanding the mechanisms leading to efficient adaptive immune responses against *Salmonella* infection is hence crucial to design optimized vaccine candidates.

To elicit mucosal immunity, intestinal DCs acting as professional APCs must take up Ags and deliver them to draining MLNs (80). DCs in both the subepithelial dome region of PPs and the lamina propria require expression of C-C motif chemokine receptor 7 (CCR7) to migrate to MLNs, where the inflammatory context primed by enteropathogens favors the induction of effector T cells imprinted for gut homing (81, 82). Specifically, upon challenge with *Salmonella*, intestinal CD11c⁺ CD11b⁺ CD103⁺ DCs are apparently the only subtype equipped with a battery of functions to independently complete the processes of uptake, transportation, and presentation of bacterial Ags (44). However, these results have been challenged in a recent study showing that the decrease of this DC population in interferon regulatory factor 4 (IRF4)-depleted mice did not change the local and systemic burden of *S. Typhimurium* after infection, either the proportion of specific IFN- γ -secreting T cells or the serum levels of *Salmonella*-specific IgM and IgG (83). Under conditions of antibiotic-induced dysbiosis, CD103⁻ CX3CR1^{hi} mononuclear phagocytes expressing CCR7 have been shown to traffic *S. Typhimurium* to the MLNs and elicit T cell responses and IgA production (84). This suggests that both the presence of the microbiota and the gut inflammatory condition determine the type of APC subsets that migrate to MLNs and eventually modulate the outcome of the intestinal immune response.

(i) **T lymphocytes.** Both IFN- γ -producing CD4⁺ Th1 cells (85–87) and cytotoxic granzyme/perforin-expressing CD8⁺ T cells (88) are important contributors of adaptive immunity via the production of antimicrobial cytokines (86), the killing of infected cells, or the generation of memory B cells (85). Interestingly, the TLR signaling adaptor MyD88 has been shown to be crucial for T cell proliferation and Th1 differentiation (69). Suppression of CD4⁺ T cells by irradiation induces reactivation of latent *Salmonella*, suggesting the importance of such cells in the control of persistent infection (89). Spatial fine-tuning of specific CD4⁺ T cell responses in mice orally infected with *Salmonella* has been reported to occur as a function of the temporal expression of bacterial Ags. A long-lasting systemic CD4⁺ Th1 cell response to the SseJ Ag of the T3SS persists until bacterial clearance is achieved. In contrast, mucosal flagellin-derived FljC Ag-specific CD4⁺ T cells with a Th1 and Th17 bias expand and contract concomitantly with the expression of the Ag by *Salmonella* (37). This suggests that a combination of early transient and late accumulating T cells of different antigenic specificity should ideally be induced to permit optimal vaccine coverage. At the functional level, IL-17A would permit recruitment of neutrophils, but its presence leads to only mild reduction of bacterial loads in the livers and spleens of mice infected with *S. Enteritidis* (90). Th17 cells have also been shown to trigger the production of antimicrobial peptides (60). In conclusion, a Th1 response is unambiguously protective and must be elicited by the process of vaccination. A secondary role of Th17 or CD8⁺ T cell subsets in participating in the immune response against *Salmonella* is required as well. With regard to the design of future vaccines, the functionality of such T cells may serve as a valuable marker to judge the appropriate modulation operating at the level of the immune system, in particular when a protective T cell memory response has to be induced. For example, mixing cinobufagin with formalin-inactivated *S. Typhimurium* vaccine boosts the Th1 type of responses and enhances the protective efficacy of the vaccine in challenged mice (91).

(ii) **B lymphocytes.** Induction of B cell responses after recognition of *Salmonella* Ags can take place either by a T cell-independent detection of, e.g., polysaccharides or, in the case of polypeptide-specific responses, by interaction of B cells with activated CD40L⁺ T cells (92). Activation of the T cell-dependent pathway presents the advantage that antibody class switch, affinity maturation, and memory responses are induced. B cell-deficient mice vaccinated with an attenuated strain of *S. Typhimurium* (SL3261) and then infected with the virulent strain SL1344 display a reduced survival rate compared to WT animals (93). In mice, immunization with Vi polysaccharide from *S. Typhi* induces protective Ag-specific B1b cells in the peritoneal cavity (94). Along the same line, after infection with *S. Typhimurium*, protective B1b cells specific for outer membrane protein (Omp) porins OmpC, OmpD, and OmpF are generated (92), suggesting that this B cell subtype can recognize both proteinaceous and nonproteinaceous entities in a T cell-independent manner. Furthermore, transfer of B1b cells from OmpD-immunized mice to B cell-deficient mice results in the production of a sufficient amount of IgM to limit infection following intraperitoneal (i.p.) *Salmonella* injection (92). B cells also can be directly activated by microbial products through TLRs and MyD88, highlighting the role of adjuvants in vaccination against *Salmonella*. After immunization with an attenuated *S. Typhimurium* strain, chimeric mice with MyD88-deficient B cells present a marked decrease in antigen-specific IgG2c, while other isotypes are not or are much less affected (68). In these animals, the absence of the *Salmonella*-specific B cell receptor (BCR) impedes the activation of Th1 memory cells (95).

Following activation, B cells differentiate into plasma cells, which produce Ag-specific antibodies. In addition to secretory IgA (SIgA) and IgG isotypes, IgM has been demonstrated in areas of endemicity to mediate protection against *Salmonella* as well (96). Vaccination of volunteers with Ty21a induces secretion of anti-LPS or anti-Omp IgA/IgG by B memory cells (CD27⁺ IgD⁻) expressing the $\alpha 4\beta 7$ gut homing integrin (97). Differences in frequency and activation marker expression of memory B cell subsets in volunteers challenged with oral *S. Typhi* result in various clinical outcomes, arguing further for the importance of B cells in recovery (98). In addition to antibody production,

Salmonella-infected B cells can also serve as APCs to activate cytotoxic IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells (99).

Because infection by *Salmonella* occurs in the intestine before disseminating to systemic compartments, induction of more global humoral immunity is expected as well. It is important to recall that most of the humoral immune response at mucosal surfaces is ensured by SIgA (100). The antibody is essential for the maintenance of intestinal homeostasis, as it fulfills multiple functions, including immune exclusion (101, 102) and homeostatic control of microbiota (103). Further, SIgA quenches inflammatory circuits locally and potentiates the regulatory properties of mucosal DCs and T cells. Prevention or reduction of penetration of the epithelial barrier by enteropathogens via specific SIgA has proven to be a crucial mechanism for efficient protection and maintenance of homeostasis (104, 105). SIgA is produced in response to *S. Typhimurium* invasion across M cells in PPs via the local B2 cell subtype (106). Specifically, *Salmonella* LPS-specific IgA Sal4 has been shown to impede *Salmonella* adhesion and invasion of intestinal enterocytes *in vitro* when incubated with *Salmonella* (107, 108). In mice grafted with the hybridoma producing IgA Sal4, the release of SIgA into the GI tract ensures protection against oral bacterial challenge (109). Moreover, IgA recovered from the blood of *Salmonella*-immunized mice lacking the polymeric Ig receptor (pIgR), ensuring transport of IgA into secretion, reduces invasion of epithelial cells by *S. Typhimurium* *in vitro* (110). WT mice orally infected with *S. Typhimurium* also display a much higher survival rate than their counterparts lacking pIgR. In addition to neutralizing pathogens and preventing their interactions with the epithelium, SIgA antibodies also affect bacterial metabolism. IgA Sal4 recognizes an epitope in the O Ag of *Salmonella*, inducing alteration in integrity of the outer membrane and assembly of the T3SS (111). The observation that SIgA as such or in complex with bacteria is anchored in the mucus layer overlying the epithelium further reinforces the notion that the antibody is crucial to neutralize *Salmonella* within the intestinal lumen. This is consistent with the observation that absence of MUC2 increased mouse sensitivity to *S. Typhimurium* compared to that in WT animals (112).

Interestingly, recent studies suggest that the role of SIgA extends beyond blocking of *Salmonella* adhesion to the intestinal epithelium. In the mouse model, and as confirmed in the rabbit and in human resections, SIgA has the ability to bind selectively to M cells (113) and to be taken up by reverse transcytosis in a dectin-1-dependent manner (114). Thus, an alternative function of SIgA would be to drive the associated Ag into PPs for presentation under moderately inflammatory conditions (115). Delivery of SIgA-based immune complexes thus guarantees appropriate sampling by M cells in PPs, stabilization of the Ag, and elicitation of immune responses to ensure subsequent protection in the absence of massive epithelial damage.

The knowledge acquired on how to mobilize both innate and adaptive immunity represents an asset for generation of an environment able to trigger appropriate immune responses by vaccination. In the case of *Salmonella* infection, the adjuvant(s) and delivery system(s) have to be selected based on their ability to induce IgA, IgG, and IgM, as well as Th1 and Th17, responses.

TOWARD NOVEL STRATEGIES FOR VACCINATION AGAINST TS AND NTS

Vaccines against TS: Ty21a and Vi Capsular Polysaccharide

Two licensed vaccines against *S. Typhi* are currently available, in the forms of the orally administered live attenuated vaccine Ty21a (Vivotif) and the injectable Vi capsular polysaccharide (Vi CPS) vaccine (Typherix or Typhim Vi). The Ty21a vaccine was obtained by nonspecific chemical mutagenesis of the *S. Typhi* Ty2 strain, resulting in a *galE* mutant that lacks the enzyme UDP-galactose-4-epimerase (116). This mutation induces bacterial lysis due to the accumulation of galactose derivatives during growth in the host, yet it preserves LPS synthesis. Surprisingly, the mutant no longer expresses the Vi capsule, indicating that the 3-year cumulative efficacy after injection of 3 vaccine doses (51% in adults and children over 5 years [117]) cannot be attributed to this Ag. Vaccination with Ty21a shows cross-protection against both *S. Typhi* and *S. Paratyphi*

B (118), while another recent study measured cross-reactive multifunctional memory CD8⁺ T cell-mediated immune responses against *S. Typhi* and *S. Paratyphi A* and B in immunized adults (119). At the mechanistic level, this vaccine promotes expression of the mucosal homing receptor $\alpha 4\beta 7$ (120) on lymphocytes, thus ensuring proper local immunity at the site of pathogen entry. The Ty21a strain has proven to be genetically stable (121); however, its fitness in the gut may not be guaranteed. Because of the high dose of vaccine required to achieve immunogenicity and its formulation as large capsules, Ty21a can be prescribed only to children over 5 years of age (122, 123). In immunocompromised individuals infected with HIV or those suffering from malaria (124, 125), vaccination with a live attenuated bacterium also represents an issue.

The Vi CPS vaccine is composed of purified Vi polysaccharide from *S. Typhi*. A single vaccination dose is sufficient to induce a 3-year cumulative protection in 55% of the vaccinated population. However, troublesome limitations preclude the general applicability of Vi CPS in the at-risk population: (i) the polysaccharide nature of Vi CPS induces only a T cell-independent antibody production, affecting both class switch and affinity maturation; (ii) although a recent study showed antibody responses in infants 30 days after Vi CPS immunization (126), a lack of immunogenicity in the most affected population, i.e., infants under 2 years of age, was reported previously (127); (iii) the Vi CPS vaccine does not protect against the other main pathogenic serovars responsible for either NTS or TS disease; (iv) the parenteral injection of Vi CPS only triggers surface expression of the systemic homing L-selectin on plasma cells; and (v) as Vi CPS is derived from a purified bacterial Ag, it contains traces of typhoidal LPS, which may bias our understanding of its intrinsic immunogenicity (120). Another drawback is that TNF- α secretion in spleen and MLNs is inhibited by the Vi capsule *in vivo* (128). Other studies have underscored the inhibition of neutrophil recruitment via the Vi CPS, which impedes the secretion of the neutrophil chemoattractant C5a, a component of complement pathway (129). The Vi capsule has also been shown to limit adaptive immunity by suppression of T cell activation and effector function through impairment of early activation signaling pathways (130).

The mechanism of action of the available vaccines remains unclear; indeed, clues as to this aspect are based on empirical observations due to insufficient knowledge of host immunity at the time of their release. The protective efficacy of the two vaccines administered in combination has never been systematically evaluated. One could imagine a three-dose injection of Ty21a with a Vi CPS boost in order to induce broader protection. In support of this, the inactivated whole-cell vaccine targeting *S. Typhi* has proven to be the most effective in the U.S. and British armed forces, with a 3-year cumulative efficacy of 73%. However, its demonstrated high reactogenicity hindered its use outside military staff. Overall, the various degrees of immunogenicity and protection demonstrated by the above-mentioned anti-*Salmonella* vaccines, together with troublesome safety issues, preclude their administration to at-risk populations in areas of endemicity (131).

Animal Models To Address Design of Vaccines against Human TS

In the context of vaccine design, a pertinent animal model mimicking as optimally as possible human responses is essential to draw valuable conclusions as to immunogenicity and efficacy. Vaccines have been initially evaluated in a murine model based on infection with the serovars *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. The model recapitulates human systemic infection by *S. Typhi* but does not cause symptoms of human typhoid fever (132). Recent progress that has been made toward the development of more relevant infectious animal models is presented below (133) (Table 1).

Classically, mouse strains deficient in Nramp1 (iron transporter in endosomes), such as BALB/c and C57BL/6 mice, have been used as a model for typhoid fever. Indeed, infection with *S. Typhimurium* via the orogastric route leads to a systemic infection and is ultimately lethal in several days or up to 2 weeks, depending on the dose (134). New models rely on immunodeficient (severe combined immunodeficiency [SCID]) mice engrafted with human hematopoietic stem cells (hHSC). Depending on genetic mod-

TABLE 1 Animal models to evaluate vaccination protocols against *Salmonella* infection

Disease	Animal	Particular features	Bacterium	Route of administration	Reference(s)
Typhoid fever	Mouse	Nramp1 ^{-/-} susceptible strains (acute infection)	<i>S. Typhimurium</i> , low to very low doses	Orogastric, parenteral	35, 238
		Nramp1 ^{+/+} resistant strains (persistent infection)	<i>S. Typhimurium</i> , medium or high doses	Orogastric, parenteral	35, 238
		Rag2 ^{-/-} γ chain ^{-/-} + hematopoietic stem cells	<i>S. Typhi</i> , other serovars	i.p.	135, 136, 238
		NOD-scid IL2R ^{-/-} + hematopoietic stem cells	<i>S. Typhi</i> , other serovars	i.p.	135, 136, 238
	Rabbit		<i>S. Paratyphi A</i> , very high doses	Orogastric	240
Invasive NTS	Rabbit		<i>S. Enteritidis</i>	i.p.	241
Gastroenteritis	Mouse	Streptomycin treatment, knockout mice	<i>S. Typhimurium</i> , other serovars	Orogastric	177, 242, 243
	Calf		<i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Dublin</i> , <i>S. Newport</i>	Orogastric	244, 245, 246
	Rhesus macaques		<i>S. Typhimurium</i>	Orogastric	247

ifications (*Rag2*^{-/-} γ c^{-/-} or nonobese diabetic [NOD]-scid *IL2R* γ ^{null} [NSG]), mice develop, respectively, either nonacute typhoid fever (135) or a human-like enteric fever after infection by *S. Typhi* (136). Persisting drawbacks of these reconstructed animal models reside in chronic perturbation of lymph node development (137), while the loss of function of the IL-2 receptor decreases the amount of human T cells in the mouse intestine (138). Further improvements will be required to reduce murine immune responses in favor of human immune responses after engraftment of hHSC (139). This has been accomplished by expression of human signal regulatory protein α in mice or the use of neutrophil cytosolic factor 1 mutant mice (140). A broader distribution of human immune cells in mouse tissues occurs following administration of human IL-3 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Along this line, a recent model of transgenic NSG mice expressing human stem cell factor, GM-CSF, and IL-3 allows generation of higher levels of antigen-specific IgM and IgG than in parent NSG mice (141).

Recent Developments in Human Vaccination

Studies on several engineered derivatives of existing vaccines have been carried out to improve the effectiveness and spectrum of action on one hand and to limit deleterious adverse effects, including bacterial reversion, toxicity, and reactogenicity, on the other hand (142). Advances in molecular biology have allowed the design of attenuated mutants preserving adequate immunogenicity while preventing persistent infection. In order to limit undesired reactogenicity, targeted attenuation can be performed with both virulent and metabolic genes (143, 144), resulting in mutations affecting functionality or through complete gene disruption. This has led to the development of several candidate vaccines orally administered and currently tested in phase 2 clinical trials, such as, for example, M01ZH09 (*Ty2*; *aroC ssaV* mutants), CVD909 (*aroC aroD htrA* mutants), and Ty800 (*phoP phoQ* mutants) (145, 146). All mutants are based on the parent *Ty2* strain, with the CVD909 engineered in such a way that it constitutively expresses the Vi capsule, whose expression is otherwise lost in most live attenuated *Salmonella* mutants. CVD909 was shown to promote bacterial opsonophagocytosis thanks to IgG antibodies specific for *S. Typhi* O Ag in LPS (147). Furthermore, increases of IFN- γ -secreting CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells are found after oral administration of the attenuated CVD909 *S. Typhi* vaccine in humans (148).

Given the increasing prevalence of *S. Paratyphi A*-dependent illness, efforts have been dedicated to the development of the so-called SPADD01 (*aroC yncD* mutants) vaccine against this serovar (149, 150). After intranasal immunization, strong protection

of mice against *S. Paratyphi A*, but not against control *S. Typhi*, is observed. The selected examples above argue for a real potential of live attenuated vaccines, as they provide both attenuation and biological containment *in vivo* but with a residual risk of reversion.

Due to its intrinsic nature, the existing pure polysaccharide Vi CPS vaccine triggers only T cell-independent immune responses and low-affinity antibodies. To overcome this limitation, several studies have been performed with a conjugate that combines the sugar unit with a carrier protein in order to ensure conversion of the Ag into a trigger for T cell-dependent immune reactivity. This has led to the identification of tetanus toxin (TT), diphtheria toxin (DT), the nontoxic recombinant form of DT (CRM197), the recombinant carrier protein exoprotein A (rEPA) from *Pseudomonas aeruginosa*, and the *Streptococcus pneumoniae* surface protein A (PspA) as valuable carriers. Successful clinical trials with the Vi rEPA vaccine, notably in young children (90% of patients were protected against *S. Typhi*), has resulted in its licensing in China (151). Similarly, Vi TT is already licensed in India. More recently, a phase 2 trial conducted on infants (6 to 8 weeks), children (<59 months), and adults with Vi CRM197 has shown much higher immunogenicity than Vi CPS, and Vi CRM197 appears to be safe (152). In addition to enabling a T cell response, conjugation of PspA with the Vi capsule has been reported to provide protection against both *Salmonella* and *Streptococcus* (153).

In conclusion, novel vaccine candidates based on evolution/engineering from existing vaccines are emerging thanks to the refined dissection of the mechanisms involved in bacterial pathogenesis and immunity to infection. Due to good efficacy, two recently developed vaccine formulations, namely, Vi rEPA and Vi TT, are already licensed, with many others still under evaluation in preclinical trials (146, 154). Of note, although most of the TS vaccines that are licensed or under development are based on the Vi capsule, only *S. Typhi* and *S. Paratyphi B* display this Ag. However, the fact that although *S. Typhi* and *S. Paratyphi A* differ in their overall genome, they carry 172 common genes leaves the door open to the identification of protective Ags covering a less restricted spectrum of serovars.

Vaccines Against NTS: Difficulties and Ongoing Efforts

Because of the lack of similarity between TS and NTS strains, the design of vaccines targeting NTS has not benefited from the knowledge acquired during the development of TS vaccines. In a seminal study, the auxotrophic *aroA* *S. Typhimurium* attenuated mutant was shown to protect mice against virulent *S. Typhimurium* (155) and *S. Enteritidis* (156). This mutant, by maintaining immunostimulation, has been shown in addition to serve as a powerful live vaccine carrier (157–159). However, the observation that administration of the *aroA* mutant to immunocompromised mice makes them severely sick has called into question its appropriateness and safety for human application (86, 160). This has made mandatory the *de novo* development of specific NTS multivalent vaccines, such as, for example, by evaluating alternative attenuated mutants from *S. Typhimurium* strains (161). Incorporation of phosphatase genes in the genome of *S. Typhimurium* reduces phosphorylation of lipid A, results in attenuation in mice, and increases sensitivity to bile (162), yet it preserves their capacity to induce adaptive immunity to *Salmonella* Ags after oral administration. Such mutants synthesizing the nonphosphorylated lipid A may be useful to develop *Salmonella* subunit vaccines, such as those based on Omps, outer membrane vesicles (Omv), and heterologous polysaccharides (162). Moreover, a method relying on the arabinose-dependent P_{BAD} promoter has been developed to progressively suppress genes involved in *S. Typhimurium*-induced disease symptoms (163). This results in decreased reactivity after administration of live *Salmonella*. For vaccine design, strains with this deficiency in essential virulence factors retain the same ability as WT *Salmonella* to colonize lymphoid tissues, a feature required to elicit efficient immune responses. Other attenuated strains, such as CVD1921 (*S. Typhimurium guaBA clpP* mutants) and CVD1941 (*S. Enteritidis guaBA clpP* mutants) have been tested in mice and show

promising results, as exemplified by functional antibody responses protecting against challenge by virulent strains (164). Along the same line, immunization with the attenuated *S. Enteritidis* strain Δ XII, which is not able to synthesize the secondary messenger bis-(3-5)-cyclic dimeric GMP, induces antibody production and cytokine-secreting CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with protection against virulent *S. Typhimurium* (165). However, one of the drawbacks of attenuated mutants is that they do not trigger the same qualitative and quantitative immune response profile as the parent strain, requiring detailed evaluation of each vaccine candidate (166).

As mentioned above, the serovars differ from each other through the combination of the two H (flagellar) and O (somatic) Ags they display at the bacterial surface. Thus, a second approach would consist of designing vaccines based on such Ags in order to specifically protect against a particular serovar. Immunization with attenuated *S. Typhimurium* BRD509 simultaneously expressing FliC and FljB H Ags enhances NF- κ B-dependent activation of cytokine production and confers protection against a lethal challenge with virulent strain SL1344 in mice (167). However, differential expression of FljB and FliC (flagellar phase variation) occurs during *Salmonella* infection, further complicating the recognition of H Ags by the immune system (168). In contrast, the O Ag continuously present on LPS makes it a candidate for inclusion in a vaccine. As discussed above, because the O Ag generates only a T cell-independent antibody response, coupling to a carrier protein is required to provide optimal protection against *S. Typhimurium* (169). Mouse immunization with the *S. Typhimurium* O Ag-CRM197 glycoconjugate vaccine induces O:4-specific antibodies (IgG, IgA isotypes) exerting protective functions in *in vitro* and *in vivo* assays (170). Fusion of H Ags with O Ags of *S. Enteritidis* induces a IgG response and protection against *S. Enteritidis* (171, 172). Polysaccharide O:2 Ag from *S. Paratyphi* A coupled with the CRM197 protein yielded immunogenic conjugates with strong serum bactericidal activity (173). However, the high diversity of these proteins between *Salmonella* strains, as reflected by the fact that they are used in the strain-related classification of the bacteria (42), remains a drawback for the design of a multivalent vaccine. Thus, even though such Ags trigger an adaptive immune response when coupled with other proteins, their low degree of conservation between the different serovars decreases their relevance as potent vaccine candidates.

Vaccination against NTS is focused mainly on *S. Typhimurium*, and even if some studies yield promising results, no vaccine is in a late trial phase to date (146). However, other strains, such as *S. Enteritidis* or strains from the serogroups O:6,7,8 (the major gastroenteritis-causing group in the United States), would deserve more attention for human vaccine development (11). Another parameter to integrate, the nature of the adjuvant in a vaccine formulation, is almost as important as the Ag. In this respect, mice infected with the *S. Typhimurium* MC1 virulent strain expressing the *S. Typhi* typhoid toxin unexpectedly exhibit better survival and reduced inflammatory intestinal responses, resulting in long-term persistence in asymptomatic carriers compared to mice infected with the parent WT strain (174). This suggests that adjuvantization of NTS vaccines with the typhoid toxin produced by *S. Typhi* may be considered in vaccine formulations targeting different serovars of *Salmonella* (175).

Animal Models To Address Vaccine Design against Human NTS

Even though a broad range of species can be infected by NTS strains, only a few can serve as relevant animal models for human gastroenteritis (133) (Table 1). The streptomycin-pretreated mouse model serving as a surrogate of *Salmonella*-induced colitis in humans, when tested with *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* serovars, proved to be a valuable tool for evaluating virulence factors involved in enteropathogenesis (176). The model was also valid to assess *S. Typhimurium* attenuated mutant strains as potential live vaccines (177). In the search for new animal models recapitulating infection in human, cattle are also considered a pertinent counterpart for nontyphoidal salmonellosis (178), as the same symptoms as for foodborne gastroenteritis in patients are induced (179).

Moreover, as natural NTS infection induces illness in rearing animals, these animals can be considered not only as research models but also as vaccination targets in order to increase yields of production and to indirectly impede human contamination. For similar reasons, pigs are also an interesting species for the development of a vaccine against *Salmonella* (180). For example, parenteral administration of the attenuated *S. Typhimurium* strain Δ znuABC protects pigs (181). The close relationship between the intestinal immune systems in pigs and humans suggests that results obtained in either organism can be transferred to the other. In poultry, a vaccine composed of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* SPI-1 mutants cross-protects against the two strains (182) and when a low-dose challenge is administered after oral immunization (183). The *S. Enteritidis*-based attenuated vaccine JOL919 provides protection early in development by preventing egg contamination (184) via the presence of higher antibody and T cell responses in orally infected chickens.

SALMONELLA ANTIGENS AND THEIR USE IN VACCINE FORMULATIONS

In order to mediate neutralization or elimination of pathogens by opsonization or via the classical complement pathway, targeted Ags must be specifically recognized by antibodies. This is a valid approach when dealing with extracellular pathogens. However, in the case of intracellular pathogens, such as *Salmonella*, this strategy will be partially impaired by the presence of the bacteria mostly within host cells during infection. The microorganism should be recognized by antibodies, e.g., in the gut lumen, to prevent pathogen entry and should be presented by infected cells to promote T cell-mediated elimination. Although precise criteria for the selection of candidate Ags to be included in anti-*Salmonella* vaccines have to be carefully defined, some key parameters have emerged experimentally (185). Among the many Ags expressed in infected host tissues, surface-associated or secreted ones displaying high levels of expression should be favored. In addition, in order to broaden the vaccine coverage, focusing on Ags conserved between serovars would be an asset. However, one has to keep in mind that the context-dependent expression of different *Salmonella* Ags during infection is an additional crucial issue to consider. As mentioned above, the FljB and FliC flagellar components are only transiently expressed early during infection (168, 186). Possibly, the presence of the Vi capsule in *S. Typhi* may also impair the proper recognition of some Ags by covering the cell surface of the bacterium. Temporal mutations observed in the genome of a particular serovar and intrinsic differences between serovars may further complicate the development of a multivalent vaccine (187, 188).

Some Ags may have intrinsic adverse effects on immunity which impede their use as a vaccine. *Salmonella* has been shown to alter immunity through multiple processes: (i) the SptP protein blocks Syk activation in mast cells, leading to suppressed degranulation of local mast cells and resulting in poor neutrophil recruitment at the site of infection (189); (ii) Ssel inhibits migration of DCs and thus decreases Ag presentation at sites of immune induction (190); (iii) L-asparaginase II (191) and Vi capsule (130) suppress T cell early activation signaling pathways and effector functions; (iv) TviA protein decreases flagellin expression (192) and therefore specific recognition by CD4⁺ T cells; and (v) overexpression of the inhibitory molecule PD-1 interferes with the elimination of infected APCs by cytotoxic CD8⁺ T cells (193). Moreover, *Salmonella* effector proteins expressed by SPI-2 can alter both T cell and B cell responses (194).

In order to induce robust protective immune responses as this occurs during a natural infection, and in particular when an antibody-mediated effect is required, it makes sense to hypothesize that antigenic structures displayed on the surface of pathogens are the most appropriate candidates for vaccine engineering. In a recently published study, as many as 37 *Salmonella* Ags have been examined in a mouse typhoid fever model for their intrinsic capacity to trigger specific immune responses and provide protection. Remarkably, all immunogenic and protective Ags turned out to be surface exposed (195). Along the same line, screening of *S. Typhimurium* Ags able to be presented by mouse DCs suggests additional candidates for a vaccine (196).

Specific recognition of several *Salmonella*-derived recombinant proteins by IgG from infected patients has allowed the identification of a panel of relevant surface Ags (197, 198). Many of them demonstrate some degree of protection in a mouse model of infection (185). Such a feature suggests that interspecies validation for Ag identification represents a plausible approach that should not be overlooked (Table 2). Further investigation may identify one or more secreted Ags capable of inducing a different or more efficient protective immune response. To support this point, subcutaneous (s.c.) immunization of mice with supernatant isolated from *S. Typhimurium* adjuvanted with TiterMax Gold adjuvant increases survival after *Salmonella* infection in comparison with that for phosphate-buffered saline (PBS)-immunized mice (199). This is associated with a decrease of the bacterial load in spleen and liver and a *Salmonella*-specific IgA/IgG response. Deciphering the nature of other unknown proteins in culture supernatant is another valid way to increase the number and the diversity of efficient *Salmonella* Ags.

Specifically, SseB and different Omp family members have been described as potential vaccine candidates in mice (200–202). SseB is also immunogenic in humans; indeed, SseB-specific CD4⁺ T cells producing IFN- γ are detected in the circulation of asymptomatic individuals or people previously exposed to *S. Typhi* (203). Interestingly, Omvs and SseB are highly conserved among strains and could be used in vaccines covering a large array of *Salmonella* infections. *S. Typhimurium*-derived Omvs containing LPS and Omvs known to serve as adjuvant are able to induce cross-protection against *S. Choleraesuis* and *S. Enteritidis* challenge (204, 205). In the search of a multiprotective Ag, nasal immunization of mice with the enterobactin (a siderophore involved in iron acquisition by the bacteria and fungi) of *Salmonella* coupled with the immunogenic carrier protein cholera toxin subunit B induced a decrease of systemic invasion together with an increase of specific IgA (206).

Hitherto poorly explored avenues deserve consideration for future developments: (i) precise determination of the immune signature induced by an Ag is a key step in vaccine formulation, as exemplified by the observation that among two promising candidates such as SseI and FliC, only SseI induced a Th1-dependent protection in mice after s.c. immunization (87); (ii) because it is rather uncommon that a comprehensive coverage of the panel of immune responses (inflammatory cytokines, antibodies, and T cells) is provided in work dealing with the protective effect of vaccine formulations, efforts at homogenizing readouts will be warranted; and (iii) studies that examine candidate Ags in different models and under different experimental conditions (schedule, doses, adjuvants, and *Salmonella* strains) (85, 92) preclude comparison of efficacy between vaccination protocols (Table 2). In addition to the drawbacks described above, the potential toxicity of bacterial Ag proteins prevents their use as such and requires that they are prepared as recombinant truncated derivatives possibly lacking crucial epitopes. Moreover, systemic immunization, performed in the vast majority of protocols, may not be the best route for assessing the mucosal contribution of a vaccine candidate supposed to target *Salmonella* infecting along the oral route.

Given the complex nature of the immune response that needs to be elicited to clear *Salmonella* infection, the challenging issue is to select the most adapted Ag, or a combination thereof, for incorporation in the vaccine formulation. Immunogenicity (i.e., breadth and persistence of induced immunity) has to be boosted to achieve the induction of the most relevant immune response profile and at the same time to reduce excessive reactivity. In this context, a combination of the most appropriate Ags (195, 198) and vaccine vectors must be thoroughly evaluated. The strategy for vaccine design must ideally include the selective delivery to sites of induction ensuring local immune responses, i.e., GALT in the case of enteropathogen-triggered infection.

DELIVERY VEHICLES FOR MUCOSAL VACCINATION

In addition to being relatively easy to administer, mucosal vaccines allow the elicitation, in most instances, of both a local mucosal and a more disseminated systemic immune response via a mechanism referred to as the common mucosal immune

TABLE 2 Characteristics of *Salmonella* antigens used in vaccination studies

Ag	Type of molecule (mass, kDa)	Function	Administration	Protection	Immune response(s)	Reference(s)
SseB	Protein from EspA superfamily (21.5), encoded by <i>Salmonella</i> pathogenic island 2 and weakly bound to the bacterial cell surface	Constituent of T3SS	Footpad injection of rSseB or SseB peptides + TiterMax Gold adjuvant (HLA-DR transgenic murine model) Culture of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors or exposed donors with 10 ⁴ CFU of <i>S. Typhi</i> (human <i>ex vivo</i> model) i.v. injection of rSseB and LPS with or without alum and oral <i>Salmonella</i> challenge (murine model) s.c. injection of rSseB in complete Freund's adjuvant and oral <i>Salmonella</i> challenge (murine model)	Not tested Not tested Decrease of bacterial burden in spleen and liver and increase of survival Increase of mouse survival	CD4 ⁺ T cell-dependent IFN- γ response for SseB and peptides CD4 ⁺ T cell-dependent IFN- γ response for SseB	203 203
SseI	Effector protein (36.8), also called SrfH, translocated by T3SS in host cytoplasm	Inhibits migration of primary macrophages/DCs	s.c. injection of peptide SseI268–280 with complete Freund's adjuvant (murine model)	Decrease of bacterial burden in spleen and liver and increase of survival Not tested	No IgM or IgG secretion; Th1 response (IFN- γ , TNF- α , IL-2)	87, 190
OmpA	Outer membrane protein (35.5)	Constituent of porin	Culture of murine DCs with rOmpA and coculture or not with CD4 ⁺ T cells (<i>in vitro</i> model)	Not tested	DC activation (IL-12) by TLR; polarization toward Th1 response (IFN- γ)	248
OmpC	Outer membrane protein (39.2)	Constituent of porin	i.p. injection of protein purified from WT <i>S. Typhi</i> (murine model) i.p. injection of protein purified from WT <i>S. Typhi</i> (murine model); s.c. vaccinated with porins (humans)	Bactericidal complement-mediated effect Not tested	Long-term persistence of IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 antibodies Sustained IgG and IgM antibodies, CD4 ⁺ T cell (IFN- γ) responses in mice; long-lasting IgM response in humans	249 85
OmpD	Outer membrane protein (37.6)	Constituent of porin	i.p. injection of protein purified from WT <i>S. Typhi</i> (murine model)	Not tested	B cell/DC activation. IgG1, IgG2b/c, IgG3, and IgM secretion	250
OmpF	Outer membrane protein (37.8)	Constituent of porin	i.p. injection of porins purified from WT <i>S. Typhimurium</i> or <i>S. Typhi</i> (murine model) i.p. injection of protein purified from WT <i>S. Typhi</i> (murine model) i.p. injection of protein purified from WT <i>S. Typhi</i> (murine model); s.c. vaccinated with porins (humans)	Decrease of burden in blood, spleen, and liver Bactericidal complement-mediated effect Not tested	Specific IgM responses against porins and OmpD; B1b cell activation Long-term persistence of IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 antibodies Sustained IgG and IgM antibodies, CD4 ⁺ T cell (IFN- γ) responses in mice; long-lasting IgM response in humans	92 249 85
OmpL	Outer membrane protein (25)	Constituent of porin	i.p. injection of protein purified from WT <i>S. Typhi</i> (murine model) i.p. injection of recombinant OmpL with complete Freund's adjuvant (murine model)	Not tested Decrease of bacterial burden in spleen and liver and increase of mouse survival; bactericidal effect against <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Typhi</i> and <i>S. Paratyphi</i>	B cell/DC activation; IgG1, IgG2b/c, IgG3, and IgM secretion Serum TNF- α and specific IgG and IgA secretion	250 251
SopB	Effector protein (62), translocated by T3SS into host cytoplasm	Differentiation of epithelial cells into M cells to promote <i>Salmonella</i> invasion	i.p. injection of attenuated <i>S. Typhimurium</i> followed by recombinant truncated SopB coupled with nanoparticle (murine model)	Decrease of bacterial burden in MLNs, liver, and spleen	CD4 ⁺ T cell proliferation and secretion of IFN- γ and IL-2	51, 252

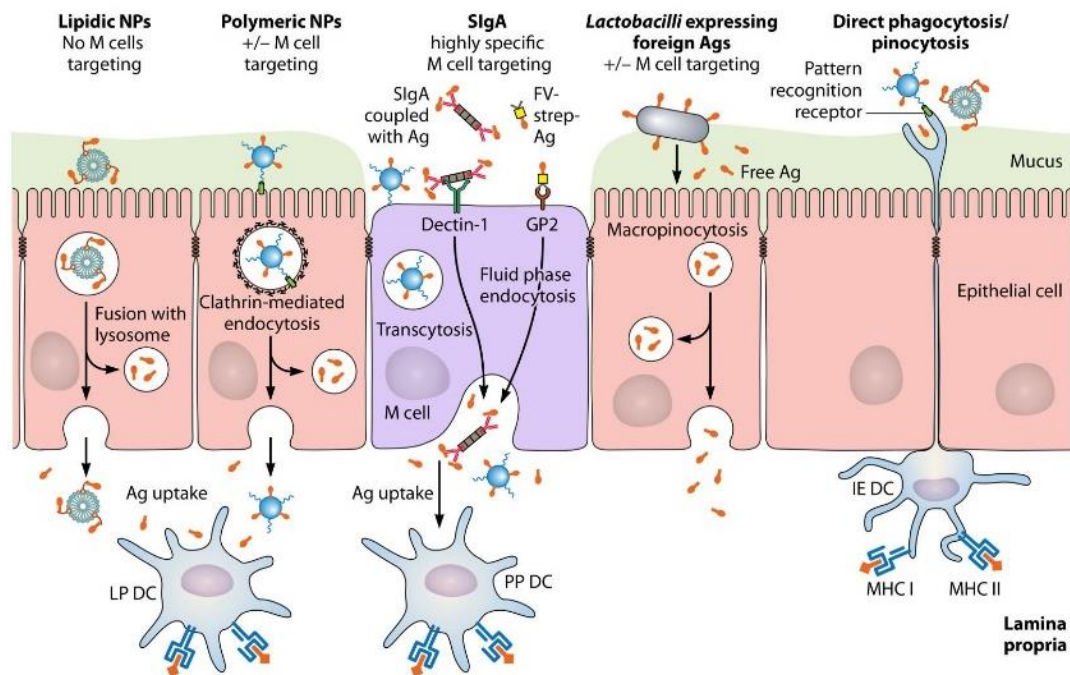


FIG 2 Vaccine delivery systems for oral administration of antigens in the gut. Carriers are able to target epithelial cells, microfold (M) cells, and intraepithelial dendritic cells (DCs) specialized in sampling of particulate formulations. The underlying uptake mechanisms include phagocytosis, clathrin-mediated endocytosis, fluid-phase endocytosis, and macropinocytosis. Transport of the intact or partially degraded formulations across the epithelial layer via M cells or enterocytes results in capture and processing by DCs in the mucosal environment. Depending on the delivery system, the antigen may be released in the lamina propria as a free species or in association with the vector. Information regarding maturation of Ag-presenting cells, T cell activation, systemic and mucosal antibody production, and cytokine secretion, as well as additional examples (not shown to avoid encumbering the figure), are provided in the text. Abbreviations: IE DC, intraepithelial dendritic cell; LP DC, DC located in the lamina propria; PP DC, DC located in the subepithelial dome region of Peyer's patches; Ag, antigen; NP, nanoparticles; MHC I and II, major histocompatibility complex molecules I and II. The figure is not drawn to scale.

system (207–209). This is of interest for *Salmonella* since the bacterium initially infects the intestinal mucosa and, when not restrained, propagates and persists in the systemic environment. This implies that a vaccine stimulating the protective mechanisms of the mucosal compartment would be highly relevant, as it is expected to block the infectious agent at its site of entry (210). Moreover, through the extensive knowledge acquired on the cellular and molecular players involved in GI immunity, evaluation of the adequacy of the induced immune response is facilitated. However, to prove efficacious, oral vaccination requires that several hurdles are overcome, including (i) intrinsic weak Ag stability in the protease-rich gut environment, (ii) dilution and dispersal along the large surface area of the gut, (iii) the need for an appropriate dose of Ag to induce protective immune responses and not tolerance, (iv) crossing of the mucus layer, and (v) the possible cytotoxicity of the Ag. While these constraining features have favored the development of formulations for systemic administration, recent studies provide strong arguments to envisage the design of more efficient delivery solutions to facilitate the development of improved mucosal vaccines for infectious enteric diseases. Examples of Ag delivery strategies currently under development are depicted in Fig. 2.

A major site for eliciting gut immune responses directed against *Salmonella* is PPs in the small intestine. However, the presence of digestive enzymes and acidic conditions in the GI tract may affect the integrity of the Ag and prevent optimal detection by the immune system. Stability issues can be overcome by preparing derivatives via Ag glycosylation (211) or lipidation of immunogenic peptides (212). Limited degradation of the cholera toxin B subunit expressed in rice seeds ensures its proper uptake by M cells and the onset of specific systemic IgG and mucosal IgA antibodies (213). Spores of *Lycopodium clavatum* using a “natural” Ag-containing envelope have been shown to

maintain ovalbumin integrity and to trigger a specific mucosal immune response characterized by secretion of both IgG and IgA (214). Successful engineering of spherical nanoparticles (NPs) able to transport and compartmentalize the encapsulated Ag at different sites in the small and large intestine has also been reported (215). Intranasal immunization of mice with SseB linked to gas-filled lipid microbubbles induces specific mucosal and systemic antibody and T cell responses associated with reduced infection upon oral challenge by *S. Typhimurium* (216). As only small doses of the SseB Ag are given along the nasal route, it is expected that oral administration will be operational as well. Oral administration of an antimicrobial peptide encapsulated in NPs also increases both bacterial killing in the liver and the intestine and mouse survival after *S. Typhimurium* infection, compared to the peptide given alone (217). In light of the identification of protective Ags, one can anticipate that similar stabilization and efficacious delivery systems are worth testing as novel vaccine tools targeting *Salmonella*.

GALT immune responses are elicited with the aim to discriminate between harmless and noxious Ags, triggering either tolerance or protective immunity. As a function of its nature, it happens that oral administration of a pathogen-derived Ag as such can induce a tolerogenic response only. To compensate for this drawback in a vaccination process, the solution consists of adding an adjuvant-linked danger signal to the vaccine formulation. Incorporation of killed/inactivated whole cells, proteins, peptides, or DNA has been successfully accomplished, yet features such as loading efficiency, pH sensitivity, and cell targeting are in need of improvement. A number of systems, including micro- and nanoparticles, lipid-based strategies, and enteric capsules, have significant potential either alone or in advanced combined formulations to enhance intestinal immune responses (218). For example, mucosal delivery of charge-switching synthetic NPs containing encapsulated monophosphoryl lipid A (MPLA) and coated with inactivated *Chlamydia trachomatis* leads to a specific protective and long-lasting Th1 response in mice (219). Poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) particles are NPs which can be engineered to either display the Ag at the surface of the polymer or encapsulate the Ag and the adjuvant in the inside of the matrix (220). Encapsulation of NOD-1 and NOD-2 ligands, followed by adsorption of the HIV-1 p24 gag protein in PLA NPs, yields a vaccine formulation able to induce human monocyte-derived DC activation and T cell proliferation *in vitro* and a p24-specific mucosal and systemic IgA and IgG secretion after oral mouse immunization (221). In the context of *S. Typhi* Omps, encapsulation in PLGA beads increases specific B cell responses in PPs and MLNs of orally immunized mice compared to Omps alone, suggesting the versatility of this delivery system (222). Outside chemically based delivery systems, viral and bacterial Ags expressed in safe natural carriers such as probiotic strains generate specific local and systemic protective immunity observed in case of *S. Typhimurium* infection in mice when fed orally (223–226). Another manner to contribute to the good delivery of Ags in the intestinal mucosa would consist of orally coadministering the vaccine formulation with the protease inhibitor U-Omp19 from *Brucella*, which has been shown both to increase the half-life of Ags delivered along the GI tract and to activate APCs (227). Recently, NPs have been formulated to overcome the challenging environment encountered along the oral route of administration; such a formulation called single multiple pill (SmPill) combines whole-cell killed *Escherichia coli* overexpressing the colonization factor Ag I in a dispersed phase, α -galactosylceramide as an adjuvant, and a polymer coating preventing gastric degradation (228). Specific mucosal IgA and systemic IgG responses are obtained, yet protection against *E. coli* was not assessed. It is important to note that even if NPs display many features of valuable carriers, side effects, including dysbiosis or allergies (229), have been occasionally observed after delivery in the gut environment.

As mentioned above, targeting of PPs is essential both to induce an efficient mucosal immune response and to decrease the amount of Ag to be delivered. In this respect, investigation of M cells via recently identified specific receptors is of high interest, as the vaccine vector can be designed to combine properties of a potent

ligand and a shield for the antigenic structure. For example, mouse oral immunization with *Salmonella*-derived proteins hooked to an anti-GP2 monoclonal antibody (230) induced specific fecal SIgA secretion and associated protection against *Salmonella* without the need for an adjuvant. The high stability of SIgA molecules in the gut, their propensity to reverse transcytosis across M cells via the dectin-1 receptor (114), and the *a priori* nonrequirement of adjuvantization to mount immune responses against the bound Ag (231) mark the antibody as a potentially valuable protein carrier in the mucosal context. In a similar approach, a preparation of HIV p24gag covalently bound to SIgA, when administered orally together or not with heat-labile enterotoxin, exhibited p24-specific mucosal and systemic immune responses resulting in mouse protection after rectal challenge with a recombinant vaccinia virus expressing the gag protein (232). The same vaccine formulation used for mouse nasal immunization allowed similar induction of protective immunity against mucosal challenge by the p24-expressing vaccinia virus (233). Because intestinal specific IgA responses appear to decrease with the age of an individual, yet this does not occur in nasopharyngeally associated lymphoid tissue (234), both routes of mucosal administration deserve to be evaluated as a function of the foreseen sustained protection. Although not systematically implementable in humans, but remaining of high value in the veterinary field, novel mucosa-targeting immunization methods deserve further attention. For example, pretreatment of mice with RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand), which has been shown to increase the proportion of GP2⁺ M cells in PPs and thus transcytosis of microparticulated Ags, increases both serum Ag-specific IgG and fecal Ag-specific IgA in comparison with those in naive animals (235).

Thus, oral (and more generally mucosal) vaccination remains a current challenge, which is in need of further developments based on numerous promising results, most obtained in animal studies and thus requiring further evaluation in humans. In addition to resolving important safety issues, the strategy of targeting mucosal surfaces represents the most optimal approach to fulfill the essential requirement that both mucosal and systemic immune protection can be achieved and thus to ensure that invasive bacteria are neutralized at their site of entry and later on if they have breached the mucosal barrier (218). Once essential aspects, including the stability of the Ag, the adjuvantization, and mucosal targeting, are guaranteed, it is not exaggerating to envisage that the oral route of administration will offer results at least similar to, if not better than, those of the systemic mode of administration for vaccine preparations targeting enteropathogens. The various novel and promising approaches described above all deserve to be addressed in the context of *Salmonella* vaccination studies to eventually permit delivery of a vaccine to the at-risk population, i.e., young infants.

CONCLUSION

The main strains of *Salmonella* infect a broad range of animal hosts, inducing a high morbidity and mortality, especially in young human children after ingestion of contaminated food. The emergence of MDR strains requires definition of a vaccine strategy against the broader possible range of *Salmonella* strains. However, this species is a complex intracellular pathogen exquisitely adapted to its host, in particular to the intestinal epithelium. It is well established that *Salmonella* successfully crosses the mucosal barrier through M cells and uses the GALT immune pathway to infect the host. Although a relatively efficient immune response is triggered after *Salmonella* recognition, the organisms spread and persist in the host via multiple escape mechanisms. The understanding of immune responses against *Salmonella* species will allow the selection of appropriate Ags and adjuvants, with the aim to induce protective Th1 T cell responses and to promote specific B cell activation in both the mucosal and systemic compartments. The establishment of a memory T and B cell immune response is another requirement to validate the relevance of any vaccine candidate. However, in addition to the unsolved issue that neither animal models nor administration methods are standardized, a vaccine targeting the main serovars remains a technical challenge, mostly because multiple antigenic structures/subunits will likely have to be assembled

- J, Wilson RK. 2004. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet* 36:1268–1274. <https://doi.org/10.1038/ng1470>.
20. Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F. 2010. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* 305:1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x>.
 21. Onwuezobe IA, Oshun PO, Odigwe CC. 2012. Antimicrobials for treating symptomatic non-typhoidal *Salmonella* infection. *Cochrane Database Syst Rev* 11:CD001167.
 22. Mather AE, Reid SW, Maskell DJ, Parkhill J, Fookes MC, Harris SR, Brown DJ, Coia JE, Mulvey MR, Gilmour MW, Petrovska L, de Pinna E, Kuroda M, Akiba M, Izumiya H, Connor TR, Suchard MA, Lemey P, Mellor DJ, Haydon DT, Thomson NR. 2013. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts. *Science* 341:1514–1517. <https://doi.org/10.1126/science.1240578>.
 23. Kariuki S, Gordon MA, Feasey N, Parry CM. 2015. Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease. *Vaccine* 33(Suppl 3):C21–C29. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.102>.
 24. Wang Y, Yang B, Wu Y, Zhang Z, Meng X, Xi M, Wang X, Xia X, Shi X, Wang D, Meng J. 2015. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on retail raw poultry in six provinces and two National cities in China. *Food Microbiol* 46:74–80. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.012>.
 25. Rahman BA, Wasfy MO, Maksoud MA, Hanna N, Dueger E, House B. 2014. Multi-drug resistance and reduced susceptibility to ciprofloxacin among *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from the Middle East and Central Asia. *New Microbes New Infect* 2:88–92. <https://doi.org/10.1002/nmi.246>.
 26. Chiou CS, Lauderdale TL, Phung DC, Watanabe H, Kuo JC, Wang PJ, Liu YY, Liang SY, Chen PC. 2014. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from Bangladesh, Indonesia, Taiwan, and Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 58:6501–6507. <https://doi.org/10.1128/AAC.03608-14>.
 27. Wirth T. 2015. Massive lineage replacements and cryptic outbreaks of *Salmonella* Typhi in eastern and southern Africa. *Nat Genet* 47:565–567. <https://doi.org/10.1038/ng.3318>.
 28. Kobayashi T, Hayakawa K, Mawatari M, Mezaki K, Takeshita N, Kutsuna S, Fujiya Y, Kanagawa S, Ohmagari N, Kato Y, Morita M. 2014. Case report: failure under azithromycin treatment in a case of bacteremia due to *Salmonella enterica* Paratyphi A. *BMC Infect Dis* 14:404. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-404>.
 29. Arnoldini M, Vizcarra IA, Pena-Miller R, Stocker N, Diard M, Vogel V, Beardmore RE, Hardt WD, Ackermann M. 2014. Bistable expression of virulence genes in *Salmonella* leads to the formation of an antibiotic-tolerant subpopulation. *PLoS Biol* 12:e1001928. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001928>.
 30. Claudi B, Sprote P, Chirkova A, Personnic N, Zankl J, Schurmann N, Schmidt A, Bumann D. 2014. Phenotypic variation of *Salmonella* in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. *Cell* 158:722–733. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.045>.
 31. Colobatiu L, Tabaran A, Flonta M, Oniga O, Mirel S, Mihaiu M. 2015. First description of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and beta-lactamase encoding genes in non-typhoidal *Salmonella* isolated from humans, one companion animal and food in Romania. *Gut Pathog* 7:16. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0063-3>.
 32. Wong VK, Baker S, Pickard DJ, Parkhill J, Page AJ, Feasey NA, Kingsley RA, Thomson NR, Keane JA, Weill FX, Edwards DJ, Hawkey J, Harris SR, Mather AE, Cain AK, Hadfield J, Hart PJ, Thieu NT, Klemm EJ, Glinos DA, Breiman RF, Watson CH, Kariuki S, Gordon MA, Heyderman RS, Okoro C, Jacobs J, Lunguya O, Edmunds WJ, Msefula C, Chabalgoity JA, Kama M, Jenkins K, Dutta S, Marks F, Campos J, Thompson C, Obaro S, MacLennan CA, Dolecek C, Keddy KH, Smith AM, Parry CM, Karkey A, Mulholland EK, Campbell JI, Dongol S, Basnyat B, Dufour M, Bandaranayake D, et al. 2015. Phylogeographical analysis of the dominant multidrug-resistant H58 clade of *Salmonella* Typhi identifies inter- and intracontinental transmission events. *Nat Genet* 47:632–639. <https://doi.org/10.1038/ng.3281>.
 33. Baker S, Karkey A, Parry C. 2014. Are we adequately prepared for the emergence of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A? *Lancet Global Health* 2:e195–e196. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70009-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70009-9).
 34. Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeisen J. 2013. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:582–607. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-13>.
 35. de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. 2012. Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis. *PLoS Pathog* 8:e1002933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002933>.
 36. Sansonetti PJ. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 4:953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1499>.
 37. Lee SJ, McLachlan JB, Kurtz JR, Fan D, Winter SE, Baumler AJ, Jenkins MK, McSorley SJ. 2012. Temporal expression of bacterial proteins instructs host CD4 T cell expansion and Th17 development. *PLoS Pathog* 8:e1002499. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002499>.
 38. Ramanan C, Cadwell K. 2016. Intrinsic defense mechanisms of the intestinal epithelium. *Cell Host Microbe* 19:434–441. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.003>.
 39. Johansson ME, Hansson GC. 2016. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* 16:639–649. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>.
 40. Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schutte A, van der Post S, Svensson F, Rodriguez-Pineiro AM, Nystrom EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC. 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunity* 40:8–20. <https://doi.org/10.1016/j.imm.2014.07.012>.
 41. Galan JE, Zhou D. 2000. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8754–8761. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8754>.
 42. Fabrega A, Vila J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26:308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>.
 43. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254–258. <https://doi.org/10.1126/science.1102901>.
 44. Farache J, Koren I, Milo I, Gurevich I, Kim KW, Zigmund E, Furtado GC, Lira SA, Shakhar G. 2013. Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity* 38:581–595. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.009>.
 45. Chieppa M, Rescigno M, Huang AY, Germain RN. 2006. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* 203:2841–2852. <https://doi.org/10.1084/jem.20061884>.
 46. Zhang K, Dupont A, Torow N, Gohde F, Leschner S, Lienenklaus S, Weiss S, Brinkmann MM, Kuhnel M, Hensel M, Fulde M, Hornef MW. 2014. Age-dependent enterocyte invasion and microcolony formation by *Salmonella*. *PLoS Pathog* 10:e1004385. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004385>.
 47. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6:666–677. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.30>.
 48. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Yabashi A, Waguri S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Imura M, Hamura K, Fukuoka S-I, Lowe AW, Itoh K, Kiyono H, Ohno H. 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH-bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462:226–230. <https://doi.org/10.1038/nature08529>.
 49. Rand JH, Wu XX, Lin EY, Griffel A, Gialanella P, McKittrick JC. 2012. Annexin A5 binds to lipopolysaccharide and reduces its endotoxin activity. *mBio* 3:e00292-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00292-11>.
 50. Sierro F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13722–13727. <https://doi.org/10.1073/pnas.241308598>.
 51. Tahoun A, Mahajan S, Paxton E, Malterer G, Donaldson DS, Wang D, Tan A, Gillespie TL, O'Shea M, Roe AJ, Shaw DJ, Gally DL, Lengeling A, Mabbott NA, Haas J, Mahajan A. 2012. *Salmonella* transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe* 12:645–656. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.009>.
 52. Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M. 2014. *Salmonella* host interactions—modulation of the host innate immune system. *Front Immunol* 5:481. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00481>.

53. Keestra-Gounder AM, Tsois RM, Baumler AJ. 2015. Now you see me, now you don't: the interaction of Salmonella with innate immune receptors. *Nat Rev Microbiol* 13:206–216. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3428>.
54. Gilchrist JJ, MacLennan CA, Hill AV. 2015. Genetic susceptibility to invasive Salmonella disease. *Nat Rev Immunol* 15:452–463. <https://doi.org/10.1038/nri3858>.
55. Sivick KE, Arpaia N, Reiner GL, Lee BL, Russell BR, Barton GM. 2014. Toll-like receptor-deficient mice reveal how innate immune signaling influences Salmonella virulence strategies. *Cell Host Microbe* 15:203–213. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.013>.
56. Broz P, Ohlson MB, Monack DM. 2012. Innate immune response to Salmonella Typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut Microbes* 3:62–70. <https://doi.org/10.4161/gmic.19141>.
57. Sturge CR, Benson A, Raetz M, Wilhelm CL, Mirpuri J, Vitetta ES, Yarovsky F. 2013. TLR-independent neutrophil-derived IFN-gamma is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10711–10716. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307868110>.
58. Liang S, Qin X. 2013. Critical role of type I interferon-induced macrophage necroptosis during infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Cell Mol Immunol* 10:99–100. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.68>.
59. McSorley SJ. 2014. Immunity to intestinal pathogens: lessons learned from Salmonella. *Immunol Rev* 260:168–182. <https://doi.org/10.1111/imr.12184>.
60. Santos RL, Raffatellu M, Bevins CL, Adams LG, Tukel C, Tsois RM, Baumler AJ. 2009. Life in the inflamed intestine, Salmonella style. *Trends Microbiol* 17:498–506. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.008>.
61. Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL. 1999. IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and Salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 11:346–351. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)80055-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)80055-7).
62. Blohmke CJ, Darton TC, Jones C, Suarez NM, Waddington CS, Angus B, Zhou L, Hill J, Clare S, Kane L, Mukhopadhyay S, Schreiber F, Duque-Correa MA, Wright JC, Roumeliotis TI, Yu L, Choudhary JS, Mejias A, Ramilo O, Shanyinde M, Szein MB, Kingsley RA, Lockhart S, Levine MM, Lynn DJ, Dougan G, Pollard AJ. 2016. Interferon-driven alterations of the host's amino acid metabolism in the pathogenesis of typhoid fever. *J Exp Med* 213:1061–1077. <https://doi.org/10.1084/jem.20151025>.
63. Koebnick H, Grode L, David JR, Rohde W, Rolph MS, Mittrucker HW, Kaufmann SH. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against Salmonella Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13681–13686. <https://doi.org/10.1073/pnas.212488699>.
64. Kupz A, Scott TA, Belz GT, Andrews DM, Greyer M, Lew AM, Brooks AG, Smyth MJ, Curtiss R, III, Bedoui S, Strugnell RA. 2013. Contribution of Th1+ NK cells to protective IFN-gamma production during Salmonella Typhimurium infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:2252–2257. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222047110>.
65. Arpaia N, Godec J, Lau L, Sivick KE, McLaughlin LM, Jones MB, Dracheva T, Peterson SN, Monack DM, Barton GM. 2011. TLR signaling is required for Salmonella Typhimurium virulence. *Cell* 144:675–688. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.031>.
66. Nishimori JH, Newman TN, Oppong GO, Rapsinski GJ, Yen JH, Biesecker SG, Wilson RP, Butler BP, Winter MG, Tsois RM, Ganea D, Tukel C. 2012. Microbial amyloids induce interleukin 17A (IL-17A) and IL-22 responses via Toll-like receptor 2 activation in the intestinal mucosa. *Infect Immun* 80:4398–4408. <https://doi.org/10.1128/IAI.00911-12>.
67. Bhinder G, Stahl M, Sham HP, Crowley SM, Morampudi V, Dalwadi U, Ma C, Jacobson K, Vallance BA. 2014. Intestinal epithelium-specific MyD88 signaling impacts host susceptibility to infectious colitis by promoting protective goblet cell and antimicrobial responses. *Infect Immun* 82:3753–3763. <https://doi.org/10.1128/IAI.02045-14>.
68. Barr TA, Brown S, Mastroeni P, Gray D. 2009. B cell intrinsic MyD88 signals drive IFN-gamma production from T cells and control switching to IgG2c. *J Immunol* 183:1005–1012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803706>.
69. Wenzel UA, Fernandez-Santoscoy M, Tam MA, Tegtmeyer P, Wick MJ. 2015. Synergy between CD40 and MyD88 does not influence host survival to Salmonella infection. *Front Immunol* 6:460. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00460>.
70. Le Bourhis L, Dusseaux M, Bohineust A, Bessoles S, Martin E, Premel V, Core M, Sleurs D, Serriari NE, Treiner E, Hivroz C, Sansonetti P, Gougeon ML, Soudais C, Lantz O. 2013. MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS Pathog* 9:e1003681. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003681>.
71. Lopez-Sagasetta J, Dulberger CL, McFriedes A, Cushman M, Saghatelian A, Adams EJ. 2013. MAIT recognition of a stimulatory bacterial antigen bound to MR1. *J Immunol* 191:5268–5277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301958>.
72. Ussher JE, Klenerman P, Willberg CB. 2014. Mucosal-associated invariant T-cells: new players in anti-bacterial immunity. *Front Immunol* 5:450. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00450>.
73. Chen Z, Wang H, D'Souza C, Sun S, Kostenko L, Eckle SB, Meehan BS, Jackson DC, Strugnell RA, Cao H, Wang N, Fairlie DP, Liu L, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J, Corbett AJ. 2016. Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after in vivo infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals. *Mucosal Immunol* <https://doi.org/10.1038/mi.2016.39>.
74. Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. 2003. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 4:1230–1237. <https://doi.org/10.1038/ni1002>.
75. Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C 3rd, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. 2005. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434:525–529. <https://doi.org/10.1038/nature03408>.
76. Mixer PF, Camerini V, Stone BJ, Miller VL, Kronenberg M. 1994. Mouse T lymphocytes that express a gamma delta T-cell antigen receptor contribute to resistance to Salmonella infection in vivo. *Infect Immun* 62:4618–4621.
77. Edelblum KL, Singh G, Odenwald MA, Lingaraju A, El Bissati K, McLeod R, Sperling AI, Turner JR. 2015. Gammadelta intraepithelial lymphocyte migration limits transepithelial pathogen invasion and systemic disease in mice. *Gastroenterology* 148:1417–1426. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.02.053>.
78. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM. 2010. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J Exp Med* 207:1745–1755. <https://doi.org/10.1084/jem.20100257>.
79. von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarria-Smith J, Vance RE. 2013. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu Rev Immunol* 31:73–106. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095944>.
80. Coombes JL, Powrie F. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8:435–446. <https://doi.org/10.1038/nri2335>.
81. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, Pabst O. 2009. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* 206:3101–3114. <https://doi.org/10.1084/jem.20091925>.
82. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Forster R, Agace WW. 2005. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 202:1063–1073. <https://doi.org/10.1084/jem.20051100>.
83. Fernandez-Santoscoy M, Wenzel UA, Persson E, Yrild U, Agace W, Wick MJ. 2016. A reduced population of CD103CD11b dendritic cells has a limited impact on oral Salmonella infection. *Immunol Lett* 176:72–80. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.05.012>.
84. Diehl GE, Longman RS, Zhang JX, Breart B, Galan C, Cuesta A, Schwab SR, Littman DR. 2013. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature* 494:116–120. <https://doi.org/10.1038/nature11809>.
85. Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C, Pastelin-Palacios R, Cervantes-Barragan L, Hisaki E, Chai Q, Onder L, Scandella E, Regen T, Waisman A, Isibasi A, Lopez-Macias C, Ludewig B. 2014. IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote generation of protective germinal center-derived IgM+ B cell memory against Salmonella Typhi. *J Immunol* 192:5192–5200. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302526>.
86. Hess J, Ladel C, Miko D, Kaufmann SH. 1996. Salmonella typhimurium aroA – infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol* 156:3321–3326.
87. Kurtz JR, Petersen HE, Frederick DR, Morici LA, McLachlan JB. 2014. Vaccination with a single CD4 T cell peptide epitope from a Salmonella type III-secreted effector protein provides protection against lethal infection. *Infect Immun* 82:2424–2433. <https://doi.org/10.1128/IAI.00052-14>.

88. Lee SJ, Dunmire S, McSorley SJ. 2012. MHC class-I-restricted CD8 T cells play a protective role during primary Salmonella infection. *Immunol Lett* 148:138–143. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.10.009>.
89. van Diepen A, van de Gevel JS, Koudijs MM, Ossendorp F, Beekhuizen H, Janssen R, van Dissel JT. 2005. Gamma irradiation or CD4+T-cell depletion causes reactivation of latent Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in C3H/HeN mice. *Infect Immun* 73:2857–2862. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2857-2862.2005>.
90. Schulz SM, Kohler G, Holscher C, Iwakura Y, Alber G. 2008. IL-17A is produced by Th17, gammadelta T cells and other CD4- lymphocytes during infection with Salmonella enterica serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol* 20:1129–1138. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn069>.
91. Wu SC, Yi PF, Guo X, Zhang LY, Xu DX, Fu YX, Cui ZQ, Shen HQ, Wei XB, Fu BD. 2016. Cinobufagin enhances the protective efficacy of formalin-inactivated Salmonella typhimurium vaccine through Th1 immune response. *Microb Pathog* 99:264–270. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.036>.
92. Gil-Cruz C, Bobat S, Marshall JL, Kingsley RA, Ross EA, Henderson IR, Leyton DL, Coughlan RE, Khan M, Jensen KT, Buckley CD, Dougan G, MacLennan IC, Lopez-Macias C, Cunningham AF. 2009. The porin OmpD from nontyphoidal Salmonella is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9803–9808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812431106>.
93. McSorley SJ, Jenkins MK. 2000. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Infect Immun* 68:3344–3348. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3344-3348.2000>.
94. Marshall JL, Flores-Langarica A, Kingsley RA, Hitchcock JR, Ross EA, Lopez-Macias C, Lakey J, Martin LB, Toellner KM, MacLennan CA, MacLennan IC, Henderson IR, Dougan G, Cunningham AF. 2012. The capsular polysaccharide Vi from Salmonella typhi is a B1b antigen. *J Immunol* 189:5527–5532. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103166>.
95. Barr TA, Brown S, Mastroeni P, Gray D. 2010. TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to Salmonella enterica. *J Immunol* 185:2783–2789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001431>.
96. MacLennan CA, Gondwe EN, Msefula CL, Kingsley RA, Thomson NR, White SA, Goodall M, Pickard DJ, Graham SM, Dougan G, Hart CA, Molyneux ME, Drayson MT. 2008. The neglected role of antibody in protection against bacteremia caused by nontyphoidal strains of Salmonella in African children. *J Clin Invest* 118:1553–1562. <https://doi.org/10.1172/JCI33998>.
97. Wahid R, Simon R, Zafar SJ, Levine MM, Szein MB. 2012. Live oral typhoid vaccine Ty21a induces cross-reactive humoral immune responses against Salmonella enterica serovar Paratyphi A and S. Paratyphi B in humans. *Clin Vaccine Immunol* 19:825–834. <https://doi.org/10.1128/CVI.00058-12>.
98. Toapanta FR, Bernal PJ, Fresnay S, Magder LS, Darton TC, Jones C, Waddington CS, Blohmke CJ, Angus B, Levine MM, Pollard AJ, Szein MB. 2016. Oral challenge with wild-type Salmonella Typhi induces distinct changes in B cell subsets in individuals who develop typhoid disease. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004766. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004766>.
99. de Wit J, Souwer Y, Jorritsma T, Klaasse Bos H, ten Brinke A, Neeffjes J, van Ham SM. 2010. Antigen-specific B cells reactivate an effective cytotoxic T cell response against phagocytosed Salmonella through cross-presentation. *PLoS One* 5:e13016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013016>.
100. Corthésy B. 2010. Role of secretory immunoglobulin A and secretory component in the protection of mucosal surfaces. *Future Microbiol* 5:817–829. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.39>.
101. Corthésy B. 2013. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmun Rev* 12:661–665. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.10.012>.
102. Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. 2014. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev* 260:76–85. <https://doi.org/10.1111/imr.12189>.
103. Macpherson AJ, Koller Y, McCoy KD. 2015. The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA. *Trends Immunol* 36:460–470. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.06.006>.
104. Mantis NJ, Forbes SJ. 2010. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunol Invest* 39:383–406. <https://doi.org/10.3109/08820131003622635>.
105. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. 2011. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 4:603–611. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.41>.
106. Cebra JJ, Schrader CE, Shroff KE, Weinstein PD. 1991. Are Peyer's patch germinal centre reactions different from those occurring in other lymphoid tissues? *Res Immunol* 142:222–226. [https://doi.org/10.1016/0923-2494\(91\)90063-O](https://doi.org/10.1016/0923-2494(91)90063-O).
107. Michetti P, Porta N, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Blum AL, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. 1994. Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by Salmonella typhimurium. *Gastroenterology* 107:915–923. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90214-3](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90214-3).
108. Forbes SJ, Eschmann M, Mantis NJ. 2008. Inhibition of Salmonella enterica serovar typhimurium motility and entry into epithelial cells by a protective antipolysaccharide monoclonal immunoglobulin A antibody. *Infect Immun* 76:4137–4144. <https://doi.org/10.1128/IAI.00416-08>.
109. Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen Salmonella Typhimurium. *Infect Immun* 60:1786–1792.
110. Wijburg OL, Uren TK, Simpfendorfer K, Johansen FE, Brandtzaeg P, Strugnell RA. 2006. Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella Typhimurium infection. *J Exp Med* 203:21–26. <https://doi.org/10.1084/jem.20052093>.
111. Forbes SJ, Martinelli D, Hsieh C, Ault JG, Marko M, Mannella CA, Mantis NJ. 2012. Association of a protective monoclonal IgA with the O antigen of Salmonella enterica serovar Typhimurium impacts type 3 secretion and outer membrane integrity. *Infect Immun* 80:2454–2463. <https://doi.org/10.1128/IAI.00018-12>.
112. Zarepour M, Bhullar K, Montero M, Ma C, Huang T, Velcich A, Xia L, Vallance BA. 2013. The mucin Muc2 limits pathogen burdens and epithelial barrier dysfunction during Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis. *Infect Immun* 81:3672–3683. <https://doi.org/10.1128/IAI.00854-13>.
113. Rey J, Garin N, Spertini F, Corthésy B. 2004. Targeting of secretory IgA to Peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *J Immunol* 172:3026–3033. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3026>.
114. Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, Pavot V, Redelingshuys P, Brown GD, Tiraby G, Roblin X, Verrier B, Genin C, Corthésy B, Paul S. 2013. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SigA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol* 11:e1001658. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001658>.
115. Boullier S, Tanguy M, Kadaoui KA, Caubet C, Sansonetti P, Corthésy B, Phalipon A. 2009. Secretory IgA-mediated neutralization of Shigella flexneri prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *J Immunol* 183:5879–5885. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901838>.
116. Germanier R, Fuer E. 1975. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of Salmonella Typhi: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis* 131:553–558. <https://doi.org/10.1093/infdis/131.5.553>.
117. Engels EA, Falagas ME, Lau J, Bennish ML. 1998. Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity. *BMJ* 316:110–116. <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7125.110>.
118. Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Lagos R, San Martin O, Blackwelder WC. 2007. Ty21a live oral typhoid vaccine and prevention of paratyphoid fever caused by Salmonella enterica Serovar Paratyphi B. *Clin Infect Dis* 45(Suppl 1):S24–28. <https://doi.org/10.1086/518141>.
119. Wahid R, Fresnay S, Levine MM, Szein MB. 2015. Immunization with Ty21a live oral typhoid vaccine elicits crossreactive multifunctional CD8+ T-cell responses against Salmonella enterica serovar Typhi, S Paratyphi A, and S Paratyphi B in humans. *Mucosal Immunol* 8:1349–1359. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.24>.
120. Kantele A, Pakkanen SH, Karttunen R, Kantele JM. 2013. Head-to-head comparison of humoral immune responses to Vi capsular polysaccharide and Salmonella Typhi Ty21a typhoid vaccines—a randomized trial. *PLoS One* 8:e60583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060583>.
121. Kopecko DJ, Sieber H, Ures JA, Furer A, Schlup J, Knof U, Collioud A, Xu D, Colburn K, Dietrich G. 2009. Genetic stability of vaccine strain Salmonella Typhi Ty21a over 25 years. *Int J Med Microbiol* 299:233–246. <https://doi.org/10.1016/j.jimm.2008.09.003>.
122. Cryz SJ, Jr, Vanprapar N, Thisyakorn U, Olanratmanee T, Losonsky G,

- Levine MM, Chearskul S. 1993. Safety and immunogenicity of *Salmonella typhi* Ty21a vaccine in young Thai children. *Infect Immun* 61: 1149–1151.
123. Murphy JR, Grez L, Schlesinger L, Ferreccio C, Baqar S, Munoz C, Wasserman SS, Losonsky G, Olson JG, Levine MM. 1991. Immunogenicity of *Salmonella Typhi* Ty21a vaccine for young children. *Infect Immun* 59:4291–4293.
 124. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S, Baumler AJ. 2008. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med* 14:421–428. <https://doi.org/10.1038/nm1743>.
 125. Mooney JP, Lee SJ, Lokken KL, Nanton MR, Nuccio SP, McSorley SJ, Tsolis RM. 2015. Transient loss of protection afforded by a live attenuated non-typhoidal *Salmonella* vaccine in mice co-infected with malaria. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0004027. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004027>.
 126. Chinnasami B, Sadasivam K, Vivekanandhan A, Arunachalam P, Pasupathy S. 2015. A study on longevity of immune response after vaccination with *Salmonella Typhi* Vi conjugate vaccine (Pedatyph) in children. *J Clin Diagn Res* 9:SC01–SC03. <https://doi.org/10.7860/JCDR/F2015/13302.5903>.
 127. Cadoz M. 1998. Potential and limitations of polysaccharide vaccines in infancy. *Vaccine* 16:1391–1395. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00097-8).
 128. Jansen AM, Hall LJ, Clare S, Goulding D, Holt KE, Grant AJ, Mastroeni P, Dougan G, Kingsley RA. 2011. A *Salmonella Typhimurium*-Typhi genomic chimera: a model to study Vi polysaccharide capsule function in vivo. *PLoS Pathog* 7:e1002131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002131>.
 129. Wangdi T, Lee CY, Spees AM, Yu C, Kingsbury DD, Winter SE, Hastey CJ, Wilson RP, Heinrich V, Baumler AJ. 2014. The Vi capsular polysaccharide enables *Salmonella enterica* serovar Typhi to evade microbe-guided neutrophil chemotaxis. *PLoS Pathog* 10:e1004306. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004306>.
 130. Santhanam SK, Dutta D, Parween F, Qadri A. 2014. The virulence polysaccharide Vi released by *Salmonella Typhi* targets membrane prohibitin to inhibit T-cell activation. *J Infect Dis* 210:79–88. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu064>.
 131. Fraser A, Paul M, Goldberg E, Acosta CJ, Leibovici L. 2007. Typhoid fever vaccines: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Vaccine* 25:7848–7857. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.027>.
 132. Jones BD, Ghori N, Falkow S. 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180:15–23. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.15>.
 133. Higginson EE, Simon R, Tennant SM. 2016. Animal models for salmonellosis: applications in vaccine research. *Clin Vaccine Immunol* 23:746–756. <https://doi.org/10.1128/CVI.00258-16>.
 134. Caron J, Loredano-Osti JC, Laroche L, Skamene E, Morgan K, Malo D. 2002. Identification of genetic loci controlling bacterial clearance in experimental *Salmonella Enteritidis* infection: an unexpected role of Nramp1 (Slc11a1) in the persistence of infection in mice. *Genes Immun* 3:196–204. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363850>.
 135. Song J, Willinger T, Rongvaux A, Eynon EE, Stevens S, Manz MG, Flavell RA, Galan JE. 2010. A mouse model for the human pathogen *Salmonella Typhi*. *Cell Host Microbe* 8:369–376. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.003>.
 136. Libby SJ, Brehm MA, Greiner DL, Shultz LD, McClelland M, Smith KD, Cookson BT, Karlinsey JE, Kinkel TL, Porwollik S, Canals R, Cummings LA, Fang FC. 2010. Humanized nonobese diabetic-scid IL2rg^{manull} mice are susceptible to lethal *Salmonella Typhi* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15589–15594. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005566107>.
 137. Chappaz S, Finke D. 2010. The IL-7 signaling pathway regulates lymph node development independent of peripheral lymphocytes. *J Immunol* 184:3562–3569. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901647>.
 138. Denton PW, Nochi T, Lim A, Krisko JF, Martinez-Torres F, Choudhary SK, Wahl A, Olesen R, Zou W, Di Santo JP, Margolis DM, Garcia JV. 2012. IL-2 receptor gamma-chain molecule is critical for intestinal T-cell reconstitution in humanized mice. *Mucosal Immunol* 5:555–566. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.31>.
 139. Brehm MA, Shultz LD, Luban J, Greiner DL. 2013. Overcoming current limitations in humanized mouse research. *J Infect Dis* 208(Suppl 2): S125–S130. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit319>.
 140. Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Khalouei S, Gan OI, Dick JE, Danska JS. 2007. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 8:1313–1323. <https://doi.org/10.1038/ni1527>.
 141. Jangalwe S, Shultz LD, Mathew A, Brehm MA. 2016. Improved B cell development in humanized NOD-scid IL2R^{gnull} mice transgenically expressing human stem cell factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Immun Inflamm Dis* 4:427–440. <https://doi.org/10.1002/iid3.124>.
 142. Galen JE, Curtiss R, III. 2014. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine* 32:4376–4385. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.026>.
 143. Galen JE, Buskirk AD, Tennant SM, Pasetti MF. 2016. Live attenuated human *Salmonella* vaccine candidates: tracking the pathogen in natural infection and stimulation of host immunity. *EcoSal Plus* 7:ecosalplus.ESP-0010–2016.
 144. Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove CA, Ghaem-Maghami M, Sexton A, Khan M, Brennan FR, Everest P, Wu T, Pickard D, Holden DW, Dougan G, Griffin GE, House D, Santangelo JD, Khan SA, Shea JE, Feldman RG, Lewis DJM. 2002. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined aroC and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (ssaV) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun* 70:3457–3467. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3457-3467.2002>.
 145. Tennant SM, Levine MM. 2015. Live attenuated vaccines for invasive *Salmonella* infections. *Vaccine* 33(Suppl 3):C36–C41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.029>.
 146. MacLennan CA, Martin LB, Micoli F. 2014. Vaccines against invasive *Salmonella* disease: current status and future directions. *Hum Vaccin Immunother* 10:1478–1493. <https://doi.org/10.4161/hv.29054>.
 147. Wahid R, Zafar SJ, McArthur MA, Pasetti MF, Levine MM, Sztejn MB. 2014. Live oral *Salmonella enterica* serovar Typhi vaccines Ty21a and CVD 909 induce opsonophagocytic functional antibodies in humans that cross-react with *S. Paratyphi A* and *S. Paratyphi B*. *Clin Vaccine Immunol* 21:427–434. <https://doi.org/10.1128/CVI.00786-13>.
 148. Wahid R, Salerno-Goncalves R, Tacket CO, Levine MM, Sztejn MB. 2008. Generation of specific effector and memory T cells with gut- and secondary lymphoid tissue-homing potential by oral attenuated CVD 909 typhoid vaccine in humans. *Mucosal Immunol* 1:389–398. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.30>.
 149. Xiong K, Chen Z, Zhu C, Li J, Hu X, Rao X, Cong Y. 2015. Safety and immunogenicity of an attenuated *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A vaccine candidate. *Int J Med Microbiol* 305:563–571. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.07.004>.
 150. Martin LB, Simon R, MacLennan CA, Tennant SM, Sahastrabudde S, Khan MI. 2016. Status of paratyphoid fever vaccine research and development. *Vaccine* 34:2900–2902. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.106>.
 151. Lin FY, Ho VA, Khiem HB, Trach DD, Bay PV, Thanh TC, Kossaczka Z, Bryla DA, Shiloach J, Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. 2001. The efficacy of a *Salmonella Typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. *N Engl J Med* 344:1263–1269. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104263441701>.
 152. Bhutta ZA, Capeding MR, Bavdekar A, Marchetti E, Ariff S, Soofi SB, Anemona A, Habib MA, Alberto E, Juvekar S, Khan RMQ, Marhaba R, Ali N, Malubay N, Kawade A, Saul A, Martin LB, Podda A. 2014. Immunogenicity and safety of the Vi-CRM197 conjugate vaccine against typhoid fever in adults, children, and infants in south and southeast Asia: results from two randomised, observer-blind, age de-escalation, phase 2 trials. *Lancet Infect Dis* 14:119–129. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70241-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70241-X).
 153. Kothari N, Kothari S, Choi YJ, Dey A, Briles DE, Rhee DK, Carbis R. 2015. A bivalent conjugate vaccine containing PspA families 1 and 2 has the potential to protect against a wide range of *Streptococcus pneumoniae* strains and *Salmonella Typhi*. *Vaccine* 33:783–788. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.032>.
 154. Tennant SM, MacLennan CA, Simon R, Martin LB, Khan MI. 2016. Nontyphoidal salmonella disease: current status of vaccine research and development. *Vaccine* 34:2907–2910. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.072>.
 155. Hoiseth SK, Stocker BA. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella Typhi*-

- murium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238–239. <https://doi.org/10.1038/291238a0>.
156. Hormaeche CE, Joysey HS, Desilva L, Izhar M, Stocker BA. 1991. Immunity conferred by Aro- Salmonella live vaccines. *Microb Pathog* 10: 149–158. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(91\)90075-L](https://doi.org/10.1016/0882-4010(91)90075-L).
 157. Wang S, Li Y, Scarpellini G, Kong W, Shi H, Baek CH, Gunn B, Wanda SY, Roland KL, Zhang X, Senechal-Willis P, Curtiss R, III. 2010. Salmonella vaccine vectors displaying delayed antigen synthesis in vivo to enhance immunogenicity. *Infect Immun* 78:3969–3980. <https://doi.org/10.1128/IAI.00444-10>.
 158. Kong W, Clark-Curtiss J, Curtiss R, III. 2013. Utilizing Salmonella for antigen delivery: the aims and benefits of bacterial delivered vaccination. *Expert Rev Vaccines* 12:345–347. <https://doi.org/10.1586/erv.13.7>.
 159. Felgner S, Frahm M, Kocijancic D, Rohde M, Eckweiler D, Bielecka A, Bueno E, Cava F, Abraham WR, Curtiss R, III, Haussler S, Erhardt M, Weiss S. 2016. aroA-deficient Salmonella enterica serovar Typhimurium is more than a metabolically attenuated mutant. *mBio* 7:e01220-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01220-16>.
 160. Sinha K, Mastroeni P, Harrison J, de Hormaeche RD, Hormaeche CE. 1997. Salmonella Typhimurium aroA, htrA, and aroD htrA mutants cause progressive infections in athymic (nu/nu) BALB/c mice. *Infect Immun* 65:1566–1569.
 161. Chatfield S, Roberts M, Londono P, Croypley I, Douce G, Dougan G. 1993. The development of oral vaccines based on live attenuated Salmonella strains. *FEMS Immunol Med Microbiol* 7:1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1993.tb00374.x>.
 162. Kong Q, Six DA, Liu Q, Gu L, Wang S, Alamuri P, Raetz CR, Curtiss R, III. 2012. Phosphate groups of lipid A are essential for Salmonella enterica serovar Typhimurium virulence and affect innate and adaptive immunity. *Infect Immun* 80:3215–3224. <https://doi.org/10.1128/IAI.00123-12>.
 163. Curtiss R, III, Wanda SY, Gunn BM, Zhang X, Tinge SA, Ananthnarayan V, Mo H, Wang S, Kong W. 2009. Salmonella enterica serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect Immun* 77:1071–1082. <https://doi.org/10.1128/IAI.00693-08>.
 164. Tennant SM, Wang JY, Galen JE, Simon R, Pasetti MF, Gat O, Levine MM. 2011. Engineering and preclinical evaluation of attenuated nontyphoidal Salmonella strains serving as live oral vaccines and as reagent strains. *Infect Immun* 79:4175–4185. <https://doi.org/10.1128/IAI.05278-11>.
 165. Latasa C, Echeverez M, Garcia B, Gil C, Garcia-Ona E, Burgui S, Casares N, Hervás-Stubbis S, Lasarte JJ, Lasa I, Solano C. 2016. Evaluation of a Salmonella strain lacking the secondary messenger C-di-GMP and RpoS as a live oral vaccine. *PLoS One* 11:e0161216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161216>.
 166. Powell DA, Roberts LM, Ledvina HE, Sempowski GD, Curtiss R, III, Frelinger JA. 2016. Distinct innate responses are induced by attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium mutants. *Cell Immunol* 299: 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.10.002>.
 167. Eom JS, Seok Kim J, Im Jang J, Kim BH, Young Yoo S, Hyeon Choi J, Bang IS, Lee IS, Keun Park Y. 2013. Enhancement of host immune responses by oral vaccination to Salmonella enterica serovar Typhimurium harboring both FliC and FliB flagella. *PLoS One* 8:e74850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074850>.
 168. Bonifield HR, Hughes KT. 2003. Flagellar phase variation in Salmonella enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J Bacteriol* 185:3567–3574. <https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3567-3574.2003>.
 169. Stefanetti G, Rondini S, Lanzilao L, Saul A, MacLennan CA, Micoli F. 2014. Impact of conjugation chemistry on the immunogenicity of S. Typhimurium conjugate vaccines. *Vaccine* 32:6122–6129. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.056>.
 170. Goh YS, Clare S, Micoli F, Saul A, Mastroeni P, MacLennan CA. 2015. Monoclonal antibodies of a diverse isotype induced by an O-antigen glycoconjugate vaccine mediate In vitro and in vivo killing of african invasive nontyphoidal Salmonella. *Infect Immun* 83:3722–3731. <https://doi.org/10.1128/IAI.00547-15>.
 171. Simon R, Tennant SM, Wang JY, Schmidlein PJ, Lees A, Ernst RK, Pasetti MF, Galen JE, Levine MM. 2011. Salmonella enterica serovar Enteritidis core O polysaccharide conjugated to H:g,m flagellin as a candidate vaccine for protection against invasive infection with S Enteritidis. *Infect Immun* 79:4240–4249. <https://doi.org/10.1128/IAI.05484-11>.
 172. Simon R, Wang JY, Boyd MA, Tulapurkar ME, Ramachandran G, Tennant SM, Pasetti M, Galen JE, Levine MM. 2013. Sustained protection in mice immunized with fractional doses of Salmonella Enteritidis core and O polysaccharide-flagellin glycoconjugates. *PLoS One* 8:e64680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064680>.
 173. Micoli F, Rondini S, Gavini M, Lanzilao L, Medagliani D, Saul A, Martin LB. 2012. O:2-CRM(197) conjugates against Salmonella Paratyphi A. *PLoS One* 7:e47039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047039>.
 174. Del Bel Belluz L, Guidi R, Pateras IS, Levi L, Mihaljevic B, Rouf SF, Wrande M, Candela M, Turrioni S, Nastasi C, Consolandi C, Peano C, Tebaldi T, Viero G, Gorgoulis VG, Krejsgaard T, Rhen M, Frisan T. 2016. The typhoid toxin promotes host survival and the establishment of a persistent asymptomatic infection. *PLoS Pathog* 12:e1005528. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005528>.
 175. Galan JE. 2016. Typhoid toxin provides a window into typhoid fever and the biology of Salmonella Typhi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 6338–6344. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606335113>.
 176. Suar M, Jantsch J, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Barrow PA, Hardt WD. 2006. Virulence of broad- and narrow-host-range Salmonella enterica serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. *Infect Immun* 74:632–644. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.632-644.2006>.
 177. Pesciaroli M, Aloisio F, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, Francia M, Battistoni A, Pasquali P. 2011. An attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium strain lacking the ZnuABC transporter induces protection in a mouse intestinal model of Salmonella infection. *Vaccine* 29:1783–1790. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.111>.
 178. Costa LF, Paixao TA, Tsoilis RM, Baumler AJ, Santos RL. 2012. Salmonellosis in cattle: advantages of being an experimental model. *Res Vet Sci* 93:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.002>.
 179. Snider TA, Gull T, Jackson TA, Martinez-Becerra FJ, Picking DR, Picking WD, Picking WL. 2014. Experimental salmonellosis challenge model in older calves. *Vet Microbiol* 170:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.018>.
 180. Wales AD, Davies RH. 2016. Salmonella vaccination in pigs: a review. *Zoonoses Public Health* <https://doi.org/10.1111/zph.12256>.
 181. Ruggeri J, Pesciaroli M, Gaetarelli B, Scaglione FE, Pregel P, Ammendola S, Battistoni A, Bollo E, Alborali GL, Pasquali P. 2014. Parenteral administration of attenuated Salmonella Typhimurium DeltaznuABC is protective against salmonellosis in piglets. *Vaccine* 32:4032–4038. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.066>.
 182. Desin TS, Koster W, Potter AA. 2013. Salmonella vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 12:87–96. <https://doi.org/10.1586/erv.12.138>.
 183. Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Babak V, Rychlik I. 2013. SPI1 defective mutants of Salmonella enterica induce cross-protective immunity in chickens against challenge with serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine* 31:3156–3162. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.002>.
 184. Nandre R, Matsuda K, Lee JH. 2014. Efficacy for a new live attenuated Salmonella Enteritidis vaccine candidate to reduce internal egg contamination. *Zoonoses Public Health* 61:55–63. <https://doi.org/10.1111/zph.12042>.
 185. Bumann D. 2014. Identification of protective antigens for vaccination against systemic Salmonellosis. *Front Immunol* 5:381. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00381>.
 186. Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica. *Mol Microbiol* 47:103–118. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x>.
 187. Klemm EJ, Gkrania-Klotsas E, Hadfield J, Forbester JL, Harris SR, Hale C, Heath JN, Wileman T, Clare S, Kane L, Goulding D, Otto TD, Kay S, Doffinger R, Cooke FJ, Carmichael A, Lever AM, Parkhill J, MacLennan CA, Kumararatne D, Dougan G, Kingsley RA. 2016. Emergence of host-adapted Salmonella Enteritidis through rapid evolution in an immunocompromised host. *Nat Microbiol* 1:15023. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.23>.
 188. Feasey NA, Hadfield J, Keddy KH, Dallman TJ, Jacobs J, Deng X, Wigley P, Barquist Barquist L, Langridge GC, Feltwell T, Harris SR, Mather AE, Fookes M, Aslett M, Msefula C, Kariuki S, MacLennan CA, Onsare RS, Weill FX, Le Hello S, Smith AM, McClelland M, Desai P, Parry CM, Cheesbrough J, French N, Campos J, Chabalgoity JA, Betancor L, Hopkins KL, Nair S, Humphrey TJ, Lunguya O, Cogan TA, Tapia MD, Sow SO, Tennant SM, Bornstein K, Levine MM, Lacharme-Lora L, Everett DB, Kingsley RA, Parkhill J, Heyderman RS, Dougan G, Gordon MA, Thomson NR. 2016. Distinct Salmonella Enteritidis lineages associated with enterocolitis in high-income settings and invasive disease in low-

- income settings. *Nat Genet* 48:1211–1217. <https://doi.org/10.1038/ng.3644>.
189. Choi HW, Brooking-Dixon R, Neupane S, Lee CJ, Miao EA, Staats HF, Abraham SN. 2013. Salmonella Typhimurium impedes innate immunity with a mast-cell-suppressing protein tyrosine phosphatase, SptP. *Immunity* 39:1108–1120. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.009>.
 190. McLaughlin LM, Govoni GR, Gerke C, Gopinath S, Peng K, Laidlaw G, Chien YH, Jeong HW, Li Z, Brown MD, Sacks DB, Monack D. 2009. The Salmonella SPI2 effector Ssel mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration. *PLoS Pathog* 5:e1000671. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000671>.
 191. Kullas AL, McClelland M, Yang HJ, Tam JW, Torres A, Porwollik S, Mena P, McPhee JB, Bogomolnaya L, Andrews-Polymeris H, van der Velden AW. 2012. L-Asparaginase II produced by Salmonella Typhimurium inhibits T cell responses and mediates virulence. *Cell Host Microbe* 12:791–798. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.018>.
 192. Atif SM, Winter SE, Winter MG, McSorley SJ, Baumler AJ. 2014. Salmonella enterica serovar Typhi impairs CD4 T cell responses by reducing antigen availability. *Infect Immun* 82:2247–2254. <https://doi.org/10.1128/IAI.00020-14>.
 193. Lopez-Medina M, Carrillo-Martin I, Leyva-Rangel J, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V. 2015. Salmonella impairs CD8 T cell response through PD-1: PD-L axis. *Immunobiology* 220:1369–1380. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.07.005>.
 194. Nanton MR, Lee SJ, Atif SM, Nuccio SP, Taylor JJ, Baumler AJ, Way SS, McSorley SJ. 2014. Direct visualization of endogenous Salmonella-specific B cells reveals a marked delay in clonal expansion and germinal center development. *Eur J Immunol* <https://doi.org/10.1002/eji.201444540>.
 195. Barat S, Willer Y, Rizos K, Claudi B, Maze A, Schemmer AK, Kirchoff D, Schmidt A, Burton N, Bumann D. 2012. Immunity to intracellular Salmonella depends on surface-associated antigens. *PLoS Pathog* 8:e1002966. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002966>.
 196. Karunakaran KP, Yu H, Jiang X, Chan Q, Goldberg MF, Jenkins MK, Foster LJ, Brunham RC. 2016. Identification of MHC-bound peptides from dendritic cells infected with Salmonella enterica strain SL1344: implications for a non-typhoidal Salmonella vaccine. *J Proteome Res* <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00926>.
 197. Charles RC, Sheikh A, Krastins B, Harris JB, Bhuiyan MS, LaRocque RC, Logvinenko T, Sarracino DA, Kudva IT, Eisenstein J, Podolsky MJ, Kalsy A, Brooks WA, Ludwig A, John M, Calderwood SB, Qadri F, Ryan ET. 2010. Characterization of anti-Salmonella enterica serotype Typhi antibody responses in bacteremic Bangladeshi patients by an immunofluorescence-based technology. *Clin Vaccine Immunol* 17:1188–1195. <https://doi.org/10.1128/CVI.00104-10>.
 198. Lee SJ, Liang L, Juarez S, Nanton MR, Gondwe EN, Msefula CL, Kayala MA, Necchi F, Heath JN, Hart P, Tsolis RM, Heyderman RS, MacLennan CA, Felgner PL, Davies DH, McSorley SJ. 2012. Identification of a common immune signature in murine and human systemic Salmonellosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4998–5003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111413109>.
 199. Ferreira RB, Valdez Y, Coombes BK, Sad S, Gouw JW, Brown EM, Li Y, Grassl GA, Antunes LC, Gill N, Truong M, Scholz R, Reynolds LA, Krishnan L, Zafer AA, Sal-Man N, Lowden MJ, Auweter SD, Foster LJ, Finlay BB. 2015. A highly effective component vaccine against nontyphoidal Salmonella enterica infections. *mBio* 6:e01421-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01421-15>.
 200. Cho Y, Park S, Barate AK, Truong QL, Han JH, Jung CH, Yoon JW, Cho S, Hahn TW. 2015. Proteomic analysis of outer membrane proteins in Salmonella enterica Enteritidis. *J Microbiol Biotechnol* 25:288–295. <https://doi.org/10.4014/jmb.1410.10052>.
 201. Hosny Ael D, Diab MR, Khattab RA, Awad HO. 2015. Immune response to Vi polysaccharide, heat-killed whole cells, and outer membrane protein of Salmonella Typhi. *J Infect Dev Ctries* 9:642–649. <https://doi.org/10.3855/jidc.6504>.
 202. Ferrer-Navarro M, Balleste-Delpierre C, Vila J, Fabrega A. 2016. Characterization of the outer membrane subproteome of the virulent strain Salmonella Typhimurium SL1344. *J Proteomics* 146:141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.032>.
 203. Reynolds CJ, Jones C, Blohmke CJ, Darton TC, Goudet A, Sergeant R, Maillere B, Pollard AJ, Altmann DM, Boyton RJ. 2014. The serodominant secreted effector protein of Salmonella, SseB, is a strong CD4 antigen containing an immunodominant epitope presented by diverse HLA class II alleles. *Immunology* 143:438–446. <https://doi.org/10.1111/imm.12327>.
 204. Liu Q, Yi J, Liang K, Liu T, Roland KL, Jiang Y, Kong Q. 2016. Outer membrane vesicles derived from Salmonella Typhimurium mutants with truncated LPS induce cross-protective immune responses against infection of Salmonella enterica serovars in the mouse model. *Int J Med Microbiol* 306:697–706. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.08.004>.
 205. Liu Q, Yi J, Liang K, Hu B, Zhang X, Curtiss R, III, Kong Q. 2016. Outer membrane vesicles from flagellin-deficient Salmonella enterica serovar Typhimurium induce cross-reactive immunity and provide cross-protection against heterologous Salmonella challenge. *Sci Rep* 6:34776. <https://doi.org/10.1038/srep34776>.
 206. Sassone-Corsi M, Chairatana P, Zheng T, Perez-Lopez A, Edwards RA, George MD, Nolan EM, Raffatellu M. 2016. Siderophore-based immunization strategy to inhibit growth of enteric pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:13462–13467. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606290113>.
 207. Brandtzaeg P. 2009. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 70:505–515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02319.x>.
 208. Holmgren J, Czerkinsky C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11:S45–S53. <https://doi.org/10.1038/nm1213>.
 209. Corthésy B, Spertini F. 1999. Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 380:1251–1262.
 210. Pasetti MF, Simon JK, Szein MB, Levine MM. 2011. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunol Rev* 239:125–148. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00970.x>.
 211. Wolfert MA, Boons GJ. 2013. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nat Chem Biol* 9:776–784. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1403>.
 212. Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, Mestecky J. 2010. Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells. *PLoS Pathog* 6:e1001147. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001147>.
 213. Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, Kiyono H. 2007. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J Exp Med* 204:2789–2796. <https://doi.org/10.1084/jem.20070607>.
 214. Atwe SU, Ma Y, Gill HS. 2014. Pollen grains for oral vaccination. *J Control Release* 194:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.08.010>.
 215. Zhu Q, Berzofsky JA. 2013. Oral vaccines: directed safe passage to the front line of defense. *Gut Microbes* 4:246–252. <https://doi.org/10.4161/gmic.24197>.
 216. Pigny F, Lassus A, Terrettaz J, Tranquart F, Corthésy B, Boleley G. 2016. Intranasal vaccination with Salmonella-derived serodominant secreted effector protein B associated with gas-filled microbubbles partially protects against gut infection in mice. *J Infect Dis* 214:438–446. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw162>.
 217. Rishi P, Bhogal A, Arora S, Pandey SK, Verma I, Kaur IP. 2015. Improved oral therapeutic potential of nanoencapsulated cryptid formulation against Salmonella infection. *Eur J Pharm Sci* 72:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.014>.
 218. Davitt CJ, Lavelle EC. 2015. Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *Adv Drug Deliv Rev* 91:52–69. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.007>.
 219. Stary G, Olive A, Radovic-Moreno AF, Gondek D, Alvarez D, Basto PA, Perro M, Vrbanac VD, Tager AM, Shi J, Yethon JA, Farokhzad OC, Langer R, Starnbach MN, von Andrian UH. 2015. A mucosal vaccine against Chlamydia trachomatis generates two waves of protective memory T cells. *Science* 348:aaa8205. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8205>.
 220. Pavot V, Berthet M, Resseguier J, Legaz S, Handke N, Gilbert SC, Paul S, Verrier B. 2014. Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine (Lond)* 9:2703–2718. <https://doi.org/10.2217/nmm.14.156>.
 221. Pavot V, Climent N, Rochereau N, Garcia F, Genin C, Tiraby G, Vernejoul F, Perouzel E, Lioux T, Verrier B, Paul S. 2016. Directing vaccine immune responses to mucosa by nanosized particulate carriers encapsulating NOD ligands. *Biomaterials* 75:327–339. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.034>.
 222. Carreno JM, Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C, Printz A, Pastelin R, Isibasi A, Chariatte D, Tanoue Y, Lopez-Macias C, Gander B, Ludewig B. 2016. PLGA-microencapsulation protects Salmonella typhi outer membrane proteins from acidic degradation and increases their mucosal immu-

- nogenicity. *Vaccine* 34:4263–4269. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.036>.
223. Martz SL, McDonald JA, Sun J, Zhang YG, Gloor GB, Noordhof C, He SM, Gerbaba TK, Blennerhassett M, Hurlbut DJ, Allen-Vercoe E, Claud EC, Petrof EO. 2015. Administration of defined microbiota is protective in a murine *Salmonella* infection model. *Sci Rep* 5:16094. <https://doi.org/10.1038/srep16094>.
 224. Chamcha V, Jones A, Quigley BR, Scott JR, Amara RR. 2015. Oral immunization with a recombinant *Lactococcus lactis*-expressing HIV-1 antigen on group A *Streptococcus pilus* induces strong mucosal immunity in the gut. *J Immunol* 195:5025–5034. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501243>.
 225. Lei H, Peng X, Jiao H, Zhao D, Ouyang J. 2015. Broadly protective immunity against divergent influenza viruses by oral co-administration of *Lactococcus lactis* expressing nucleoprotein adjuvanted with cholera toxin B subunit in mice. *Microb Cell Fact* 14:111. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0287-4>.
 226. Corthésy B, Boris S, Isler P, Grangette C, Mercenier A. 2005. Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis* 192:1441–1449. <https://doi.org/10.1086/444425>.
 227. Ibanez AE, Coria LM, Carabajal MV, Delpino MV, Risso GS, Cobiello PG, Rinaldi J, Barrionuevo P, Bruno L, Frank F, Klinke S, Goldbaum FA, Briones G, Giambartolomei GH, Pasquevich KA, Cassataro J. 2015. A bacterial protease inhibitor protects antigens delivered in oral vaccines from digestion while triggering specific mucosal immune responses. *J Control Release* 220:18–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.011>.
 228. Davitt CJ, McNeela EA, Longet S, Tobias J, Aversa V, McEntee CP, Rosa M, Coulter IS, Holmgren J, Lavelle EC. 2016. A novel adjuvanted capsule based strategy for oral vaccination against infectious diarrhoeal pathogens. *J Control Release* 233:162–173. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.001>.
 229. Orfi E, Szebeni J. 2016. The immune system of the gut and potential adverse effects of oral nanocarriers on its function. *Adv Drug Deliv Rev* 106:402–409. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.09.009>.
 230. Shima H, Watanabe T, Fukuda S, Fukuoka S, Ohara O, Ohno H. 2014. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses. *Int Immunol* 26:619–625. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu061>.
 231. Favre L, Spertini F, Corthésy B. 2005. Secretory IgA possesses intrinsic modulatory properties stimulating mucosal and systemic immune responses. *J Immunol* 175:2793–2800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2793>.
 232. Rochereau N, Pavot V, Verrier B, Ensinas A, Genin C, Corthésy B, Paul S. 2015. Secretory IgA as a vaccine carrier for delivery of HIV antigen to M cells. *Eur J Immunol* 45:773–779. <https://doi.org/10.1002/eji.201444816>.
 233. Rochereau N, Pavot V, Verrier B, Jospin F, Ensinas A, Genin C, Corthésy B, Paul S. 2016. Delivery of antigen to nasal-associated lymphoid tissue microfold cells through secretory IgA targeting local dendritic cells confers protective immunity. *J Allergy Clin Immunol* 137:214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.042>.
 234. Fujihashi K, Kiyono H. 2009. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol* 30:334–343. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.004>.
 235. Maharjan S, Singh B, Jiang T, Yoon SY, Li HS, Kim G, Gu MJ, Kim SJ, Park OJ, Han SH, Kang SK, Yun CH, Choi YJ, Cho CS. 2016. Systemic administration of RANKL overcomes the bottleneck of oral vaccine delivery through microfold cells in ileum. *Biomaterials* 84:286–300. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.043>.
 236. Kissel V, Gonzalez C, Astudillo M, Godard A, Wachman B, Cabello FC. 1994. *Salmonella*-specific monoclonal antibodies against recombinant *Salmonella typhi* 36-kilodalton porin. *Clin Diagn Lab Immunol* 1:250–252.
 237. Deb R, Dey S, Madhan Mohan C, Gaikwad S, Kamble N, Khulape SA, Gupta SK, Maity HK, Pathak DC. 2015. Development and evaluation of a *Salmonella* Typhimurium flagellin based chimeric DNA vaccine against infectious bursal disease of poultry. *Res Vet Sci* 102:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.07.004>.
 238. Simon R, Tennant SM, Galen JE, Levine MM. 2011. Mouse models to assess the efficacy of non-typhoidal *Salmonella* vaccines: revisiting the role of host innate susceptibility and routes of challenge. *Vaccine* 29:5094–5106. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.022>.
 239. Firoz Mian M, Pek EA, Chenoweth MJ, Ashkar AA. 2011. Humanized mice are susceptible to *Salmonella* Typhi infection. *Cell Mol Immunol* 8:83–87. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.52>.
 240. Roland KL, Tinge SA, Kochi SK, Thomas LJ, Killeen KP. 2010. Reactogenicity and immunogenicity of live attenuated *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A enteric fever vaccine candidates. *Vaccine* 28:3679–3687. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.019>.
 241. Panda A, Tatarov I, Masek BJ, Hardick J, Crusan A, Wakefield T, Carroll K, Yang S, Hsieh YH, Lipsky MM, McLeod CG, Levine MM, Rothman RE, Gaydos CA, DeTolla LJ. 2014. A rabbit model of non-typhoidal *Salmonella* bacteremia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37:211–220. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.05.004>.
 242. Periaswamy B, Maier L, Vishwakarma V, Slack E, Kremer M, Andrews-Polymenis HL, McClelland M, Grant AJ, Suar M, Hardt WD. 2012. Live attenuated *S. Typhimurium* vaccine with improved safety in immunocompromised mice. *PLoS One* 7:e45433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045433>.
 243. Vishwakarma V, Pati NB, Chandel HS, Sahoo SS, Saha B, Suar M. 2012. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TTSS-2 deficient fur mutant as safe live-attenuated vaccine candidate for immunocompromised mice. *PLoS One* 7:e52043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052043>.
 244. Jones PW, Dougan G, Hayward C, Mackenzie N, Collins P, Chatfield SN. 1991. Oral vaccination of calves against experimental salmonellosis using a double aro mutant of *Salmonella* Typhimurium. *Vaccine* 9:29–34. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90313-U](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90313-U).
 245. Lindberg AA, Robertsson JA. 1983. *Salmonella typhimurium* infection in calves: cell-mediated and humoral immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines. *Infect Immun* 41:751–757.
 246. Robertsson JA, Lindberg AA, Hoiseth S, Stocker BA. 1983. *Salmonella* Typhimurium infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. *Infect Immun* 41:742–750.
 247. Ault A, Tennant SM, Gorres JP, Eckhaus M, Sandler NG, Roque A, Livio S, Bao S, Foulds KE, Kao SF, Roederer M, Schmidlein P, Boyd MA, Pasetti MF, Douek DC, Estes JD, Nabel GJ, Levine MM, Rao SS. 2013. Safety and tolerability of a live oral *Salmonella* Typhimurium vaccine candidate in SIV-infected nonhuman primates. *Vaccine* 31:5879–5888. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.041>.
 248. Lee JS, Jung ID, Lee CM, Park JW, Chun SH, Jeong SK, Ha TK, Shin YK, Kim DJ, Park YM. 2010. Outer membrane protein a of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates dendritic cells and enhances Th1 polarization. *BMC Microbiol* 10:263. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-263>.
 249. Secundino I, Lopez-Macias C, Cervantes-Barragan L, Gil-Cruz C, Rios-Sarabia N, Pastelin-Palacios R, Villasis-Keever MA, Becker I, Puente JL, Calva E, Isibasi A. 2006. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 117:59–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02263.x>.
 250. Cervantes-Barragan L, Gil-Cruz C, Pastelin-Palacios R, Lang KS, Isibasi A, Ludewig B, Lopez-Macias C. 2009. TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to *Salmonella* Typhi antigens. *Eur J Immunol* 39:126–135. <https://doi.org/10.1002/eji.200838185>.
 251. Yang Y, Wan C, Xu H, Wei H. 2013. Identification and characterization of OmpL as a potential vaccine candidate for immune-protection against salmonellosis in mice. *Vaccine* 31:2930–2936. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.044>.
 252. DasSarma P, Negi VD, Balakrishnan A, Karan R, Barnes S, Ekulona F, Chakravorty D, DasSarma S. 2014. Haloarchaeal gas vesicle nanoparticles displaying *Salmonella* SopB antigen reduce bacterial burden when administered with live attenuated bacteria. *Vaccine* 32:4543–4549. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.021>.

Annexe II : Revue sur les MICI

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) : qui dit MICI dit dysbiose

Inflammatory bowel diseases (IBD): where IBD is, dysbiosis goes

Éva Michaud*, Rémi Gayet*, Stéphane Paul*, Xavier Roblin**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Les MICI touchent principalement les pays occidentaux, avec environ 1 million de cas aux États-Unis et 2,5 millions en Europe (1). Cependant, de plus en plus de cas sont recensés dans les nouveaux pays industrialisés. Les MICI constituent ainsi un problème majeur avec des implications sanitaires, économiques, mais aussi sociétales en raison des conséquences délétères sur la qualité de vie des patients à long terme. L'intestin est colonisé par un ensemble de micro-organismes commensaux appelé microbiote. Une forte corrélation existe entre les MICI et le phénomène de dysbiose, qui consiste en un déséquilibre du microbiote. Le lien entre dysbiose et MICI a pu être démontré, mais l'influence du microbiote sur les MICI est difficile à étudier du fait du caractère ambivalent de ce dernier. Cette revue a pour but de souligner les principales avancées sur les liens entre MICI et dysbiose qui pourraient conduire à la mise en place de traitements innovants, plus spécifiques et plus efficaces.

Le microbiote : "MICI-ce que c'est ?"

Le microbiote est un réseau complexe d'interactions stables entre plusieurs populations microbiennes qui contribuent à l'homéostasie intestinale. Les bactéries dont il est constitué se répartissent entre 4 phyla majeurs. Une dysbiose se caractérise par l'expansion d'un ou de plusieurs nouveaux groupes de bactéries

dans l'intestin, qui modifie le ratio de ces 4 grands phyla de bactéries présents dans l'intestin (2).

Généralités sur le microbiote humain

Le microbiote est constitué à 0,1 % par des *Fungi*, en particulier du genre *Candida*, qui permettent la stimulation du système immunitaire intestinal. La présence d'un virome dans l'intestin a mis en évidence le rôle important des virus dans le microbiote, et notamment des bactériophages, mais qui restent cependant peu étudiés (3). Toutefois, la majeure partie du microbiote est constituée de plus de 1 100 espèces bactériennes, dont les plus nombreuses sont des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes*, suivies par des *Actinobacteria* et des *Proteobacteria*. Même si le microbiote varie d'un individu à l'autre, sa composition générale est relativement conservée dans la population. Cette stabilité est liée aux fonctions du microbiote dans l'homéostasie intestinale, à savoir des processus métaboliques aidant la nutrition, la fourniture de nutriments (vitamines), ainsi que la maturation du système immunitaire (4). Le microbiote d'un individu se forme dès la naissance. Des méthodes de métagénomique fondées sur le séquençage de l'ARN ribosomal (ARNr) bactérien 16S ont permis d'étudier la composition du microbiote au cours de la vie. Il apparaît que le microbiote d'un enfant âgé de moins de 1 an est peu diversifié, et provient principalement du microbiote maternel. Sa composition évolue au fur et à mesure de l'intégration d'une alimentation plus complexe, ce qui contribue aux différences interindividuelles.

* Laboratoire d'immunologie et d'immunomonitoring, CIC 1408, Inserm, GIMAP EA3064, CHU de Saint-Étienne.

** Département de gastro-entérologie, CHU de Saint-Étienne.

Résumé

Le microbiote est composé de bactéries, virus et fungi essentiels à la digestion, à la mise en place du système immunitaire et à la protection contre les agents pathogènes tout au long de la vie d'un individu. Sa composition varie d'un individu à l'autre mais conserve une composition générale qui comprend les espèces *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), qui comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont étroitement liées à une dérégulation du microbiote, appelée dysbiose. Des facteurs comme l'héritage génétique et l'alimentation vont conduire à une modification de la composition du microbiote, à l'exemple de la réduction des populations bactériennes inductrices de tolérance comme *Faecalibacterium prausnitzii* et des espèces *Roseburia* ou *Lachnospiraceae*. La dysbiose influence aussi les traitements mis en place contre les MICI. Cette revue vise à résumer les facteurs inducteurs de dysbiose conduisant à une MICI ainsi que les stratégies mises en place pour traiter ces maladies.

Anomalies du microbiote au cours des MICI

◆ Microbiote bactérien

Il est difficile de déterminer si les modifications du microbiote observées chez les patients atteints de MICI sont des causes ou des conséquences de la maladie. Néanmoins, on a pu observer une plus faible diversité de populations bactériennes au sein du microbiote lors d'une MICI. Deux groupes ont ainsi été identifiés : les bactéries protectrices et les aggravantes (2). Les bactéries protectrices ont tendance à induire une tolérance immunitaire, comme dans le cas de l'espèce bactérienne *Faecalibacterium prausnitzii*, très documentée. D'autres espèces sont retrouvées dans ce groupe, telles que les *Lachnospiraceae*, les *Roseburia*, les *Sutterella* ou les *Bifidobacterium*. Toutes ces bactéries sont très souvent moins représentées en cas de MICI. À l'inverse, on note une forte augmentation des bactéries aggravantes dans les MICI. Les plus étudiées sont l'espèce *Escherichia coli* adhérente et invasive (ECAI), retrouvée chez 30 à 40 % des patients atteints d'une MC, et l'espèce *Enterococcus faecalis*, également impliquée dans l'aggravation des MICI. La première induit une sécrétion de l'interféron γ , alors que la seconde détériore la barrière épithéliale. Même si leurs mécanismes restent moins connus, d'autres bactéries sont davantage associées aux MICI, comme les *Proteobacteria*, *Ruminococcus gnavus* ou encore les *Fusobacterium*.

◆ Microbiote fongique

Peu étudié, le rôle des *Fungi* dans les MICI a récemment été identifié. Un premier indice était la présence de formes sévères de RCH en cas de polymorphisme du gène Dectin-1 codant pour un récepteur reconnaissant des motifs pariétaux de *Fungi*. Les propriétés anti-inflammatoires du fluconazole, un antifongique utilisé comme traitement chez les patients atteints de MICI, sont également un élément important. Une étude récente a démontré que la diversité des *Fungi* était modifiée dans la RCH mais pas dans la MC, à l'exception de *Candida albicans*, dont l'augmentation a également été confirmée chez des patients atteints d'une MC. En particulier, une augmentation des *Basidiomycota* parallèle à une diminution des *Ascomycota*

(*Saccharomyces cerevisiae*) suggère que le ratio de ces 2 groupes pourrait constituer un indice de dysbiose (5). Par ailleurs, les modifications du microbiote étaient associées à une dysbiose bactérienne. En particulier, une expansion de *Candida tropicalis* a été corrélée à celle de *E. coli* et de *Serratia marcescens* chez des patients atteints d'une MC (2).

◆ Microbiote viral

La présence de bactériophages possédant un cycle lysogénique peut modifier la virulence de certaines bactéries, conduisant potentiellement à une MICI. Ainsi, une augmentation de la diversité du virome et une expansion des bactériophages de l'ordre *Caudovirales* ont été observées chez des patients atteints de MICI (3). Par ailleurs, une revue de littérature sur le sujet a rapporté une étude sur modèle murin montrant que la mutation du gène ATG16L1 n'induisait des colites qu'en cas d'infection par le norovirus. La mutation de ce gène étant retrouvée chez des patients atteints d'une MC, les virus eucaryotes pourraient donc également être impliqués dans les MICI. Enfin, le cytomégalovirus (CMV) est détecté dans 4 à 16 % des cas au stade actif de la maladie, ce qui suggère un lien prononcé entre CMV et MICI. Bien que l'action des virus reste peu claire, il semble évident qu'ils ont un rôle à jouer dans l'apparition des MICI, et pourraient donc nécessiter un traitement antiviral particulier.

Intérêt diagnostique de l'analyse du microbiote dans les MICI

La RCH et la MC se différencient par la localisation de l'inflammation au niveau de l'intestin. On pourrait donc s'attendre à une différence dans le microbiote associé à ces maladies. Néanmoins, peu de données permettent, à l'heure actuelle, d'appuyer cette théorie. Une étude récente a cependant mis en évidence une plus forte dysbiose ainsi que des groupes de bactéries caractéristiques de la MC (6). Ainsi, les groupes *Faecalibacterium*, *Peptostreptococcaceae*, *Anaerostipes*, *Methanobrevibacter*, *Christensenellaceae*, *Collinsella* et, surtout, *Fusobacterium* et *Escherichia* seraient de bons marqueurs diagnostiques de la MC. Notons que

Mots-clés

MICI
Microbiote
Dysbiose
Traitement
Diagnostic

Summary

The intestinal microbiota plays a major role in shaping mucosal immune responses, as well as protecting the epithelium against external threats. Its composition varies from an individual to another, but has a common general composition that comprises *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. Dysbiosis is a key feature of inflammatory bowel diseases (IBD), which comprise ulcerative colitis and Crohn's disease. Recent advances in metagenomics have yielded substantial documentation on the nature of the IBD-associated microbiota and its alteration. Notably, reduced *Faecalibacterium prausnitzii* is well documented, as well as the reduction of the *Roseburia*, *Lachnospiraceae*, and the *Bifidobacterium* species. Moving from the point where dysbiosis is a mere observation, it can also be demonstrated that changes in dietary habits and lifestyle have a direct influence over the microbiota and the response to IBD treatments. In this review, we offer to briefly assess the causes of dysbiosis in IBD and its effect on current therapeutic strategies.

Keywords

IBD
Microbiota
Dysbiosis
Treatment
Diagnosis

les cholangites sclérosantes primitives (CSP) sont associées dans 80 % des cas à une MICI (CSP-MICI). Des études portant sur le contenu du microbiote des CSP-MICI ont cherché à savoir si des liens pouvaient être établis avec les MICI. L'une d'elles, assez représentative de la littérature sur le sujet, a montré que la dysbiose était différente dans les CSP-MICI et dans les RCH (7). Une augmentation de la représentativité des genres *Rothia*, *Enterococcus*, *Clostridium* et *Veillonella* dans les CSP-MICI par rapport à des sujets sains a été décrite. Cette augmentation n'est en revanche pas observée dans la RCH. À l'inverse, la RCH est caractérisée par un amoindrissement du microbiote en espèces *Akkermansia* et *Roseburia* qui n'est pas observé dans les CSP-MICI.

Facteurs inducteurs de dysbiose au cours des MICI

Une dysbiose est induite par la combinaison de plusieurs facteurs, soit intrinsèques à l'individu, soit extrinsèques. De très nombreux mécanismes sont associés aux dysbioses; nous ne retiendrons ici que ceux pouvant conduire à une MICI (4).

Génétique

Des mutations telles que les polymorphismes d'un seul nucléotide ont été identifiées comme des marqueurs de taxon pour certaines bactéries. Par exemple, les gènes VDR, LCT, FUT2 et NOD2 ont été décrits comme associés à la composition du microbiote. L'environnement génétique peut donc exercer une influence sur la composition du microbiote et être ainsi à l'origine d'une dysbiose (8). Une des premières preuves est le caractère héréditaire des MICI. Le risque d'être atteint de MC ou de RCH serait ainsi respectivement d'environ 5 et 2 % lorsqu'un membre de la famille au premier degré a présenté une de ces pathologies. Par ailleurs, les risques de MICI pour les descendants d'un individu ayant contracté une MICI peuvent aller jusqu'à environ 10 %. Des études d'association pangénomiques ont été réalisées afin de déterminer les polymorphismes liés aux MICI. Il en résulte que :

- de nombreux gènes de l'immunité, tels que MST1 (voie des macrophages) ou encore FUT (lymphocytes T helper 17), ont été décrits comme directement liés à un risque plus important de MICI;
- les mécanismes liés aux mutations génétiques facilitant les dysbioses sont complexes et, pour

certains, encore mal connus. Par exemple, le variant FUT agit indirectement sur l'immunité en entraînant une diminution du nombre de bactéries anti-inflammatoires et une augmentation de celui de bactéries impliquées dans les MICI par l'absence de groupements fucose dans la muqueuse intestinale (8);

- une grande partie des polymorphismes facilitant la MC sont différents de ceux retrouvés pour la RCH (9). Par exemple, la mutation du gène NOD2 est le principal facteur lié à l'apparition de la MC, alors qu'il n'y a pas de gènes prépondérants pour la RCH;
- enfin, notons que les mécanismes de modification épigénétique pourraient faire l'objet de plus amples recherches, puisque des liens avec les MICI ont été démontrés. Par exemple, la méthylation de l'ADN, les microARN et les modifications des histones semblent être impliqués dans le développement des MICI (10).

Alimentation

Les similarités dans l'organisation générale des microbiotes ont permis la définition d'entérotypes. L'entérotype *Bacteroides* est associé à une alimentation riche en protéines et graisses animales, alors que l'entérotype *Prevotella* apparaît lié à un régime riche en carbohydrates. Certains aliments ont donc tendance à favoriser la présence de bactéries plus propices à déclencher des MICI (10). Un régime alimentaire composé de fruits et légumes est ainsi associé à un risque plus faible de MICI qu'un régime à teneur élevée en graisses animales et en glucides. En outre, une forte corrélation entre le développement d'une RCH et l'absorption de graisses polyinsaturées a été mise en évidence. D'autres éléments ont été décrits comme exerçant une influence sur l'apparition des MICI, comme le fer, les vitamines A et B et certains additifs (des émulsifiants comme la carboxyméthylcellulose et le polysorbate 80 testés chez la souris) retrouvés dans le régime alimentaire occidental. Étant donné le rôle de l'alimentation sur le microbiote (11) et les récentes découvertes concernant le rôle des *Fungi* dans les MICI, l'étude de l'influence de l'alimentation sur les MICI via les *Fungi* mériterait d'être approfondie.

Infections

Une dysbiose peut résulter d'une infection ayant modifié les populations du microbiote. Une infection chronique de l'intestin peut aussi induire une inflam-

mation chronique conduisant à une MICI. Ces hypothèses sont difficiles à mettre en évidence, puisque le microbiote ne peut pas être isolé comme une culture pure. En outre, très peu de preuves contre des agents infectieux directement impliqués dans l'apparition de MICI sont recensées, mais quelques pathogènes sont régulièrement associés aux MICI (12). Des bactéries du genre *Mycobacterium* sont retrouvées très tôt chez certains patients atteints de MICI et peuvent servir de marqueurs de la maladie. D'autres bactéries du genre *Clostridium* sont présentes dans les stades actifs de la maladie, mais leur rôle reste à préciser. Par ailleurs, les entérobactéries sont plus fréquentes chez les patients atteints d'une MC (13). Le cas le plus représentatif reste *E. coli*, puisque *E. coli* O157:H7 provoque les symptômes cliniques des MICI et qu'on retrouve souvent de forts taux d'anticorps dirigés contre *E. coli* chez les patients atteints de MICI, ce qui suggère un lien prononcé entre la bactérie et la maladie.

Utilisation des antibiotiques

L'utilisation d'antibiotiques détériore la flore intestinale. Bien que des études soulignent le rétablissement rapide d'une flore stable, il apparaît de plus en plus évident que le microbiote n'est pas restauré tel qu'il était à l'état initial (14). Les antibiotiques à spectre large, comme la ciprofloxacine et la clindamycine, altéreraient la diversité des populations de *Bacteroides* après la fin du traitement, alors que l'amoxicilline diminuerait les populations de *Lactobacillus* ainsi que la sécrétion de peptides antimicrobiens. Ainsi, les traitements antibiotiques, même de courte durée, perturbent le microbiote sur le long terme et favoriseraient l'apparition de MICI, en particulier en cas de traitement chez les enfants de moins de 1 an.

Stratégies thérapeutiques

L'une des principales caractéristiques observées dans les MICI est la production croissante de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) favorisant la réorganisation de la réponse immunitaire vers un profil inflammatoire au détriment de l'induction de lymphocytes T régulateurs. Le TNF est donc l'une des premières cibles thérapeutiques, au travers d'anticorps bloquants, l'infliximab et l'adalimumab faisant partie des plus utilisés. À cela s'ajoutent des stratégies visant l'inhibition de la migration des effecteurs vers le site inflammatoire. Parmi celles-ci, le védolizumab est un

anticorps bloquant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, impliquée dans le *homing* des cellules T et B vers de la muqueuse. Enfin, la résection chirurgicale de la zone lésée est l'un des derniers ressorts thérapeutiques.

Les réponses du microbiote en termes de diversité et de métabolisme sont de bons prédicteurs de l'efficacité de ces choix sur le long terme : la production de n-butyrate, associée à un métabolisme carboné dépendant des acides gras, favorise la tolérance immunitaire et la production de mucine.

Dysbiose et efficacité thérapeutique

Plusieurs études ont recherché un lien entre dysbiose et succès thérapeutique des différentes stratégies. Le principal constat n'est pas un lien entre index de dysbiose et efficacité, mais une signature microbiologique commune aux non-répondeurs. Une première étude permet d'identifier la réduction du genre *Coprococcus* en association avec un profil non répondeur et pointe 3 genres bactériens reliés à la distinction entre répondeurs et non-répondeurs : *Coprococcus*, *Adlercreutzia* et *Dialister* (15). La réponse microbienne aux anti-intégrines (védolizumab) présente un net enrichissement de la diversité bactérienne, avec une réémergence de l'espèce *Roseburia inulinivorans* et des *Burkholderiales* (16). Ici encore, le genre *Dialister* et une espèce du genre *Bifidobacterium* sont associés au profil répondeur. À noter que la grande majorité des patients présentant une signature microbienne associée à la réponse aux anti-intégrines sont des patients atteints de MC. Des études similaires ont été menées sur les réponses aux thérapies anti-TNF. Chez les patients souffrant de MC, on trouve une élévation de la proportion des espèces *Bifidobacterium*, cette fois chez les non-répondeurs (17). Ici, c'est la réémergence des lactobacilles qui suggère une atténuation de la dysbiose. Dans la RCH, la qualité de la réponse aux anti-TNF semble dépendre du taux de *F. prausnitzii* présents avant traitement (18).

Plusieurs métabolites bactériens sont également nécessaires à l'efficacité thérapeutique. Une augmentation de la production d'acides gras à chaîne courte (dont le n-butyrate) et de l'activation des voies de synthèse des acides aminés branchés (*branched-chain amino acids* [BCAA]) est observée chez les patients atteints de MC ou de RCH répondeurs. Par ailleurs, la production de butyrate est associée à la rémission postchirurgicale. La chirurgie elle-même peut induire la dysbiose : la rechute peut être associée à un enrichissement de la flore en

Lachnospiraceae anaérobies. De plus, la différence de la flore au-dessus et au-dessous de l'anastomose est associée à la rechute postopératoire. À l'inverse, les groupes *Bacteroides*, *Dorea* et *Dialister* sont associés à la rémission, en particulier si la similarité entre ces 2 sites est élevée (19).

Un profil favorable à la rémission est donc non seulement lié à l'abondance de certaines espèces bactériennes, mais aussi à leur capacité à sécréter différents métabolites, générant un terrain favorable à la thérapie choisie. Le constat général de ces différents travaux est la valeur prédictive de la composition précoce de la flore pour l'entrée en rémission et le suivi à long terme.

Traitements à l'essai

◆ Thérapie nutritionnelle

La dysbiose, qui caractérise les MICI, entraîne un changement métabolique : les souches jusqu'alors minoritaires y trouvent des conditions de croissance favorables via l'utilisation de la mucine comme source carbonée (20). Un régime pauvre en fibres favorise la croissance de ces souches mucolytiques. Ces fibres, dont l'amidon, stimulent en effet la fermentation bactérienne de la flore. En réponse, celle-ci produit le n-butyrate qui entraîne la diminution des taux d'interleukines 6 et 12 ainsi que l'induction de lymphocytes T régulateurs (21). Un régime de faible index glycémique favorise la réduction des taux sériques de TNF α et d'interleukine 6. Il y a également un lien direct entre l'alimentation et l'efficacité des thérapies anti-TNF (20). À l'inverse, les déficiences en vitamine D, la consommation d'acides gras saturés et le surdosage en fer contribuent au développement de la colite (21, 22). La maltodextrine (aspartame, sucralose), le gluten et la consommation de viande rouge, caractéristiques de l'alimentation occidentale, sont également des facteurs aggravants. Leurs effets peuvent être atténués par un fort apport en amidon ; ainsi, la consommation de légumineuses s'accompagne d'une réduction des symptômes (22). Dans la pratique, il semble cependant que seule la nutrition entérale ait un effet (soit délétère, soit bénéfique). La technique ne semble cependant pas permettre une rediversification de la flore mais plutôt de ses métabolites. La dysbiose influence le succès de cette stratégie, d'autant que celle-ci tend souvent à réduire la diversité bactérienne en dépit de son efficacité. Suivant les études, on trouve une réduction de *F. prausnitzii* et des commensales *Bifidobacterium* et *Ruminococcus* (23).

◆ Probiotiques

Les probiotiques sont des organismes non pathogènes vivants, dont l'objectif est la repopulation de la muqueuse. Ils ont des effets positifs sur l'équilibre de la flore commensale, le profil inflammatoire de la muqueuse et l'absorption des nutriments. Il n'y a pas encore de consensus au sujet de leur utilisation dans le traitement de la RCH : une récente méta-analyse des différents travaux sur le sujet montre en effet une association significative entre la prise de probiotiques et la rémission (24). Tant pour la RCH que la MC, les probiotiques favorisent la rémission des patients recevant des corticostéroïdes. Ils sont également associés à la rémission postchirurgicale dans la RCH, mais pas dans la MC (24, 25). Plusieurs formulations existent pour les probiotiques : lactobacilles seuls ou combinés avec *Saccharomyces boulardii*, ou encore lactobacilles et bifidobactéries. Cette dernière association a un fort potentiel d'évolution vers la rémission dans la RCH ou dans les suites d'une chirurgie (24, 25). Il semble qu'il faille une combinaison de ces formulations pour induire des effets significatifs dans la prise en charge d'une MC. Il manque, pour confirmer ce constat, des études de suivi à long terme. Les probiotiques peuvent avoir un effet bénéfique sur les MICI, mais l'hétérogénéité des essais conduits et des résultats obtenus nécessite une plus ample analyse. Il est par ailleurs nécessaire de catégoriser les effets obtenus selon les stratégies thérapeutiques choisies et dans des suivis à très long terme.

◆ Traitement par les immunoglobulines

Une des plus récentes avancées dans la recherche sur le traitement des MICI est l'administration orale d'immunoglobulines. Une étude pilote menée chez des enfants atteints de MC permet de comparer les effets de la nutrition entérale et l'administration d'immunoglobulines G par voie orale (OHIG). Si les effets des 2 traitements se révèlent positifs, l'OHIG permet non seulement la cicatrisation de la muqueuse, mais aussi, et surtout, la réduction de la perméabilité intestinale (26). Les immunoglobulines A étant responsables de la sélection de la flore, il semble intéressant de choisir celles-ci pour traiter la dysbiose. L'équipe qui a travaillé sur le sujet avait précédemment utilisé cette stratégie pour le traitement de la MC avec un succès mitigé. En revanche, les immunoglobulines A sécrétoires ont été brevetées dans le traitement oral des infections à *Clostridium difficile*, des allergies et intolérances alimentaires et de la maladie cœliaque. Peu de travaux

s'intéressent à cette option pour le traitement des MICI ; or, elle offre une voie thérapeutique physiologique et peu invasive qui mérite une plus ample investigation (27).

◆ Transplantation fécale

Les très bons résultats du traitement des colites à *Clostridium difficile* offrent de nouvelles pistes thérapeutiques. Cependant, les transplantations de microbiote fécal (TMF) dans le contexte des MICI induisent des poussées aiguës de la maladie. Une amélioration des taux de rémission est possible chez les patients atteints de RCH transplantés. Des essais soulignent la nécessité de l'adéquation entre la flore du donneur et celle du patient (28). Il y a en revanche peu d'éléments qui soutiennent l'intérêt d'une TMF chez les patients souffrant de MC. Elle semble plus intéressante dans le traitement de la forme pédiatrique de la maladie (29).

Conclusion

L'association entre MICI et dysbiose est la résultante d'un ensemble de facteurs environnementaux, génétiques et culturels. L'articulation entre ces différents composants reste mal comprise, notamment en ce qui concerne le lien entre environnement (alcool,

tabagisme), dysbiose et MICI. Toutefois, les nombreuses avancées en matière d'étude du microbiote et de tests génétiques ont permis d'isoler les comportements et les facteurs de risque. Ces éléments indiquent qu'il est possible de réguler les populations bactériennes de l'intestin en combinant les traitements immunosuppresseurs, les probiotiques et une hygiène de vie favorisant la croissance de souches tolérantes. L'idée est de proposer un traitement permettant à l'organisme de retrouver naturellement son état optimal. Cette vue doit être contrebalancée par :

- les défauts génétiques, qui ne sont à ce jour pas compensables ;
- l'influence du microbiote initial sur l'efficacité thérapeutique ;
- l'importante variabilité des réponses aux nouvelles approches, qui impose des stratégies thérapeutiques individualisées.

La MC et la RCH sont aujourd'hui bien caractérisées sur le plan immunitaire ; les interactions entre le système muqueux et la flore commensale constituent maintenant l'enjeu principal de la recherche sur les MICI. Il est cependant certain, au vu du nombre croissant de cas de MICI, que la prise en charge de ces maladies doit inclure une réflexion sur l'hygiène de vie et l'alimentation liées à l'industrialisation.

Les deux premiers auteurs
Éva Michaud et Rémi Gayet
ont contribué à parts égales
à la rédaction de cet article.

Les auteurs déclarent ne pas avoir
de liens d'intérêts.

Références bibliographiques

1. Kaplan CG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:720-7.
2. Sartor RB, Wu GD. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. *Gastroenterology* 2017;152:327-39.e4.
3. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 2015;160:447-60.
4. Weiss GA, Hentzel T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:2959-77.
5. Sokol H, Leducq V, Aschard H et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2017;66:1039-48.
6. Pascal V, Pozuelo M, Borrue N et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 2017;66:813-22.
7. Bajer L, Kverka M, Kostovcik M et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2017;23:4548-58.
8. Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat Rev Genet* 2017;18:690-9.
9. Zoetendal EG, de Vos WM. Effect of diet on the intestinal microbiota and its activity. *Curr Opin Gastroenterol* 2014;30:189-95.
10. Rapozo DCM, Bernardazzi C, de Souza HSP. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World J Gastroenterol* 2017;23:2124-40.
11. Sam QH, Chang MW, Chai LY. The fungal mycobiome and its interaction with gut bacteria in the host. *Int J Mol Sci* 2017;18 pii:E330.
12. Mann EA, Saeed SA. Gastrointestinal infection as a trigger for inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28:24-9.
13. De Hertogh G, Geboes K. Crohn's disease and infections: A complex relationship. *MedGenMed* 2004;6:14.
14. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:630-8.
15. Shaw KA, Bertha M, Hofmekler T et al. Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: a longitudinal study of pediatric subjects with newly diagnosed inflammatory bowel disease. *Genome Med* 2016;8:75.
16. Ananthakrishnan AN, Luo C, Yajnik V et al. Gut microbiome function predicts response to anti-integrin biologic therapy in inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* 2017;21:603-10.e3.
17. Ding NS, Perdonis-Montero A, Sarafian M et al. P787 The microbiota and its role in anti-TNF therapy non-response. *J Crohns Colitis* 2017;11(suppl. 1):S482-3.
18. Magnusson MK, Strid H, Sapnara M et al. Anti-TNF therapy response in patients with ulcerative colitis is associated with colonic antimicrobial peptide expression and microbiota composition. *J Crohns Colitis* 2016;10:943-52.
19. Mondot S, Lepage P, Seksik P et al. Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn's disease remission after surgery. *Gut* 2016;65:954-62.
20. Andersen V, Hansen AK, Heitmann BL. Potential impact of diet on treatment effect from anti-TNF drugs in inflammatory bowel disease. *Nutrients* 2017;9:286.
21. Sarbagili-Shabat C, Sigall-Boneh R, Levine A. Nutritional therapy in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:303-8.
22. Tasson L, Canova C, Vettorato MG, Savarino E, Zanotti R. Influence of diet on the course of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2017;62:2087-94.
23. MacLellan A, Connors J, Grant S et al. The impact of Exclusive Enteral Nutrition (EEN) on the gut microbiome in Crohn's disease: A review. *Nutrients* 2017;9:447.
24. Ganji-Arjenaki M, Rafieian-Kopaei M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J Cell Physiol* 2018;233:2091-103.
25. Derwa Y, Gracie DJ, Hamlin PJ, Ford AC. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2017;46:389-400.
26. Sundqvist T, Stenhammar L, Tjellström B, Magnusson KE, Forslund T, Högberg L. Oral immunoglobulin treatment improved intestinal permeability in children with active Crohn's disease. *Acta Paediatr* 2017;106:647-53.
27. Simon MR. Treatment of celiac disease. C. difficile infection, food intolerance and food allergy with secretory IgA/IgM. <http://www.google.com/patents/US20160319039>
28. Allegretti J, Eysenbach LM, El-nachef N, Fischer M, Kelly C, Kassam Z. The current landscape and lessons from fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: past, present, and future. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23:1710-7.
29. Bak SH, Choi HH, Lee J et al. Fecal microbiota transplantation for refractory Crohn's disease. *Intest Res* 2017;15:244-8.

Travaux annexes

Participation aux études :

1. Rochereau N, Roblin X, Michaud E, **Gayet R**, Chanut B, Jospin F, Corthésy B, Paul S. **NOD-2-dependent influence of secretory IgA complexes in inducing GALT inflammation in Crohn's disease**. Article soumis à Science Translational Medicine
2. Rochereau N et al. **Essential role of TOSO/FAIM3 in intestinal IgM reverse transcytosis**. Article en cours de rédaction en vue de soumission à Mucosal Immunologie.

Communications orales/affichées:

1. **Gayet R.**, Bioley G, Rochereau N., Paul S., Corthésy B. **Secretory IgA: A new vaccine vector for vaccination against enteric diseases**. *Vaccines for enteric diseases (VED)*. Albufeira, Portugal, 2017.
2. **Gayet R.**, Bioley G, Rochereau N, Corthésy B, Paul S. **Etude d'une nouvelle stratégie vaccinale contre *Salmonella* par voie muqueuse**. *Journée scientifique de l'ARCI*. L'Isle d'Abeau, France, 2016.
3. **Gayet R.**, Bioley G, Rochereau N, Corthésy B, Paul S. **A novel strategy for a mucosal vaccine against *Salmonella***. *Journée de l'Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé (IFRESIS)*. Saint-Etienne, France, 2016.

Activité de monitorat pour les premières années de licence biologie cellulaire à la faculté de Sciences et Techniques. Saint-Etienne, France, 2014-2017.

1 **NOD2-dependent influence of secretory IgA complexes in inducing GALT**
2 **inflammation in Crohn's disease**

3

4 **Authors :** Nicolas Rochereau^{1,2}, Xavier Roblin², Eva Michaud², Rémi Gayet², Blandine Chanut²,
5 Fabienne Jospin², Blaise Corthésy³ & Stéphane Paul^{2*}

6 **Affiliations:**

7 ¹ MRC Human Immunology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe
8 Hospital, Oxford, UK ;

9 ² GIMAP/EA3064, Université de Lyon, CIC 1408 Vaccinology, F42023 Saint-Etienne, France;

10 ³R&D Laboratory of the Division of Immunology and Allergy, CHUV, Centre des Laboratoires
11 d'Épalinges, 1066 Épalinges, Switzerland

12

13 * Corresponding author: Stéphane PAUL ; stephane.paul@chu-st-etienne.fr

14 Faculté de médecine de St-Etienne, Laboratoire GIMAP

15 10 rue de la Marandière, 42270 St Priest-en-Jarez

16 Tel: +33 (0) 4 77 42 14 84; Fax: +33 (0) 4 77 42 14 86

17

18 **Keywords:** Crohn's disease / secretory IgA / retrograde transport / Microfold cells / *NOD2*

19

20 **One Sentence Summary:** Rochereau *et al.* have improved the understanding of the IgA reverse
21 transcytosis mechanism and its role in CD. An increased transport of IgA in CD patients with *NOD2*
22 frameshift compared to CD patients without *NOD2* mutation and/or healthy individuals is observed.
23 *NOD2* affects the IgA transport across human and mouse M cells by downregulating Dectin-1 and
24 Siglec-5 expression in M cells, previously identified to act as co-receptors in retrograde transport.

25

26 **Abstract :** Intestinal microfold cells (M cells) are the primary pathway for translocation of secretory
27 IgA (SIgA)-pathogen complexes to gut-associated lymphoid tissue (GALT). Uptake of secretory
28 IgA/commensals complexes is important for priming adaptive immunity in the mucosa. This study aims
29 to explore the effect of SIgA retrograde transport of immune complexes in Crohn's disease (CD). A
30 significant increase of SIgA transport in CD patients with *NOD2*-frameshift compared to CD patients
31 without *NOD2* mutation and/or healthy individuals has been observed. *NOD2* has a direct effect in the
32 IgA transport through human and mouse M cells by downregulating Dectin-1 and Siglec-5 expression,
33 two receptors involved in retrograde transport. These findings define a new mechanism of *NOD2*-
34 mediated regulation of mucosal responses to intestinal microbiota, which is involved in CD intestinal
35 inflammation and dysbiosis.

36

37 **Introduction**

38 The ability of the host immune system to discriminate between pathogens and commensals is essential
39 to maintain mucosal homeostasis (1, 2). The critical importance of maintaining a mucosal homeostatic
40 mechanism in the intestine is highlighted when functional or genetic deficiencies exist. An example of
41 such failure in maintaining finely balanced immune response is the development of chronic intestinal
42 inflammation, such as Crohn's disease (CD). CD is an idiopathic, chronic regional enteritis that most
43 commonly affects the terminal ileum but has the potential to affect any part of the gastrointestinal tract
44 from mouth to anus. CD is thought to occur as a result of breakdown in self-recognition of commensal
45 bacteria together with mucosal barrier dysfunction in individuals with a given genetic background (3,
46 4). The most strongly associated genetic risk factor for CD in Western populations remains NOD2, an
47 intracellular pattern recognition receptor important in immune defense against intracellular microbes (5,
48 6). NOD2 is known to regulate the intestinal barrier function, limiting the transcellular permeability and
49 bacterial translocation (7, 8). The CD-associated frameshift mutation in *NOD2* (Leu1007fsinsC,
50 Gly908Arg, and Arg702Trp) (8), located within the LRR region of the protein, results in loss of NF- κ B
51 activation in response to muramyl dipeptide (MDP). However, the reasons why inactivation of *NOD2*
52 can result in chronic colitis remain largely speculative.

53 Secretory IgA (SIgA), the most abundantly secreted antibody isotype in mammals, has long been
54 recognized as a first line of defense in protecting the intestinal epithelium from enteric pathogens and
55 toxins (9–12). Recognition of enteric pathogens by the intestinal immune system results in the
56 production of high affinity, T-cell-dependent, pathogen-specific IgA, which is “transcytosed” into the
57 intestinal lumen. In recent years, evidence has emerged indicating that SIgA2, promotes the uptake and
58 delivery of antigens (Ags) from the intestinal lumen to dendritic cell (DC) subsets located in gut-
59 associated lymphoid tissues (GALTs), and influences inflammatory responses normally associated with
60 the uptake of highly pathogenic bacteria and potentially allergenic Ags (13). This particular feature of
61 SIgA, called retrograde transport (or reverse transcytosis), is mediated by epithelial M cells (14–17).
62 Both the C α 1 domain of SIgA2 and its associated Sialic acid (Sia) residue glycosylation are involved in
63 M-like cell-mediated reverse transcytosis. Dectin-1 and Siglec-5 have been identified as essential
64 receptors for SIgA uptake on M-cells (15). Finally, Dectin-1/Siglec 5-mediated uptake of SIgA-based

65 complexes results in productive mucosal and systemic Ags-specific Ab responses (15). However,
66 although the potentially useful properties of M cells on SIgA uptake are now well known, the regulation
67 and pathway(s) whereby SIgA is transported across M cells remains elusive.

68 Increase of the intestinal permeability has for many years been recognized as a pathogenic factor in
69 CD. An abundance of clinical, epidemiologic, and animal model studies have assessed the impact of
70 various commensal and potentially pathogenic enteric bacteria that may trigger or exacerbate IBD (18–
71 20). In a population-based cohort study, an increased risk of IBD was demonstrated in individuals
72 notified in laboratory registries with an episode of *Salmonella* gastroenteritis (21). This finding promotes
73 the concept that pathogens that cause acute intestinal inflammation may predispose individuals to later
74 development of CD, perhaps by causing initial intestinal inflammation or alterations of the intestinal
75 microbiota to promote the formation of colitogenic microbes. We hypothesized that initiation and/or
76 perpetuation of the mucosal inflammation observed in CD patient is due to an increasing transport of
77 IgA-pathogen complexes from lumen to Peyer’s patches (PP) immune cells through M cells. Indeed,
78 after reverse transcytosis, bacteria-IgA complexes are taken up by CD11c⁺ DCs, and can induce
79 inflammatory responses (14, 15). Moreover, intestinal bacteria selected on the basis of high coating with
80 IgA conferred dramatic susceptibility to colitis in germfree mice (22, 23). The earliest observable CD
81 lesions are reported to occur in the follicle associated epithelium (FAE), where M cells are abundant
82 (24), where the PPs are more numerous, and where IgA2 predominates (25). *NOD2* mutations associated
83 with CD primarily predispose to the development of lesions in the ileal compartment (26), indicating
84 that disease susceptibility is increased by altering signaling interactions between intestinal microbiota
85 and the mucosal innate immunity. Hence, we next hypothesized that *NOD2* regulates IgA retrograde
86 transport might explain the dysregulation observed in patients with *NOD2* frame shift mutations.

87 We observe an increasing transport of IgA in human PP biopsies obtained from CD patients with or
88 *NOD2* frameshift mutations. We demonstrate that *NOD2* has a regulatory effect in the IgA transport
89 through human and mouse M cells by decreasing the Dectin-1 and Siglec-5 expression on M cells,
90 already identified to act as co-receptors in this process. Our findings define a new mechanism of *NOD2*-
91 mediated regulation of innate immune responses to intestinal microbiota which is involved in the
92 initiation and/or perpetuation of the mucosal inflammation observed in CD patients.

93 **Results**

94 ***NOD2* mutation significantly increases SIgA reverse transcytosis in Crohn's disease patients**

95 We initially examined whether the transport of SIgA was modified as a consequence of the disease, and
96 second refined the analysis to samples collected from CD patients with or lacking *NOD2* mutations. To
97 address this question, terminal ileum PP biopsies from healthy (n=8) or CD (n=20) patients were either
98 taken up to determine their *NOD2* genotypes or were processed to quantify the number of SIgA-positive
99 cells in analyzed tissues. The mean fold-increase of SIgA-positive cells per PP was 2.8 in CD patients
100 expressing *NOD2* frame shift polymorphisms (n=10) compared to healthy individuals (n=8) and CD
101 patients expressing wild type (WT) *NOD2* (n=10). [The colocalization between IgA and DC-SIGN](#)
102 [observed in figure 1a clearly show that counted SIgA-positive cells come from a retrograde transport of](#)
103 [IgA through M cells and an uptake by dendritic cells.](#) This increase is not observed in segments of the
104 intestine lacking PPs (**Fig. 1a and b**). Weak differences in numbers of SIgA-positive cells were
105 measured in patients displaying variant *NOD2* polymorphisms R702W (n=4) or FS1007insC (n=3) or
106 R702W/G908R (n=3) (data not shown). The sum of the data demonstrates an increase in PP-associated
107 SIgA in the subset of CD patients displaying mutated *NOD2* gene solely.

108

109 ***NOD2* deficiency significantly increases IgA retrograde transport in murine Peyer's patches**

110 In the absence of *NOD2*, PPs present a higher level of CD4⁺ T cells and M cells in the FAE and increased
111 levels of Th1 (IFN- γ , TNF- α and IL-12) and Th2 (IL-4) cytokines. These immune alterations are
112 associated with an increase of paracellular permeability and yeast/bacterial translocation. Hence, we
113 next hypothesized that at steady-state, the dysregulation observed in CD patients with *NOD2* frame shift
114 mutations may favor SIgA reverse transcytosis, and ultimately leads to excessive uptake of bacteria-
115 SIgA complexes.

116 To this aim, we sought to determine whether the loss of *NOD2* expression affected transport of SIgA in
117 a *NOD2* knock-out (KO) mouse model. Transport of fluorescently labeled SIgA was compared between
118 *NOD2* KO mice and WT mice by examining the fate of the antibody molecule after administration into
119 a ligated intestinal loop containing a PP. As observed in human biopsy samples obtained from subjects
120 with frame shift mutations, the mean fold-increase (2.3) of SIgA transport from lumen into the PP in

121 *NOD2* KO mice (112.4 ± 14.5) was significantly different when compared to WT mice (49.4 ± 7.6)
122 (**Fig. 2a and b**). Cy3 administered per se in the ligated intestinal loop did not yield any fluorescent
123 signal in tissue sections (data not shown).

124 Oral administration of HIV p24 in association with SIgA to WT mice leads to the generation of a robust
125 immune response against the viral antigen. In this experimental setting, SIgA serves as a delivery system
126 carrying an intact HIV p24 antigen into intestinal M cells in PPs. We thus speculated that the increased
127 retro-transport of SIgA observed in *NOD2* KO mice would result in improved p24-specific reactivity
128 after oral immunization as compared to WT mice. As immunization along the oral route is well known
129 to induce both systemic and mucosal responses, serum and feces samples were collected 1 week after
130 the last immunization. At the antibody level, p24-specific serum IgG and fecal IgA titers were
131 significantly increased in *NOD2* KO mice as compared to WT mice (**Fig. 2b and 2c**). Oral delivery of
132 equivalent amounts of p24 alone resulted in much weaker specific antibody responses in either KO or
133 WT animals, confirming the contribution of SIgA in the process (**Fig. 2b and 2c**). Because the local
134 tissue-dependent nature of immune responses relies highly on the controlled production of cytokines, a
135 panel of them was measured by Luminex in serum and feces obtained 24 h after the last immunization.
136 In comparison with p24 alone, p24-SIgA was a potent inducer of all the tested cytokines in serum but
137 also TNF- α , INF- γ and IL-17 measured in feces of *NOD2* KO mice (**Fig. 2d**). Control immunization
138 with SIgA alone showed no effect on the production of cytokines. Except for IL-10, no difference in
139 cytokine secretion was observed between WT and *NOD2* KO mice. The increase of IL-10 in serum after
140 immunization with p24-SIgA in the *NOD2* KO mice may indicate regulation of the systemic
141 inflammatory process following initial priming of the specific Th cell response. Taken together, these
142 results indicate that transport of p24-SIgA complexes is dependent on functional *NOD2* and results in
143 the regulated passage of the hooked Ag, which is subsequently processed to trigger the onset of mucosal
144 and systemic antibody and cytokine responses.

145

146 **SIgA-Salmonella immune complexes amplify Salmonella-induced colitis in mice.**

147 The demonstration that SIgA reverse transcytosis in *NOD2* KO mice favors the transport of a bound Ag,
148 as reflected by the detection of specific immune responses, suggests that such a mechanism may be

149 involved in the pathogenesis of chronic colitis. To address this hypothesis, KO mice displaying opposed
150 effects on intestinal SIgA retrograde transport (i.e. *NOD2* KO mice identified as promoting intestinal
151 retrograde transport (this study), and *Dectin-1* KO mice known to abrogate reverse transcytosis (15))
152 were used and compared with WT animals. The disease condition was triggered upon administration of
153 dextran sodium sulfate (DSS) in drinking water (positive control), or after oral delivery of *Salmonella*
154 Typhimurium alone (*Salmonella*-induced colitis model) or in association with murine *Salmonella*-
155 specific SIgASa14 (working hypothesis). In control experiments (**Supplementary Fig. 1ed**), oral
156 administration of the Dectin-1 antagonist laminarin, known to suppress the development of DSS-colitis
157 (28), was used to further verify the impact of SIgA retrograde transport inhibition.

158 In comparison with the PBS control group, oral administration of *Salmonella* alone in WT mice resulted
159 in a significant increase of inflammation severity, as determined by the measurement of the Disease
160 Activity Index (DAI) (**Fig. 3a**). Oral delivery of *Salmonella*-SIgASa14 complexes led to a weak, yet
161 statistically significant further increase in DAI at day 5 (**Fig. 3a**). DSS-treated WT mice showed the
162 highest symptoms of disease. Blocking of Dectin-1, and thus reduction of SIgA reverse transcytosis by
163 addition of laminarin in the drinking water, markedly decreased the severity of colitis. In support of our
164 working hypothesis, *NOD2* KO mice with increased SIgA reverse transcytosis and thus higher intestinal
165 translocation of *Salmonella* exhibited a DAI resembling that of DSS-treated animals (**Fig. 3a**), well
166 above the index observed in the *Salmonella* alone condition. Such a colitis-preventing effect was
167 impaired upon delivery of laminarin to mice (**Fig. 3a**). The “clinical” progression of colitis was also
168 evaluated by visualization of neutrophil infiltration in the *lamina propria* (**Fig. 3b**), where the severity
169 of infiltration is indicated by the number and thickness of the arrows, by measuring weight loss
170 (**Supplementary Fig. 1a**) and serum IL-6 and Lipopolysaccharide (LPS) (**Supplementary Fig. 1b**), all
171 markers indicative of the ongoing inflammatory process. The high systemic inflammation measured
172 with LPS in *Salmonella*-IgA group could reflect the IgA-based translocation incidence of *Salmonella*
173 through the intestinal epithelium. The *NOD2*-mediated increased transport of SIgA-*Salmonella* was
174 observed using a fluorescently labeled *Salmonella* bound with SIgA administered into a ligated intestinal
175 loop containing a PP in *NOD2* KO mice and WT mice (Supplementary Fig 1c). Results obtained by
176 blocking Dectin-1 by addition of laminarin in the drinking water were similar by using *Dectin-1* KO

177 mice (**Supplementary Fig. 1ed**) and are consistent with previous reports (28). Thus, SIgA reverse
178 transcytosis plays a critical role in colitis induction by a *NOD2*-mediated increased transport of
179 pathogens.

180

181 ***NOD2* modulates the expression of Dectin-1 and Siglec-5 receptors involved in IgA reverse**
182 **transcytosis**

183 In the mouse intestine, selective IgA reverse transcytosis across the epithelium has been shown to
184 depend on the expression of Dectin-1 and to a lesser extent Siglec-5 on M cells (15). IgA reverse
185 transcytosis can be recapitulated in the in vitro model of FAE comprising human polarized Caco-2 cells
186 and M-like cells. Traditional transport (transcytosis) across polarized epithelial of serosal polymeric IgA
187 into secretions requires polymeric Ig receptor and a plethora of evolutionary well-conserved intracellular
188 proteins including EEA-1, Rab-5, Rab-9, Rab-11, Rab-17, Rab-25. Because the regulation of vesicle
189 trafficking along the retro-transcytotic pathway is unknown, we found it important to determine whether
190 *NOD2* may somehow contribute to fine-tune the expression of either one of the two receptors and/or the
191 putative organelle-specific proteins.

192 In order to address the nature of proteins possibly involved, we took advantage of the *in vitro* model of
193 FAE. In the absence of M-like cell conversion, the plain Caco-2 cell polarized monolayer (mono-culture)
194 allowed weak retrotranscytosis of the reporter IgA-luciferase fusion protein (IgA-Luc), in agreement
195 with previous data (15). This background level was not affected after transfection with siRNA targeting
196 a selection of extra- and intracellular proteins, as indicated in Fig. 4a. In the presence of interspersed M-
197 like cells in the polarized monolayer (co-culture), SIgA reverse transcytosis of IgA-Luc was increased
198 by a factor of 4 (Fig. 4a, lanes control and random oligoNT). Among the candidate assayed, targeting
199 of EEA-1, Rab-5, Rab-17, as well as SYK and TAK1 proteins involved in Dectin-1 signaling pathway
200 led to a significant 3-fold decrease of SIgA-Luc transport, as compared to controls (**Fig 4a**). This
201 decrease compares with that resulting from the targeting of Dectin-1 and Siglec-5 used as positive
202 controls. A significant 2-fold increase of IgA transport in cells treated with *NOD2* siRNA, together with
203 a significant 3-fold decrease after MDP-PAM treatment confirm the implication of *NOD2* in the process
204 of transcytosis, and indirectly validates the results obtained via the FAE model (**Fig 4a**). Quantitative

205 RT-PCR was performed to correlate the decrease of *NOD2* mRNA level and its expected increase after
206 MDP/PAM treatment, (**Supplementary Fig. 2b**). In additional control experiments, both the decrease
207 in the level of targeted proteins and the monolayer integrity (TEER) were systematically monitored after
208 siRNA transfection (**Supplementary Fig. 2c**). No significant modifications between controls,
209 knockdown and stimulated cells were observed (**Supplementary Fig. 1e**). Staining of tight junctions
210 using ZO-1 detection confirmed the monolayer integrity after siRNA transfection (**Supplementary Fig.**
211 **2d**).

212 To identify if EEA-1, Rab-5, Rab-17, Dectin-1 and Siglec-5 are key partners in IgA reverse transcytosis,
213 IgA2 was added apically in the *in vitro* model of FAE for 30 or 60 min, and IgA2-associated proteins
214 complexes were recovered after immunoprecipitation with protein M-agarose beads. Association
215 between IgA2 and EEA-1, Rab-5, Rab-17, Dectin-1 and Siglec-5 was revealed by immunodetection
216 with a battery of specific antibodies (**Figure 4b**).

217 The role of *NOD2* in modulation of protein expression associated with SIgA reverse transcytosis was
218 investigated next. The *in vitro* model containing M-like cells (co-culture) or not (mono-culture) was
219 used as such, or following of *NOD2* knockdown with siRNA. Proteins were recovered from whole cell
220 lysates and their relative abundance was assessed by Western blot (**Fig. 5a**). The expression of Dectin-
221 1 and Siglec-5 was significantly increased after *NOD2* knockdown, whereas no relevant changes were
222 observed upon analysis of the endosomal proteins tested. MDP-PAM treatment led to a barely detectable
223 decrease of expression of the two IgA receptors (**Fig. 5b**). When examining specifically the expression
224 of Dectin-1 and Siglec-5 in GP2⁺ M-like cells, as tested by flow cytometry, a consistent 3-fold increase
225 of either receptor occurred in *NOD2* knockdown cells was confirmed as compared to unconverted cells
226 with an enterocyte phenotype (**Fig. 5c**). In support of data in Fig. 5b, MDP-PAM treatment did not result
227 in any significant changes in expression of either receptor. Dectin-1 and/or Siglec-5 expression has not
228 been detected on enterocytes. [This observation has been confirmed in NOD2 KO mice where Dectin-1](#)
229 [expression is increased on Peyer's patches M cells compared to WT mice \(Fig. 5d\)](#). The sum of the data
230 implicates *NOD2* in M-like cells as the plausible player involved in Dectin-1 and Siglec-5-mediated
231 facilitated retrograde transport of IgA across a tight epithelial mimic.

232

233 **Discussion**

234 So far, the mechanisms involved in the loss-of-function polymorphisms on downstream *NOD2* signaling
235 and the pathogenesis of CD remain largely unknown. A commonly recognized finding is that defects in
236 *NOD2* result in a constitutively weak inflammatory response that can lead to increased intestinal
237 bacterial load and with time to chronic intestinal inflammation observed in CD (5, 29). Here we
238 demonstrate for the first time that the initiation and/or perpetuation of the mucosal inflammation
239 observed in CD patients is mainly due to an increased transport through M cells of IgA-bacteria
240 complexes from the lumen to immune cells present in the PP. First, we found that IgA reverse
241 transcytosis was significantly increased through human (**Figure 1**) and mouse (**Figure 2**) M cells when
242 *NOD2* is mutated or absent. At steady state, *NOD2* seems to down-regulate the IgA retrograde
243 transcytosis through M cells. In CD or colitis mouse models, the absence of *NOD2* could increase the
244 transport of IgA-bacteria complexes inducing mucosal inflammation. It is well established that
245 polymorphism of the *NOD2* gene is a major risk factor in CD. However, a molecular explanation of how
246 such loss of function leads to increased susceptibility to CD remains unclear. Hedl *et al.* have shown
247 that *NOD2* signaling activates the mTOR pathway which induce the upregulation of anti-inflammatory
248 mediators and simultaneously the downregulation of pro-inflammatory cytokines (30). These data
249 support the idea that *NOD2* modulates innate immune responses to intestinal microflora and thus suggest
250 that the absence of such regulation leads to increased susceptibility to CD.

251 The role of the IgA reverse transcytosis in the pathogenesis of chronic colitis was identified in Dectin-
252 1 KO mice and WT mice using the well-known *Salmonella* colitis model (31). Dectin-1 signalling has
253 been described to regulate intestinal inflammation by controlling commensal *Lactobacillus*-mediated
254 colonic regulatory T cells (28). It seems that the transport of IgA-bacteria complexes through M cells
255 via Dectin-1 receptor (15) induces intestinal inflammation, suggesting some degrees of the correlation
256 between the abundance of M cells and chronic intestinal inflammation. In this respect, Bennet *et al.*
257 found that in both the dextran sodium sulfate and *Citrobacter rodentium* models of colitis, significantly
258 increased numbers of PP M cells were induced at the peak of inflammation in the colonic epithelium
259 (32). Using KO mice, we demonstrate that *NOD2* acts as an immune regulator of IgA reverse

260 transcytosis. Indeed, *NOD2* KO mice administered with *Salmonella*-IgA complexes exhibit an increase
261 of the inflammation's severity as compared to WT mice. This observation is supported by studies
262 showing that *NOD2* can modulate inflammation and mediate efficient clearance of bacteria from the
263 mucosal tissue during *Salmonella* colitis (33, 34).

264 We next investigated the molecular mechanisms which could explain how *NOD2* modulates IgA
265 retrograde transport. Using specific siRNA knockdown approach in the *in vitro* model containing M-
266 like cells, the involvement of *NOD2* as a regulator of IgA transport was confirmed. The role of
267 endosomal proteins already known to be involved in the IgA transport through enterocytes was also
268 studied (35). Our data reveal that IgA reverse transcytosis through M cells seems to be mediated by
269 EEA-1, Rab-5 and Rab-17 endosomal proteins as it has been previously described for epithelial IgA
270 transcytosis. The role of Dectin-1 and Siglec-5 in IgA reverse transcytosis was also confirmed (15).
271 *NOD2* has also been shown to influence MHC cross-presentation (26), autophagy induction and
272 resistance to intracellular bacterial infection (36, 37). Thus, while principally well-known for its acute
273 signaling effects, *NOD2* activation causes a variety of cellular changes *in vivo* that are also likely
274 important for immune homeostasis. SYK and TAK1 proteins from the Dectin-1 signaling pathway are
275 also involved in the blocking of IgA reverse transcytosis. The role of *NOD2* interaction with TAK1
276 through its leucine-rich repeat (LRR) region to exert its inhibitory effect on TAK1-induced NF- κ B
277 activation has been published (38). This suggests that *NOD2* inhibits TAK1-induced NF- κ B activation,
278 which results in the downregulation of IgA transport. A significant decrease of Dectin-1 and Siglec-5
279 expression after *NOD2* knockdown in M cells is observed in the current study, suggesting that *NOD2*
280 contributes to regulate the expression of these two receptors for SIgA (**graphical abstract**). Of interest
281 in the more global context of intestinal diseases, *NOD2* has been identified as a negative regulator of
282 TLR2 (39) and of TLR4 in necrotising enterocolitis (40).

283 Our finding should be interpreted with caution, as the etiology of CD involves a combination of genetic,
284 environmental, and microbial factors (29, 41, 42). Hence, we find it fair to underline that the SIgA-
285 dependent route identified in the study is likely to be one among other mechanism that eventually
286 initiates and/or perpetuates mucosal inflammation observed in CD. In any case, our data confirm and

287 extend the knowledge that the *NOD2* genotype status is currently the strongest genetic marker associated
288 with a severe CD course. In figure 1, *NOD2* mutations of the studied population (R702W, 1007fs and
289 R702W/G908R) were compared and no differences were observed in IgA-positive cells distribution in
290 PP. These results are consistent with the study of Hugot *et al*, which provided strong evidence that the
291 penetrance of the most at-risk genotypes is low. They found no clear relationship between mutation
292 frequencies and the disease incidence in their studied populations and no significant deficit of double-
293 dose mutation carriers among healthy controls (43). However, another study predict an 8% increase in
294 the risk for complicated disease with presence of a single *NOD2* mutation, and a 41% increase with 2
295 mutations (44). Nevertheless, these two studies confirm that *CARD15/NOD2* acts in interaction with
296 other unknown risk cofactors.

297 A newly developed theory proposes that antibodies generated in response to microbial colonization of
298 the intestine shape the microbiota composition to benefit the health of the host through a process called
299 antibody mediated immunoselection (AMIS). Immunoselection refers to a process of natural selection
300 within a host organism that is mediated by the immune system to influence microbial fitness and hence
301 microbial ecology and evolution (45). A significant fraction of commensal bacteria is heavily coated
302 with IgAs (9, 23, 46). However, such coating seems to be non-specific, as there is a significant overlap
303 of bacterial species between IgA-coated and non-coated fractions. Under such conditions the bacteria
304 diversity was significantly reduced. Thus, it seems that reduced affinity maturation of IgAs is associated
305 with reduced diversity and skewed microbiota and abundant coating of bacteria with natural IgAs. A
306 recent paper goes further by saying that bacteria recognized by human SIgM were dually coated by SIgA
307 and showed increased richness and diversity compared to IgA-only-coated or uncoated bacteria (47).
308 This bacterial selection mechanism could be a causal agent for CD development or other IgA-based
309 diseases where IgA reverse transcytosis could play a role. Indeed, CD patients have several features in
310 common with IgA nephropathy and celiac disease. Increased small intestinal mucosal permeability has
311 been demonstrated in these pathologies (48, 49). In IgA nephropathy, this may allow the influx of food
312 and bacterial Ags resulting in immune complex formation and deposition. In celiac disease, the alteration

313 of para- and transcellular pathways has been proposed to explain the retrograde transport of intact
314 peptides, and notably the apico-to-basal translocation of SIgA ensured by the transferrin receptor (50).

315 The better understanding of molecular mechanisms driving chronic gut inflammation has led over the
316 past two decades to novel therapeutic strategies with major impacts for the current management of IBD
317 (51, 52). However, despite spectacular successes mainly attributable to the anti-TNF therapy, not all
318 patients respond to the newer drugs and about one third of the responders relapse within a short period
319 of time. Further works are therefore needed to identify novel therapeutic molecules in IBD. In the present
320 study, we demonstrated that IgA retro-transport is involved in promoting inflammation in CD by acting
321 on the transport of IgA-bacteria immune complexes in the PP through M cells. Novel therapeutic
322 strategies aiming at blocking IgA reverse transcytosis during acute phase of CD may be considered to
323 design new efficient immunotherapeutic strategies.

324 **Materials and Methods**

325 **Immunolabeling of human Peyer's patches *ex vivo*.** Informed and consenting CD patients or healthy
326 individuals who had undergone upper endoscopy for routine diagnostic purposes with normal intestinal
327 mucosa provided two biopsy samples from the terminal ileum. Biopsies were fixed for 2 h in 3%
328 paraformaldehyde and included in OCT embedding solution, before being cryosectioned using a Leica
329 cryostat model CM1950. 7- μ m sections were captured on Ultra+ Superfrost microscope slides and
330 stained for M cells. Slides were washed in PBS to eliminate residual OCT embedding solution, and
331 blocked with PBS containing 5% FBS for 30 min at room temperature. Immunolabeling was performed
332 using a combination of GFP-IgA2 (Invivogen), ~~and~~ anti-human PE-GP2 mAb (MBL), ~~and anti-human~~
333 [PE-DC-SIGN mAb \(ThermoFisher scientific\)](#) diluted to 20 μ g/ml for 2 h at room temperature. The
334 slides were then washed in PBS, air-dried and mounted with Fluoprep (Biomérieux). Slides were
335 observed by immunofluorescence microscopy (Eclipse, Nikon).

336

337 **Oligonucleotide Sequences for *NOD2* Polymorphism PCR.** *NOD2* genotyping has been previously
338 reported (53), PCR of *NOD2* polymorphisms (R702W, G908R, FS1007insC) were performed on DNA
339 extracted from human biopsies with a commercial extraction kit (QIAamp DNA mini kit, Qiagen,
340 Hilden, Deutschland). The following primers were used to identify specific mutations: R702W: forward,
341 5'-GAA TTC CTT CAC ATC ACT TTC CAG T -3' and reverse, 5'- GTC AAC TTG AGG TGC CCA
342 ACA TT -3'; G908R: forward, 5'- CCC AGC TCC TCC CTC TTC -3' and reverse, 5'- AAG TCT GTA
343 ATG TAA AGC CAC -3'; FS1007insC: forward, 5'- CTG AGC CTT TGT TGA TGA GC -3' and
344 reverse, 5'- TCT TCA ACC ACA TCC CCA TT -3'. We purified PCR products with a PCR purification
345 kit (Qiagen) before sequencing (Eurofins).

346

347 **Mice.** Six week-old C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Lyon, France).
348 *NOD2* KO mice were obtained from Gabriel Nunez (University of Michigan, USA). Dectin-1 KO mice
349 were obtained from Gordon D. Brown (University of Aberdeen, UK). Wild type C57BL/6, Dectin-1 KO
350 and *NOD2* KO mice were hosted at the University Hospital Unit for animal testing (Saint-Etienne,

351 France) in the same conditions during 3 weeks before starting experiments. The experimental procedures
352 followed the protocol of the Ethics Committee of CREEA (Permit Number No. 69387487).

353

354 **SIgA administration into ligated loops.** For ileal loop preparation, mice were starved overnight,

355 anesthetized by intra-peritoneal injection of a mix of ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg animal

356 weight, respectively) and kept warm at 37°C throughout the surgical procedure. 100 µl of a 1 mg/ml

357 solution of SIgA-Cy3 diluted in PBS [or Salmonella\(GFP\)-SIgASal4 immune complexes \(see model of](#)

358 [mouse colitis\)](#) [were](#) administered into a 1.5-cm ileal loop containing a PP. [Salmonella enterica subsp.](#)

359 [enterica serovar Typhimurium GFP were obtained from ATCC® \(14028GFP™\).](#) Upon completion of

360 the experiment, the mice were sacrificed by cervical dislocation and the piece of intestine was removed,

361 extensively washed with PBS, fixed for 2 h in 3% paraformaldehyde, and included in optimal cutting

362 tissue (OCT) embedding solution. 7-µm sections (Leica cryostat model CM1950, Leica Microsystems)

363 were captured on Ultra+ superfrost microscope slides (VWR International). Slides were observed by

364 immunofluorescence microscopy (Eclipse, Nikon). The protocol followed the guidance of the regional

365 Ethics Committee for animal testing, CREEA (Permit number: No. 69387487).

366 For visualization of mouse SIgA retrotranscytosis, a polymeric IgA Ab (clone IgAC5 specific to *S.*

367 *flexneri* serotype 5a LPS (54)) was obtained as previously described (55). Purified free human SC was

368 produced in Chinese Hamster Ovary cells (56). SIgA were obtained by mixing in PBS pIgA molecules

369 with a 2-fold excess of human SC for 2 h at room temperature according to the conditions described

370 previously (57). Cy3-SIgA complexes were obtained by conjugation with indocarbocyanine (Cy3) using

371 the FluoroLink mAb Cy3 labeling kit (Amersham Biosciences).

372

373 **Immunization with p24-SIgA complexes.** Mouse oral immunizations, recovery of blood and feces,

374 and quantification of p24-specific IgG, IgA, cytokines and chemokines were performed as previously

375 described (16).

376

377 **In Vivo Delivery of HIVp24-SIgA and Measurement of p24-Specific Abs.** Immunization with
378 HIVp24-SIgA complexes and measurement of HIVp24-specific IgG and IgA Abs in serum and feces
379 has been already described as well as the measure of cytokine panels (15–17).

380

381 **Model of mouse colitis.** The virulent streptomycin resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
382 strain SL1344 was cultured in LB (LB Broth, Sigma) supplemented with 90µg/ml of streptomycin (LB-
383 St). A day before infection, a SL1344 colony was cultured overnight at 37°C, 100rpm in 3 ml of LB-St.
384 Mouse IgASal4, specific for *Salmonella* Typhimurium surface carbohydrates was produced as described
385 previously and used to treat mice with SIgA-*Salmonella* complexes.

386 *NOD2* KO (n=5), Dectin-1 KO (n=5) and WT (n=5) mice were given either [Salmonella-SIgASal4](#)
387 ~~IgASal4-Salmonella~~ complexes or *Salmonella* alone (i.g., 10⁶ CFU/mouse) in 100 µl PBS by orogastric
388 intubation with polyethylene tubing under light anesthesia with isoflurane (Halocarbon Laboratories).
389 In other experiments, colitis was also induced by giving 5% dextran sodium sulfate solution in drinking
390 water as previously described (58).

391 Induction of colitis were compared in *NOD2* KO (n=5), Dectin-1 KO (n=5) and WT (n=5) mice after
392 adding 5% laminarin in drinking water for 3 days before colitis induction as previously described (28).

393

394 **Assessment of colitis severity**

395 - **Disease activity index (DAI)**

396 During the duration of the experiment, the DAI score was monitored daily to evaluate the clinical
397 progression of colitis (59). The DAI score combines read-outs including: weight loss compared to initial
398 weight, stool consistency, and rectal bleeding. Scores were defined as follows: weight loss: 0 (no loss),
399 1 (1-5%), 2 (5-10%), 3 (10-20%), and 4 (>20%); stool consistency: 0 (normal), 2 (loose stool), and 4
400 (diarrhoea); and rectal bleeding: 0 (no blood), 2 (visual pellet bleeding), and 4 (gross bleeding, blood
401 around anus). The experimental endpoint was reached when mice exhibited weight loss greater than
402 20% of initial weight with dehydration and diarrhoea had to be euthanized by cervical dislocation
403 following inhalation of isoflurane.

404 - **Histology**

405 To evaluate histological damages reflecting colitis severity, a small fragment (0.5 cm) of the colon was
406 cut, embedded in OCT, and frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen. 7- μ m sections were
407 prepared as previously described and stained with hematoxylin/eosin using the published procedures
408 (60). Scoring of neutrophil infiltration was performed using a standard microscope, based on the method
409 described previously (61).

410 - Serum IL-6 and LPS Assays

411 Mice were bled 5 days after treatment through retro-orbital plexus. The presence of IL-6 and LPS in
412 sera was assessed by ELISA (Mouse IL-6 ELISA MAX, Biolegend, San Diego, CA and Mouse
413 Lipopolysaccharide ELISA Kit, ELISAGENIE, London, UK).

414

415 **Cell culture.** The human intestinal cell line Caco-2 (clone 1) (obtained from Dr. Maria Rescigno,
416 University of Milan-Bicocca, Milan, Italy) (62) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium
417 (DMEM) (PAA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Thermo-Fisher), 1% (v/v) non-
418 essential amino-acids (PAA), and 1% (v/v) penicillin-streptomycin (PAA), referred to as complete
419 DMEM. The human Burkitt's lymphoma cell line Raji B (American Type Culture Collection), was
420 cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) non-essential amino-acids, 1%
421 (v/v) L-glutamine and 1% (v/v) penicillin-streptomycin.

422

423 **Inverted *in vitro* model of the human FAE.** The inverted FAE model has been previously reported
424 (15, 63). Inverted Transwell® polycarbonate inserts (12 wells, pore diameter of 3.0 μ m, Corning) were
425 coated with Matrigel™, a basement membrane matrix (BD Biosciences) prepared in pure DMEM to a
426 final protein concentration of 100 μ g/mL for 1 h at room temperature. The coating solution was removed
427 and inverted inserts were washed with 300 μ L of DMEM. Caco-2 cells (3×10^5), suspended in 300 μ L
428 of complete DMEM, were seeded on the lower insert side and cultured overnight. The inserts were then
429 inverted and placed in a 12-well culture dish and kept for 9 days. Raji B cells (5×10^5) were resuspended
430 in complete DMEM and then added to the basolateral compartment of the Caco-2 cells, and co-cultures
431 were maintained for 5 days. Mono-cultures of Caco-2 cells, cultivated as above but without back-
432 addition of Raji B cells, were used as controls. Establishment of polarized co- and mono-cultures was

433 controlled by measurement of TEER using an Endohm™ tissue resistance chamber (Endohm-12,
434 World Precision Instruments) connected to a Millicell®-ERS Ohmmeter (Millipore). The mean TEER
435 value of medium alone (9Ω per cm^2) was subtracted from each measurement. In random samples, the
436 barrier integrity of the tight junctions was confirmed by zonula occludens-1 (ZO-1) immunolabeling
437 (64). For transcytosis analyses, inserts were inverted prior to incubation in a 6-well plate, and a piece of
438 silicon tubing (14 (height) x 20 (diameter) mm, Labomoderne) serving as a medium reservoir was placed
439 on the surface facing the basolateral pole of the cell monolayer.

440

441 **Gene inhibition by small interfering (si) RNA.** Cells in the inverted *in vitro* model of FAE were
442 transfected at a final concentration of 5 nM with ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs (Dharmacon)
443 using Silentfect reagent (Bio-Rad) according to the procedure provided by the manufacturer. The
444 reference numbers for gene targeting were as follows: Dectin-1: L-021476-00-0005; Siglec-5: L-
445 019522-02-0005; EEA-1: L-004012-00-0005; pIgR: L-017729-00-0005; Rab-5: L-004009-00-0005;
446 Rab-7: L-010388-00-0005; Rab-9: L-004177-00-0005; Rab-11: L-004726-00-0005; Rab-25: L-010366-
447 00-0005; Syk: L-003176-00-0005; *NOD2*: L-003464-00-0005. TAK-1 was silenced by using sequence
448 6317S (Cell Signaling Technology).

449

450 **Treatment with muramyl dipeptide - Pam3Cys (MDP-PAM)**

451 In order to specifically activate *NOD2*, the inverted *in vitro* model of FAE was exposed to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
452 muramyl dipeptide and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pam3Cys-Ser-(Lys)4 hydrochloride (Invivogen) for 24 h.

453

454 **Immunoprecipitation and Western Blot.** 10 μg of IgA2-Luc were added to the apical compartment of
455 the *in vitro* model of FAE. And the cells were incubated for 30 or 60 min at 37°C . After two washes
456 with PBS, the cells were lysed with Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific). The
457 lysate was cleared by centrifugation and the protein concentration was brought to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. IgA2 (and
458 bound proteins) were concentrated by immunoprecipitation with protein M-agarose beads (Invivogen).
459 Post washes, elution was performed with 0,1 M glycine (pH 3.0), with immediate neutralization by 1 M
460 Tris buffer (pH 8.0). The eluted material was subjected to SDS-PAGE followed by transfer onto a

461 hybond ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Science). Immunodetection of targeted
462 proteins was performed with a selection of Abs/antisera including: Goat anti-human Dectin-1/CLEC
463 7A serum, anti-human CD170 (Siglec-5) mAb (mouse IgG1, Clone #194128), sheep anti-human EEA-
464 1 serum, anti-human pIgR mAb (Mouse IgG3, Clone # 825724), anti-human SYK mAb (mouse IgG1,
465 Clone # 720402), anti-human TAK1 mAb (mouse IgG1, Clone # 491840) were purchased from R&D
466 System, and rabbit anti-human Rab-5 serum, anti-human Rab-7 mAb (mouse IgG2b, Clone # Rab-7-
467 117), anti-human Rab-9 mAb (mouse IgG1, Clone # Mab9), rabbit anti-human Rab-11 serum, anti-
468 human Rab-25 mAb (Rabbit IgG, Clone EPR18353) were obtained from Abcam. Appropriate HRP-
469 coupled secondary Abs were used for detection with the “Clarity Western ECL Substrate” (Biorad).

470

471 ***NOD2* RT-qPCR.** *NOD2* RT-qPCR has been previously reported (65). Briefly, total RNA was extracted
472 using TRIZOL (Invitrogen). Reverse transcription was performed using the PrimeScript® RT reagent
473 kit (TaKaRa Biotechnology, Dalian, PRC). The SYBR® Premix Ex Taq™ II kit (TaKaRa
474 Biotechnology) was used to amplify *GAPDH* and *NOD2* gene products. The oligonucleotide primers
475 used were as follows: *NOD2*: forward, 5'- CTG AAG AAT GCC CGC AAG GT -3' and reverse, 5'-
476 GTC TCT TGG AGC AGG CGG ATG -3'; *GAPDH*: forward, 5'- TGC ACC ACC AAC TGC TTA
477 GC -3' and reverse, 5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG -3'. The double standard curve method
478 was used to analyze the relative gene expression (66).

479

480 **IgA RT experiment.** After 48 h of siRNA mediated gene knockdown or 24h of MDP-PAM stimulation,
481 10 µg of Ab conjugated with luciferase (Luc) or colostrum IgA were added to the apical side of the *in*
482 *vitro* model of FAE at 37°C for 90 min, as previously described (15). Basolateral solutions were then
483 recovered and the number of retro-transcytosed Ab-Luc measured by luminometry using the Gaussia
484 Luc Assay Kit (Biolum) according to the procedure provided by the manufacturer. Transported colostrum
485 IgA was detected by ELISA using biotinylated goat anti-human IgA (Southern Biotech) followed by
486 streptavidin-HRP (Amersham).

487

488 **Statistical Analysis.** Statistical analyses were performed using the InStat version 2.01 from the
489 GraphPad Software. A nonparametric Mann-Whitney U-test or one-way ANOVA followed by
490 Bonferroni post hoc test was used where appropriate (67, 68). The limit of significance for p values was
491 set at 0.05 (marked by * in the plot); ** indicates p values ≤ 0.01 , and *** stands for p values ≤ 0.005 .
492 Statistically significant differences between groups are emphasized by bars connecting the relevant
493 columns under comparison.

494 **References**

- 495 1. L. W. van den Elsen, H. C. Poyntz, L. S. Weyrich, W. Young, E. E. Forbes-Blom, Embracing the gut
496 microbiota: the new frontier for inflammatory and infectious diseases, *Clin. Transl. Immunol.* **6**, e125
497 (2017).
- 498 2. H. Kayama, K. Takeda, Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut
499 homeostasis, *J. Biochem. (Tokyo)* **159**, 141–149 (2016).
- 500 3. K. J. Maloy, F. Powrie, Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease,
501 *Nature* **474**, 298–306 (2011).
- 502 4. Q. Zhang, Y. Pan, R. Yan, B. Zeng, H. Wang, X. Zhang, W. Li, H. Wei, Z. Liu, Commensal bacteria
503 direct selective cargo sorting to promote symbiosis, *Nat. Immunol.* **16**, 918–926 (2015).
- 504 5. D. Ramanan, M. S. Tang, R. Bowcutt, P. Loke, K. Cadwell, Bacterial sensor Nod2 prevents
505 inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal *Bacteroides*
506 *vulgatus*, *Immunity* **41**, 311–324 (2014).
- 507 6. A. Simmons, Crohn’s disease: Genes, viruses and microbes, *Nature* **466**, 699–700 (2010).
- 508 7. C. Jung, J.-P. Hugot, F. Barreau, Peyer’s Patches: The Immune Sensors of the Intestine, *Int. J.*
509 *Inflamm.* **2010**, 823710 (2010).
- 510 8. N. A. Kennedy, C. A. Lamb, S. H. Berry, A. W. Walker, J. Mansfield, M. Parkes, R. Simpkins, M.
511 Tremelling, S. Nutland, UK IBD Genetics Consortium, J. Parkhill, C. Probert, G. L. Hold, C. W. Lees, The
512 Impact of NOD2 Variants on Fecal Microbiota in Crohn’s Disease and Controls Without
513 Gastrointestinal Disease, *Inflamm. Bowel Dis.* **24**, 583–592 (2018).
- 514 9. D. B. Sutherland, K. Suzuki, S. Fagarasan, Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by
515 Immunoglobulin A, *Immunol. Rev.* **270**, 20–31 (2016).
- 516 10. A. J. Macpherson, B. Yilmaz, J. P. Limenitakis, S. C. Ganai-Vonarburg, IgA Function in Relation to
517 the Intestinal Microbiota, *Annu. Rev. Immunol.* (2018), doi:10.1146/annurev-immunol-042617-
518 053238.
- 519 11. J. J. Bunker, S. A. Erickson, T. M. Flynn, C. Henry, J. C. Koval, M. Meisel, B. Jabri, D. A.
520 Antonopoulos, P. C. Wilson, A. Bendelac, Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal
521 microbiota, *Science* **358** (2017), doi:10.1126/science.aan6619.
- 522 12. M. H. Heineke, M. van Egmond, Immunoglobulin A: magic bullet or Trojan horse?, *Eur. J. Clin.*
523 *Invest.* **47**, 184–192 (2017).
- 524 13. I. S. Hansen, L. Krabbendam, J. H. Bernink, F. Loayza-Puch, W. Hoepel, J. A. van Burgsteden, E. C.
525 Kuijper, C. J. Buskens, W. A. Bemelman, S. A. J. Zaat, R. Agami, G. Vidarsson, G. R. van den Brink, E. C.
526 de Jong, M. E. Wildenberg, D. L. P. Baeten, B. Everts, J. den Dunnen, FcαRI co-stimulation converts
527 human intestinal CD103+dendritic cells into pro-inflammatory cells through glycolytic
528 reprogramming, *Nat. Commun.* **9**, 863 (2018).
- 529 14. B. Corthésy, Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis?, *J. Immunol. Baltim.*
530 *Md 1950* **178**, 27–32 (2007).

- 531 15. N. Rochereau, D. Drocourt, E. Perouzel, V. Pavot, P. Redelinguys, G. D. Brown, G. Tiraby, X.
532 Roblin, B. Verrier, C. Genin, B. Corthésy, S. Paul, Dectin-1 Is Essential for Reverse Transcytosis of
533 Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells, *PLoS Biol.* **11**, e1001658 (2013).
- 534 16. N. Rochereau, V. Pavot, B. Verrier, A. Ensinas, C. Genin, B. Corthésy, S. Paul, Secretory IgA as a
535 vaccine carrier for delivery of HIV antigen to M cells, *Eur. J. Immunol.* (2014),
536 doi:10.1002/eji.201444816.
- 537 17. N. Rochereau, V. Pavot, B. Verrier, F. Jospin, A. Ensinas, C. Genin, B. Corthésy, S. Paul, Delivery of
538 antigen to nasal-associated lymphoid tissue microfold cells through secretory IgA targeting local
539 dendritic cells confers protective immunity, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2015),
540 doi:10.1016/j.jaci.2015.07.042.
- 541 18. A. Rehman, P. Rausch, J. Wang, J. Skieceviciene, G. Kiudelis, K. Bhagalia, D. Amarapurkar, L.
542 Kupcinkas, S. Schreiber, P. Rosenstiel, J. F. Baines, S. Ott, Geographical patterns of the standing and
543 active human gut microbiome in health and IBD, *Gut* **65**, 238–248 (2016).
- 544 19. T. Eom, Y. S. Kim, C. H. Choi, M. J. Sadowsky, T. Unno, Current understanding of microbiota- and
545 dietary-therapies for treating inflammatory bowel disease, *J. Microbiol. Seoul Korea* **56**, 189–198
546 (2018).
- 547 20. A. Nishida, R. Inoue, O. Inatomi, S. Bamba, Y. Naito, A. Andoh, Gut microbiota in the pathogenesis
548 of inflammatory bowel disease, *Clin. J. Gastroenterol.* **11**, 1–10 (2018).
- 549 21. B. M. Schultz, C. A. Paduro, G. A. Salazar, F. J. Salazar-Echegarai, V. P. Sebastián, C. A. Riedel, A. M.
550 Kalergis, M. Alvarez-Lobos, S. M. Bueno, A Potential Role of Salmonella Infection in the Onset of
551 Inflammatory Bowel Diseases, *Front. Immunol.* **8**, 191 (2017).
- 552 22. A. J. Macpherson, Y. Köller, K. D. McCoy, The bilateral responsiveness between intestinal
553 microbes and IgA, *Trends Immunol.* **36**, 460–470 (2015).
- 554 23. N. W. Palm, M. R. de Zoete, T. W. Cullen, N. A. Barry, J. Stefanowski, L. Hao, P. H. Degnan, J. Hu, I.
555 Peter, W. Zhang, E. Ruggiero, J. H. Cho, A. L. Goodman, R. A. Flavell, Immunoglobulin A coating
556 identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease, *Cell* **158**, 1000–1010 (2014).
- 557 24. M. M. Bosca-Watts, J. Tosca, R. Anton, M. Mora, M. Minguez, F. Mora, Pathogenesis of Crohn's
558 disease: Bug or no bug, *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **6**, 1–12 (2015).
- 559 25. M. Lin, L. Du, P. Brandtzaeg, Q. Pan-Hammarström, IgA subclass switch recombination in human
560 mucosal and systemic immune compartments, *Mucosal Immunol.* **7**, 511–520 (2014).
- 561 26. D. Corridoni, A. Rodriguez-Palacios, G. Di Stefano, L. Di Martino, D. A. Antonopoulos, E. B. Chang,
562 K. O. Arseneau, T. T. Pizarro, F. Cominelli, Genetic deletion of the bacterial sensor NOD2 improves
563 murine Crohn's disease-like ileitis independent of functional dysbiosis, *Mucosal Immunol.* (2016),
564 doi:10.1038/mi.2016.98.
- 565 27. L. Henckaerts, S. Vermeire, NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease,
566 *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 235–241 (2007).
- 567 28. C. Tang, T. Kamiya, Y. Liu, M. Kadoki, S. Kakuta, K. Oshima, M. Hattori, K. Takeshita, T. Kanai, S.
568 Saijo, N. Ohno, Y. Iwakura, Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing
569 Lactobacillus-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine, *Cell Host Microbe* **18**, 183–197
570 (2015).

- 571 29. W. Strober, N. Asano, I. Fuss, A. Kitani, T. Watanabe, Cellular and molecular mechanisms
572 underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease, *Immunol. Rev.* **260**, 249–260
573 (2014).
- 574 30. M. Hedl, C. Abraham, Secretory mediators regulate Nod2-induced tolerance in human
575 macrophages, *Gastroenterology* **140**, 231–241 (2011).
- 576 31. R. Sinha, D. R. Howlader, P. Mukherjee, S. Rai, D. Nag, H. Koley, Retinoic acid decreases the
577 severity of Salmonella enterica serovar Typhimurium mediated gastroenteritis in a mouse model,
578 *Immunobiology* (2016), doi:10.1016/j.imbio.2016.01.011.
- 579 32. K. M. Bennett, E. A. Parnell, C. Sanscartier, S. Parks, G. Chen, M. G. Nair, D. D. Lo, Induction of
580 Colonic M Cells during Intestinal Inflammation, *Am. J. Pathol.* **186**, 1166–1179 (2016).
- 581 33. A.-K. Claes, N. Steck, D. Schultz, U. Zähringer, S. Lipinski, P. Rosenstiel, K. Geddes, D. J. Philpott, H.
582 Heine, G. A. Grassl, Salmonella enterica serovar Typhimurium Δ msbB Triggers Exacerbated
583 Inflammation in Nod2 Deficient Mice, *PLOS ONE* **9**, e113645 (2014).
- 584 34. S. J. Robertson, K. Geddes, C. Maisonneuve, C. J. Streutker, D. J. Philpott, Resilience of the
585 intestinal microbiota following pathogenic bacterial infection is independent of innate immunity
586 mediated by NOD1 or NOD2, *Microbes Infect.* **18**, 460–471 (2016).
- 587 35. M. D. Garcia-Castillo, D. J.-F. Chinnapen, W. I. Lencer, Membrane Transport across Polarized
588 Epithelia, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* , a027912 (2017).
- 589 36. J. P. Boyle, R. Parkhouse, T. P. Monie, Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling
590 pathway, *Open Biol.* **4** (2014), doi:10.1098/rsob.140178.
- 591 37. K. Cadwell, Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing
592 defence and homeostasis, *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 661–675 (2016).
- 593 38. C.-M. Chen, Y. Gong, M. Zhang, J.-J. Chen, Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling
594 pathways, *J. Biol. Chem.* **279**, 25876–25882 (2004).
- 595 39. T. Watanabe, A. Kitani, P. J. Murray, W. Strober, NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor
596 2-mediated T helper type 1 responses, *Nat. Immunol.* **5**, 800–808 (2004).
- 597 40. W. M. Richardson, C. P. Sodhi, A. Russo, R. H. Siggers, A. Afrazi, S. C. Gribar, M. D. Neal, S. Dai, T.
598 Prindle, M. Branca, C. Ma, J. Ozolek, D. J. Hackam, Nucleotide-binding oligomerization domain-2
599 inhibits toll-like receptor-4 signaling in the intestinal epithelium, *Gastroenterology* **139**, 904–917,
600 917.e1–6 (2010).
- 601 41. J. Carrière, A. Darfeuille-Michaud, H. T. T. Nguyen, Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease,
602 *World J. Gastroenterol.* **20**, 12102–12117 (2014).
- 603 42. D. S. Shouval, P. A. Rufo, The Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Inflammatory
604 Bowel Diseases: A Review, *JAMA Pediatr.* **171**, 999–1005 (2017).
- 605 43. J.-P. Hugot, I. Zaccaria, J. Cavanaugh, H. Yang, S. Vermeire, M. Lappalainen, S. Schreiber, V.
606 Annese, D. P. Jewell, E. V. Fowler, S. R. Brant, M. S. Silverberg, J. Cho, J. D. Rioux, J. Satsangi, M.
607 Parkes, IBD International Genetics Consortium, Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian
608 healthy people, *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 1259–1267 (2007).

- 609 44. J. Adler, S. C. Rangwala, B. A. Dwamena, P. D. R. Higgins, The prognostic power of the NOD2
610 genotype for complicated Crohn's disease: a meta-analysis, *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 699–712
611 (2011).
- 612 45. J. L. Kubinak, J. L. Round, Do antibodies select a healthy microbiota?, *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 767–
613 774 (2016).
- 614 46. O. Pabst, V. Cerovic, M. Hornef, Secretory IgA in the Coordination of Establishment and
615 Maintenance of the Microbiota, *Trends Immunol.* **37**, 287–296 (2016).
- 616 47. G. Magri, L. Comerma, M. Pybus, J. Sintes, D. Lligé, D. Segura-Garzón, S. Bascones, A. Yeste, E. K.
617 Grasset, C. Gutzeit, M. Uzzan, M. Ramanujam, M. C. van Zelm, R. Albero-González, I. Vazquez, M.
618 Iglesias, S. Serrano, L. Márquez, E. Mercade, S. Mehandru, A. Cerutti, Human Secretory IgM Emerges
619 from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals,
620 *Immunity* **47**, 118–134.e8 (2017).
- 621 48. B.-J. Clément, C. Lebreton, G. Malamut, N. Cerf-Bensussan, Perméabilité intestinale et maladie
622 cœliaque, *Médecine Mal. Métaboliques* **9**, 19–26 (2015).
- 623 49. J. König, J. Wells, P. D. Cani, C. L. García-Ródenas, T. MacDonald, A. Mercenier, J. Whyte, F.
624 Troost, R.-J. Brummer, Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease, *Clin. Transl.*
625 *Gastroenterol.* **7**, e196 (2016).
- 626 50. C. Lebreton, S. Ménard, J. Abed, I. C. Moura, R. Coppo, C. Dugave, R. C. Monteiro, A. Fricot, M. G.
627 Traore, M. Griffin, C. Cellier, G. Malamut, N. Cerf-Bensussan, M. Heyman, Interactions among
628 secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal
629 epithelial cells to gliadin peptides, *Gastroenterology* **143**, 698-707.e1–4 (2012).
- 630 51. J. Bilsborough, S. R. Targan, S. B. Snapper, Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease:
631 Current and Future, *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* **3**, 27–37 (2016).
- 632 52. N. Narula, D. T. Rubin, B. E. Sands, Novel Therapies in Inflammatory Bowel Disease: An Evaluation
633 of the Evidence, *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* **3**, 38–44 (2016).
- 634 53. R. Cooney, J. Baker, O. Brain, B. Danis, T. Pichulik, P. Allan, D. J. P. Ferguson, B. J. Campbell, D.
635 Jewell, A. Simmons, NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial
636 handling and antigen presentation, *Nat. Med.* **16**, 90–97 (2010).
- 637 54. A. Phalipon, M. Kaufmann, P. Michetti, J. M. Cavaillon, M. Huerre, P. Sansonetti, J. P.
638 Kraehenbuhl, Monoclonal immunoglobulin A antibody directed against serotype-specific epitope of
639 *Shigella flexneri* lipopolysaccharide protects against murine experimental shigellosis., *J. Exp. Med.*
640 **182**, 769–778 (1995).
- 641 55. L. I. Favre, F. Spertini, B. Corthésy, Simplified procedure to recover recombinant antigenized
642 secretory IgA to be used as a vaccine vector, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **786**,
643 143–151 (2003).
- 644 56. A. Phalipon, A. Cardona, J. P. Kraehenbuhl, L. Edelman, P. J. Sansonetti, B. Corthésy, Secretory
645 component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo, *Immunity* **17**, 107–115
646 (2002).

647 57. L. Rindisbacher, S. Cottet, R. Wittek, J.-P. Kraehenbuhl, B. Corthésy, Production of Human
648 Secretory Component with Dimeric IgA Binding Capacity Using Viral Expression Systems, *J. Biol.*
649 *Chem.* **270**, 14220–14228 (1995).

650 58. K. Nyuyki-Dufe, N. L. Cluny, K. A. Sharkey, M. G. Swain, Q. J. Pittman, Behavioral Comorbidities in
651 Dextran Sulphate Sodium (DSS) Colitis, an animal model of Inflammatory Bowel Diseases, *FASEB J.* **30**,
652 Ib637-Ib637 (2016).

653 59. A. Schippers, M. Muschaweck, T. Clahsen, S. Tautorat, L. Grieb, K. Tenbrock, N. Gaßler, N.
654 Wagner, β 7-Integrin exacerbates experimental DSS-induced colitis in mice by directing inflammatory
655 monocytes into the colon, *Mucosal Immunol.* **9**, 527–538 (2016).

656 60. A. H. Fischer, K. A. Jacobson, J. Rose, R. Zeller, Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell
657 Sections, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2008**, pdb.prot4986 (2008).

658 61. M. C. Pils, A. Bleich, I. Prinz, N. Fasnacht, M. Bollati-Fogolin, A. Schippers, B. Rozell, W. Müller,
659 Commensal gut flora reduces susceptibility to experimentally induced colitis via T-cell-derived
660 interleukin-10, *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 2038–2046 (2011).

661 62. M. Rescigno, M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.-P.
662 Kraehenbuhl, P. Ricciardi-Castagnoli, Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut
663 epithelial monolayers to sample bacteria, *Nat Immunol* **2**, 361–367 (2001).

664 63. A. des Rieux, V. Fievez, I. Théate, J. Mast, V. Prétat, Y.-J. Schneider, An improved in vitro model of
665 human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells, *Eur. J.*
666 *Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **30**, 380–391 (2007).

667 64. J. Váradí, A. Harazin, F. Fenyvesi, K. Réti-Nagy, P. Gogolák, G. Vámosi, I. Bácskay, P. Fehér, Z.
668 Ujhelyi, G. Vasvári, E. Róka, D. Haines, M. A. Deli, M. Vecsernyés, Alpha-Melanocyte Stimulating
669 Hormone Protects against Cytokine-Induced Barrier Damage in Caco-2 Intestinal Epithelial
670 Monolayers, *PLoS One* **12**, e0170537 (2017).

671 65. O. Brain, B. M. J. Owens, T. Pichulik, P. Allan, E. Khatamzas, A. Leslie, T. Steevens, S. Sharma, A.
672 Mayer, A. M. Catuneanu, V. Morton, M.-Y. Sun, D. Jewell, M. Coccia, O. Harrison, K. Maloy, S.
673 Schönefeldt, S. Bornschein, A. Liston, A. Simmons, The Intracellular Sensor NOD2 Induces MicroRNA-
674 29 Expression in Human Dendritic Cells to Limit IL-23 Release, *Immunity* **39**, 521–536 (2013).

675 66. A. Larionov, A. Krause, W. Miller, A standard curve based method for relative real time PCR data
676 processing, *BMC Bioinformatics* **6**, 62 (2005).

677 67. S. R. Clark, C. P. Thomas, V. J. Hammond, M. Aldrovandi, G. W. Wilkinson, K. W. Hart, R. C.
678 Murphy, P. W. Collins, V. B. O'Donnell, Characterization of platelet aminophospholipid
679 externalization reveals fatty acids as molecular determinants that regulate coagulation, *Proc. Natl.*
680 *Acad. Sci.* **110**, 5875–5880 (2013).

681 68. W. Xu, T. C. Südhof, A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization, *Science* **339**,
682 1290–1295 (2013).

683

684

685

686 **Acknowledgments.** N. Rochereau was supported by a post-doc fellowship from the Sir Jules Thorn
687 Charitable Trust and subsequently by a post-doc fellowship from Region Rhone-Alpes and also from
688 ANRS (France). The laboratory of S. Paul is supported by research grants from ANRS, Sidaction and
689 MSD Avenir, and that of B. Corthésy by grant No. 3100-156806 from the Swiss Science Research
690 Foundation. We would like to thank the staff of the “Unité Hospitalo-Universitaire d’expérimentation
691 animale” technical platforms of IFR143 for help in sample analysis.

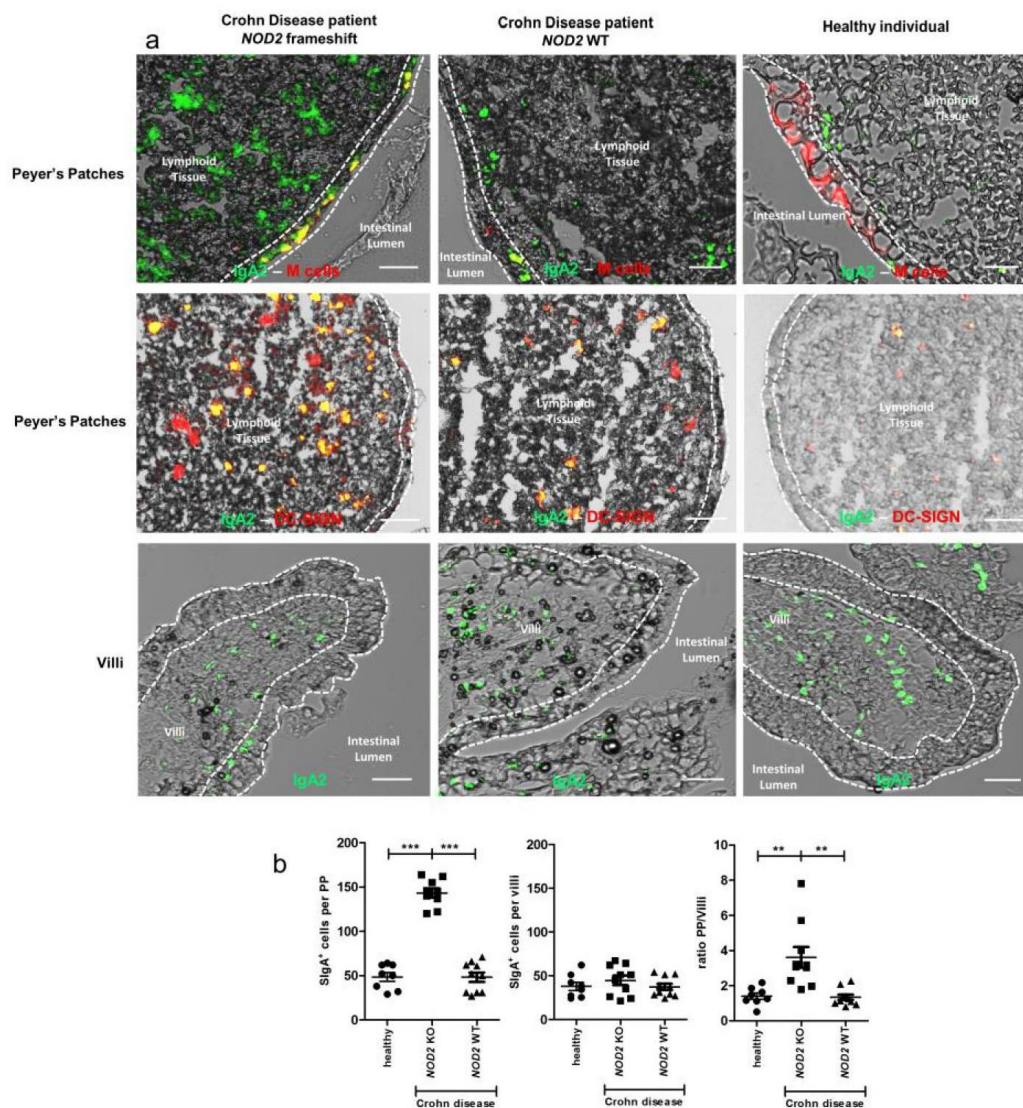
692

693 **Conflict of interest.** The authors have no conflicting financial interests. No funding bodies had any role
694 in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

695

696

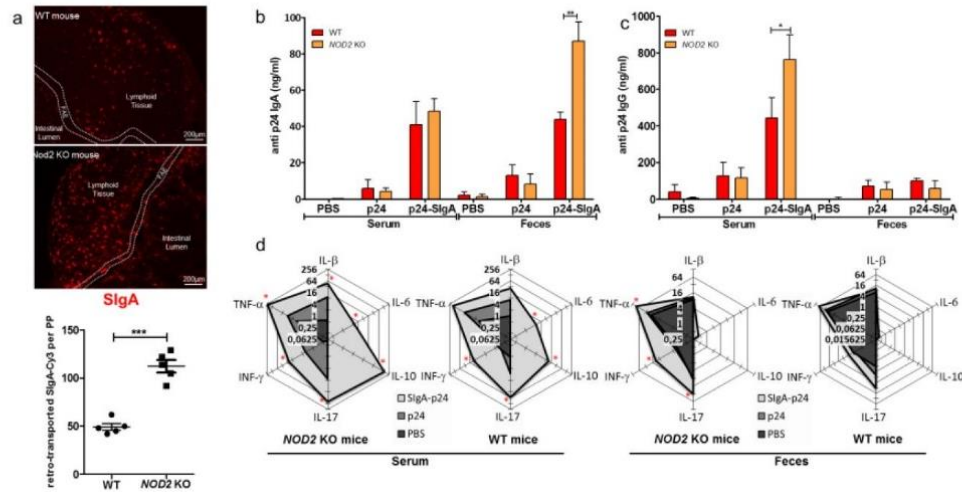
697



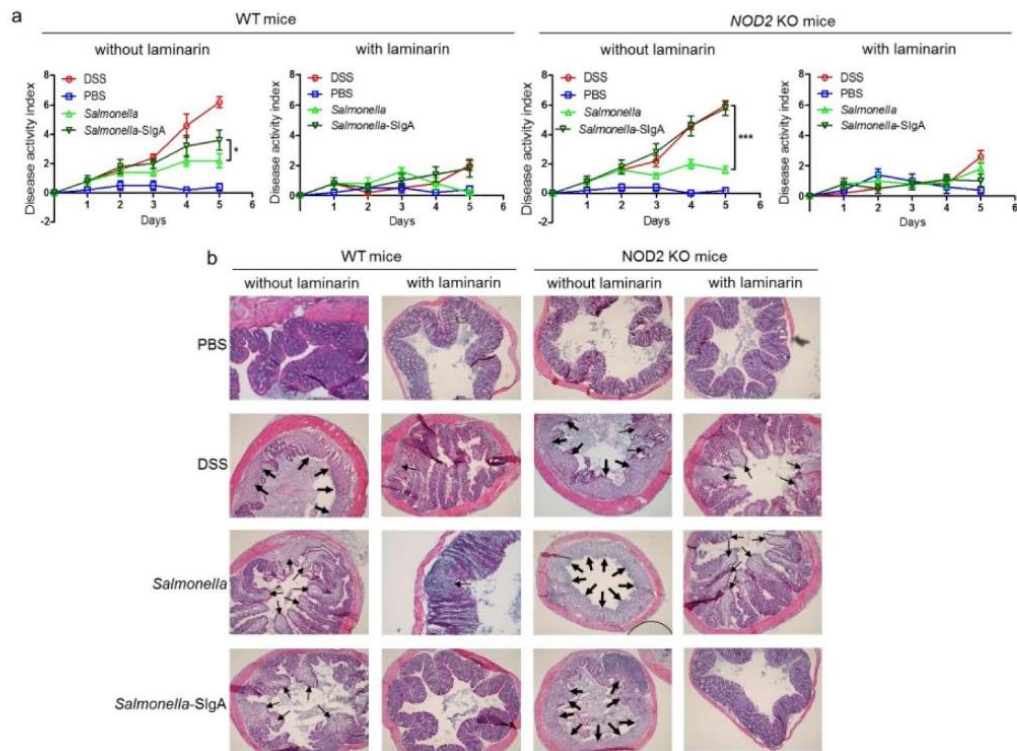
699

700 **Figure 1: IgA reverse transcytosis is highly increased in Crohn's disease.** (a) Images obtained from
 701 patient biopsy samples taken from the terminal ileum distal duodenum. Biopsies were labeled with [anti-](#)
 702 human GFP-IgA2 and PE-GP2 to label M cells or PE-DC-SIGN at room temperature for 2 h. The left
 703 panel shows a representative image from a CD patient expressing *NOD2* polymorphism, the middle
 704 panel a CD patient expressing WT *NOD2*, and the right panel depicts an image from a healthy donor.
 705 Bars: 200 μ m. On all pictures, dotted lines delineate the follicle-associated epithelium (FAE) separating
 706 the intestinal lumen and the lymphoid tissue (side view). (b) The two first graph compares frequency of

707 IgA-positive cells between healthy donors, CD WT *NOD2* patients and CD patients expressing *NOD2*
 708 polymorphisms in PP and in villi. The 3rd graph show the ratio PP/villi. Horizontal bars show the mean
 709 value \pm SEM (** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$).
 710
 711



712
 713 **Figure 2: *NOD2* attenuates IgA reverse transcytosis.** (a) Tissue section showing a PP obtained from
 714 a ligated intestinal loop WT (top panel) or *NOD2* KO (lower panel) following exposure to SIgA-Cy3 for
 715 60 min. Graph shows the number of SIgA-positive cells per PP. *NOD2* KO and WT mice were
 716 immunized orally with p24-SIgA. (b) Levels of Ag specific mucosal IgA and (c) levels of serum IgG in
 717 WT or *NOD2* KO mice were shown. Samples were collected 1 week after the last immunization and Ab
 718 production was measured by ELISA. Horizontal bars show the mean value \pm SEM. (d) Cytokine
 719 concentrations in serum and feces were determined in duplicate by Luminex-multiplex cytokine assay.
 720 Cytokine profiles are shown as radar charts; each axis displays the mean quantity (pg/ml) of each
 721 cytokine after immunization with p24-SIgA, p24 and PBS. The values of each axis were joined to form
 722 the central polygon area, which represents the overall cytokine balance. Increasing or decreasing central
 723 polygon areas reflect higher or lower expression of the protein under analysis. The experiment was
 724 repeated twice with 3 mice for each group showing similar results. *P* values have been calculated by
 725 comparing the p24-SIgA group with the p24 group; * $p < 0.05$.
 726



727

728 **Figure 3: *Salmonella*/IgA complexes induces colitis in mice.** Mice were challenged orally either with
 729 DSS, PBS, *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Typhimurium bound with murine IgA. They were
 730 left untreated or treated with 5% laminarin in drinking water for 3 days prior to colitis challenge. (a)
 731 Disease activity index (DAI) score was undertaken daily to evaluate the clinical progression of colitis.
 732 The DAI was the combined score of weight loss compared to initial weight, stool consistency, and
 733 bleeding. Horizontal bars show the mean value +/- SEM (* $p < 0.05$; *** $p < 0.005$). (b) Sections from
 734 intestines of mice showing neutrophil infiltrates in the lamina propria. Thick arrows show severe
 735 infiltrates, thin arrows show lighter infiltrates.

736

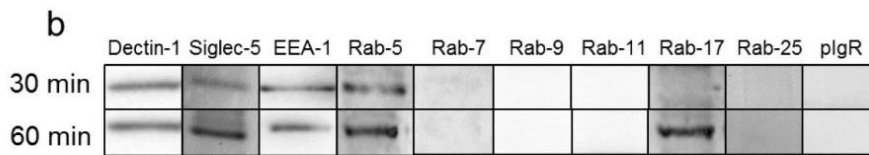
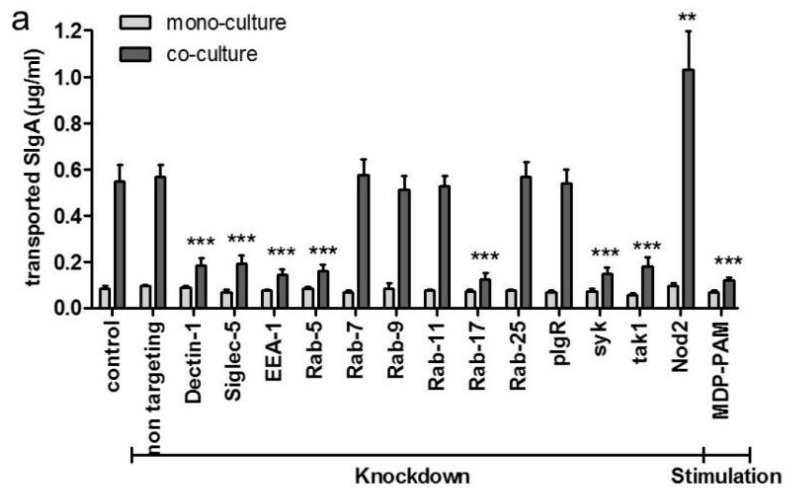
737

738

739

740

741



742

743 **Figure 4: IgA reverse transcytosis after protein inhibition or stimulation.** After siRNA knockdown
 744 or muramyl dipeptide - Pam3Cys (MDP-PAM) stimulation, IgA2 conjugated with luciferase (a)
 745 transport were quantified in the inverted *in vitro* model of FAE. (b) Immunoprecipitation made 30 or 60
 746 min after IgA incubation. Horizontal bars show the mean value +/- SEM (** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$).

747

748

749

750

751

752

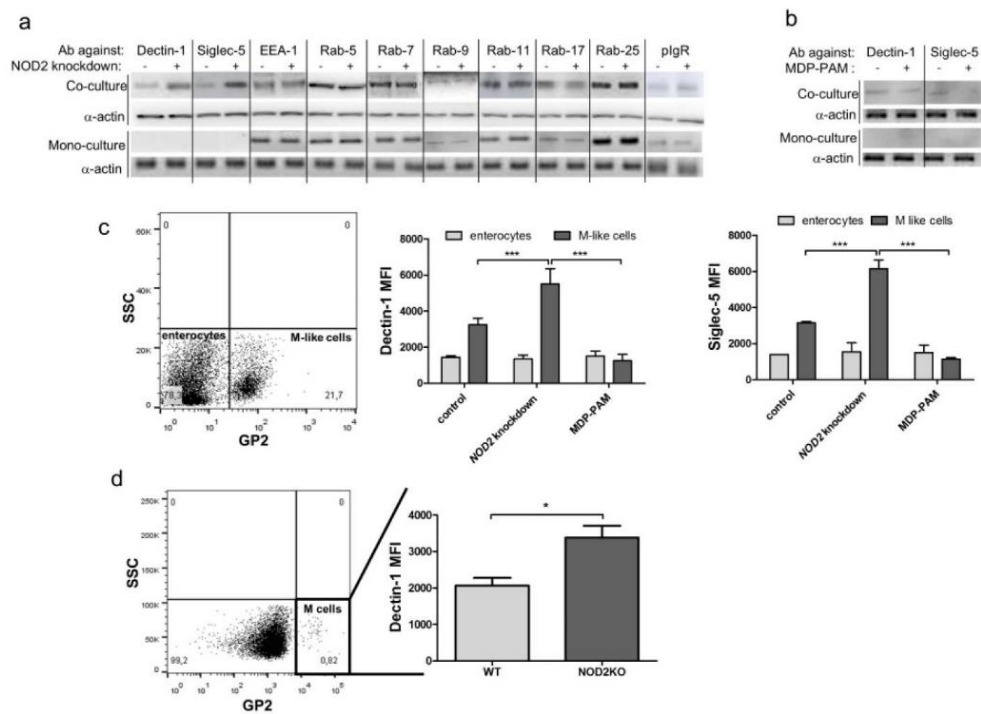
753

754

755

756

757



758

759 **Figure 5: NOD2 modulates the expression of Dectin-1 and Siglec-5 proteins involved in IgA**
 760 **reverse transcytosis.** Western blot showing the expression of proteins in an *in vitro* model containing
 761 (co-culture) or not (mono-culture) M like cells before “-” or after “+” NOD2 blocking of transcription
 762 with siRNA knockdown (a) or NOD2 stimulation with MDP-PAM treatment (b). Flow cytometry was
 763 used to examine the role of NOD2 on Dectin-1 and Siglec-5 expression in M like cells *in vitro* (c) and
 764 *in vivo* (d). Horizontal bars show the mean value ± SEM (* $p < 0.05$; *** $p < 0.005$). kd: knockdown;
 765 stim: stimulation

766

767

768

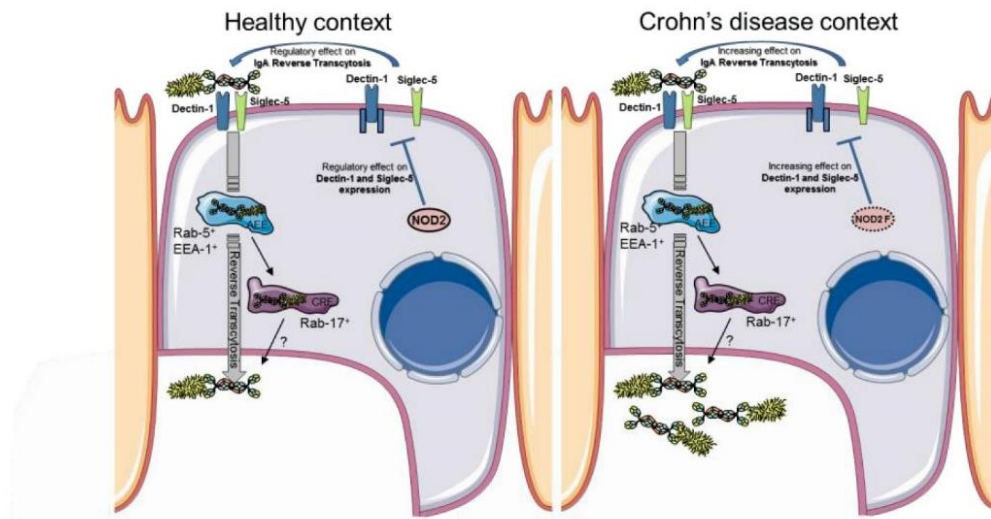
769

770

771

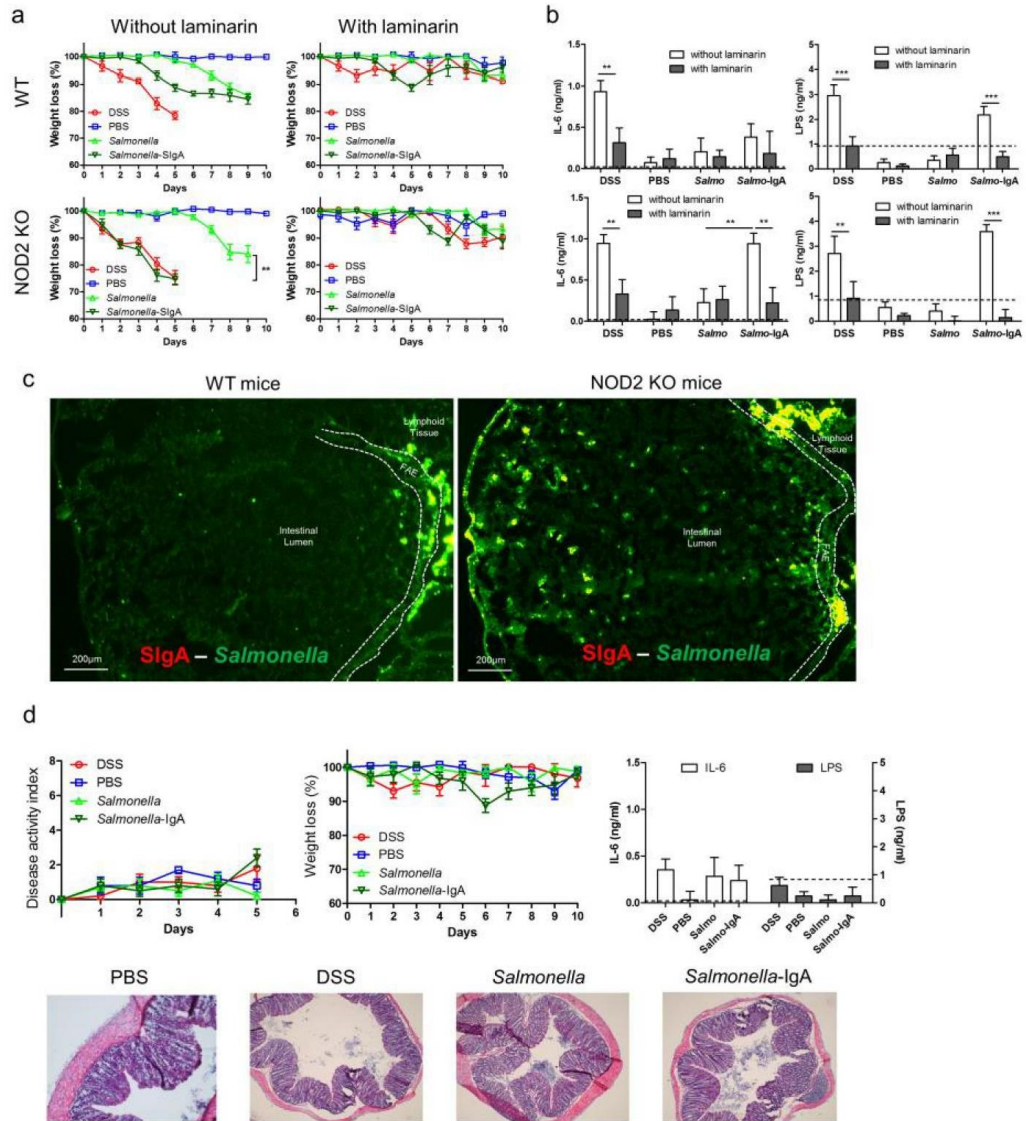
772

IgA Retrograde Transport



774

775 **Graphical Abstract:** The retrograde transport of IgA-pathogen complexes across M cells is increased in
776 CD patients as compared to healthy individuals. This translocation of IgA is regulated by WT NOD2
777 upon decrease of Dectin-1 and Siglec-5 expression in M cells, ensuring proper homeostasis. This
778 pathway is controlled by endosomal proteins such as EEA-1, Rab-5 and Rab-17. We would like to
779 emphasize that this identified mechanism is likely one among others that is involved in the initiation
780 and/or perpetuation of mucosal inflammation observed in CD patients.



786

787 **Supplementary figure 1: Complementary results from the induction of colitis in mice.** The clinical

788 progression of colitis was also evaluated by comparing weight loss to initial weight (a) and by

789 quantifying proinflammatory IL-6 and LPS in serum (b). (cd) Tissue section showing a PP obtained

790 from a ligated intestinal loop WT (left panel) or *NOD2* KO (right panel) following exposure SIgA-

791 *Salmonella*(GFP) for 60 min. Tissue section were labeled with PE-IgA at room temperature for 2 h_ (de)

792 DAI, weight loss, serum IL-6, serum LPS, and neutrophil infiltrates in Dectin-1 KO mice after being

793 orally challenged either with DSS, PBS, *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Typhimurium bound

794 to murine IgA. Dotted lines represent the limit of ELISA detection.;

795

796 **Supplementary figure 2: Confirmation of the effect of siRNA transfection in the inverted *in vitro***
797 **model of human FAE.** (a) Western Blot show decrease of the amount of proteins between control “-“
798 (no target knockdown) and knocked down cells “+”. (b) Q-PCR shows decrease of the *NOD2* mRNA
799 quantity between control and transfected cells and increase after 24 h stimulation with MDP-PAM. (c)
800 TEER is measured to detect the monolayer integrity and M cell conversion. No statistical changes
801 between control and knockdown cells have been observed. (d) Tight junction staining confirms the
802 monolayer integrity two days after siRNA transfection. Horizontal bars show the mean value \pm SEM
803 (***) $p < 0.005$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1.T. Kinugasa, T. Sakaguchi, X. Gu, H. C. Reinecker, *Gastroenterology* **118**, 1001 (Jun, 2000).
- 2.S. Vetrano *et al.*, *Gastroenterology* **135**, 173 (Jul, 2008).
- 3.M. Zarepour *et al.*, *Infect Immun* **81**, 3672 (Oct, 2013).
- 4.Y. Kurashima, H. Kiyono, *Annu Rev Immunol* **35**, 119 (Apr 26, 2017).
- 5.N. Kamada, S. U. Seo, G. Y. Chen, G. Nunez, *Nat Rev Immunol* **13**, 321 (May, 2013).
- 6.R. G. Lorenz, R. D. Newberry, *Ann N Y Acad Sci* **1029**, 44 (Dec, 2004).
- 7.N. A. Mabbott, D. S. Donaldson, H. Ohno, I. R. Williams, A. Mahajan, *Mucosal Immunol* **6**, 666 (Jul, 2013).
- 8.O. Schulz, O. Pabst, *Trends Immunol* **34**, 155 (Apr, 2013).
- 9.T. Nochi *et al.*, *J Exp Med* **204**, 2789 (Nov 26, 2007).
- 10.K. Hase *et al.*, *Nature* **462**, 226 (Nov 12, 2009).
- 11.N. Rochereau *et al.*, *PLoS Biol* **11**, e1001658 (Sep, 2013).
- 12.N. Gicheva, M. S. Macauley, B. M. Arlian, J. C. Paulson, N. Kawasaki, *Biochem Biophys Res Commun* **479**, 1 (Oct 7, 2016).
- 13.S. H. Kim, Y. S. Jang, *Exp Mol Med* **46**, e85 (Mar 14, 2014).
- 14.H. Cheroutre, F. Lambolez, D. Mucida, *Nat Rev Immunol* **11**, 445 (Jun 17, 2011).
- 15.F. van Wijk, H. Cheroutre, *Expert Rev Clin Immunol* **6**, 559 (Jul, 2010).
- 16.M. M. Nielsen, D. A. Witherden, W. L. Havran, *Nat Rev Immunol* **17**, 733 (Dec, 2017).
- 17.J. E. Dalton *et al.*, *Gastroenterology* **131**, 818 (Sep, 2006).
- 18.S. Vautier, G. Sousa Mda, G. D. Brown, *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 405 (Dec, 2010).
- 19.K. Honda, D. R. Littman, *Nature* **535**, 75 (Jul 7, 2016).
- 20.S. Omenetti, T. T. Pizarro, *Front Immunol* **6**, 639 (2015).
- 21.A. Geremia, C. V. Arancibia-Carcamo, *Front Immunol* **8**, 1296 (2017).
- 22.B. M. Fournier, C. A. Parkos, *Mucosal Immunol* **5**, 354 (Jul, 2012).
- 23.J. Upadhyay, R. B. Upadhyay, P. Agrawal, S. Jaitley, R. Shekhar, *N Am J Med Sci* **5**, 505 (Sep, 2013).
- 24.J. Fayette *et al.*, *J Exp Med* **185**, 1909 (Jun 2, 1997).
- 25.A. Lemke *et al.*, *Mucosal Immunol* **9**, 83 (Jan, 2016).
- 26.A. H. Latiff, M. A. Kerr, *Ann Clin Biochem* **44**, 131 (Mar, 2007).
- 27.P. Brandtzaeg *et al.*, *Clin Exp Immunol* **67**, 626 (Mar, 1987).
- 28.J. Fadlallah *et al.*, *Sci Transl Med* **10**, (May 2, 2018).
- 29.D. A. Chistiakov, Y. V. Bobryshev, E. Kozarov, I. A. Sobenin, A. N. Orekhov, *Front Microbiol* **5**, 781 (2014).
- 30.A. Konrad, Y. Cong, W. Duck, R. Borlaza, C. O. Elson, *Gastroenterology* **130**, 2050 (Jun, 2006).
- 31.A. Izcue, J. L. Coombes, F. Powrie, *Immunol Rev* **212**, 256 (Aug, 2006).
- 32.H. Ishigame *et al.*, *Immunity* **30**, 108 (Jan 16, 2009).
- 33.O. Pabst, *Nat Rev Immunol* **12**, 821 (Dec, 2012).
- 34.J. Mestecky, J. Zikan, W. T. Butler, *Science* **171**, 1163 (Mar 19, 1971).
- 35.M. S. Halpern, M. E. Koshland, *Nature* **228**, 1276 (Dec 26, 1970).
- 36.B. Corthesy, *Front Immunol* **4**, 185 (2013).
- 37.B. Corthesy, *Future Microbiol* **5**, 817 (May, 2010).
- 38.J. M. Woof, M. A. Kerr, *J Pathol* **208**, 270 (Jan, 2006).
- 39.M. Zhou, R. M. Ruprecht, *Retrovirology* **11**, 109 (Dec 14, 2014).
- 40.M. A. Kerr, *Biochem J* **271**, 285 (Oct 15, 1990).
- 41.K. Kett, P. Brandtzaeg, J. Radl, J. J. Haaijman, *J Immunol* **136**, 3631 (May 15, 1986).
- 42.P. Brandtzaeg, F. E. Johansen, *Immunol Rev* **206**, 32 (Aug, 2005).
- 43.A. G. Plaut, *Annu Rev Microbiol* **37**, 603 (1983).
- 44.G. Zauner *et al.*, *Mol Cell Proteomics* **12**, 856 (Apr, 2013).
- 45.N. Y. Lycke, M. Bemark, *Mucosal Immunol* **10**, 1361 (Nov, 2017).
- 46.A. Meyer-Bahlburg, *Ann N Y Acad Sci* **1362**, 122 (Dec, 2015).
- 47.B. Roy *et al.*, *Plos One* **8**, e82121 (2013).
- 48.C. Lindner *et al.*, *Nat Immunol* **16**, 880 (Aug, 2015).
- 49.D. A. Hill, D. Artis, *Annu Rev Immunol* **28**, 623 (2010).
- 50.M. Kim, Y. Qie, J. Park, C. H. Kim, *Cell Host Microbe* **20**, 202 (Aug 10, 2016).
- 51.H. Takaki *et al.*, *Mucosal Immunol* **11**, 82 (Jan, 2018).
- 52.K. Nagashima *et al.*, *Nat Immunol* **18**, 675 (Jun, 2017).
- 53.D. Rios *et al.*, *Mucosal Immunol* **9**, 907 (Jul, 2016).
- 54.M. Rescigno *et al.*, *Nat Immunol* **2**, 361 (Apr, 2001).
- 55.A. Reboldi *et al.*, *Science* **352**, aaf4822 (May 13, 2016).
- 56.A. T. Cao *et al.*, *Mucosal Immunol* **8**, 1072 (Sep, 2015).
- 57.C. Lindner *et al.*, *J Exp Med* **209**, 365 (Feb 13, 2012).
- 58.L. Moro-Sibilot *et al.*, *Gastroenterology* **151**, 311 (Aug, 2016).
- 59.M. E. Conley, M. S. Bartelt, *J Immunol* **133**, 2312 (Nov, 1984).
- 60.M. T. Abreu, *Nat Rev Immunol* **10**, 131 (Feb, 2010).
- 61.L. V. Hooper, A. J. Macpherson, *Nat Rev Immunol* **10**, 159 (Mar, 2010).
- 62.C. A. Siegrist, R. Aspinall, *Nat Rev Immunol* **9**, 185 (Mar, 2009).
- 63.H. Tezuka *et al.*, *Nature* **448**, 929 (Aug 23, 2007).
- 64.B. He *et al.*, *Immunity* **26**, 812 (Jun, 2007).
- 65.H. Tezuka *et al.*, *Immunity* **34**, 247 (Feb 25, 2011).
- 66.S. Uematsu *et al.*, *Nat Immunol* **9**, 769 (Jul, 2008).
- 67.J. R. Mora *et al.*, *Science* **314**, 1157 (Nov 17, 2006).
- 68.A. Flores-Langarica *et al.*, *Mucosal Immunol* **11**, 681 (May, 2018).
- 69.B. B. Cazac, J. Roes, *Immunity* **13**, 443 (Oct, 2000).

- 70.S. Borsutzky, B. B. Cazac, J. Roes, C. A. Guzman, *J Immunol* **173**, 3305 (Sep 1, 2004).
- 71.K. Suzuki *et al.*, *Immunity* **33**, 71 (Jul 23, 2010).
- 72.S. Fagarasan, K. Kinoshita, M. Muramatsu, K. Ikuta, T. Honjo, *Nature* **413**, 639 (Oct 11, 2001).
- 73.R. L. Coffman, D. A. Leberman, B. Shrader, *J Exp Med* **170**, 1039 (Sep 1, 1989).
- 74.D. Ruane *et al.*, *J Exp Med* **213**, 53 (Jan 11, 2016).
- 75.S. S. Crago *et al.*, *J Immunol* **132**, 16 (Jan, 1984).
- 76.J. W. de Fijter, A. W. van den Wall Bake, C. A. Braam, L. A. van Es, M. R. Daha, *J Immunol Methods* **187**, 221 (Dec 1, 1995).
- 77.M. T. Ventura, *Allergol Immunopathol (Madr)* **19**, 183 (Sep-Oct, 1991).
- 78.J. Mestecky, M. W. Russell, S. Jackson, T. A. Brown, *Clin Immunol Immunopathol* **40**, 105 (Jul, 1986).
- 79.L. Kirkeby, T. T. Rasmussen, J. Reinholdt, M. Kilian, *Clin Diagn Lab Immunol* **7**, 31 (Jan, 2000).
- 80.V. Tregoat, P. Montagne, M. C. Bene, G. Faure, *J Clin Lab Anal* **15**, 55 (2001).
- 81.I. Ladjeva, J. H. Peterman, J. Mestecky, *Clin Exp Immunol* **78**, 85 (Oct, 1989).
- 82.D. S. Newburg, W. A. Walker, *Pediatr Res* **61**, 2 (Jan, 2007).
- 83.T. Otsuki, K. Shimizu, M. Iemitsu, I. Kono, *Nutr J* **10**, 91 (Sep 9, 2011).
- 84.W. H. Kutteh, J. Mestecky, *Am J Reprod Immunol* **31**, 40 (Jan, 1994).
- 85.F. Dilek, E. Ozkaya, B. Gultepe, M. Yazici, M. Iraz, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **83**, 41 (Apr, 2016).
- 86.K. Kett *et al.*, *Gastroenterology* **109**, 819 (Sep, 1995).
- 87.S. H. Pakkanen *et al.*, *Clin Vaccine Immunol* **17**, 393 (Mar, 2010).
- 88.A. Bonner, A. Almogren, P. B. Furtado, M. A. Kerr, S. J. Perkins, *J Biol Chem* **284**, 5077 (Feb 20, 2009).
- 89.E. Arranz, S. O'Mahony, J. R. Barton, A. Ferguson, *Gut* **33**, 882 (Jul, 1992).
- 90.K. Kett, P. Brandtzaeg, O. Fausa, *Gastroenterology* **94**, 1419 (Jun, 1988).
- 91.M. Capron *et al.*, *C R Acad Sci III* **307**, 397 (1988).
- 92.A. C. Honorio-Franca, P. Launay, M. M. Carneiro-Sampaio, R. C. Monteiro, *J Leukoc Biol* **69**, 289 (Feb, 2001).
- 93.C. Patry, Y. Sibille, A. Lehuen, R. C. Monteiro, *J Immunol* **156**, 4442 (Jun 1, 1996).
- 94.F. Geissmann *et al.*, *J Immunol* **166**, 346 (Jan 1, 2001).
- 95.P. J. van der Boog *et al.*, *J Immunol* **168**, 1252 (Feb 1, 2002).
- 96.B. D. Wines, C. T. Sardjono, H. H. Trist, C. S. Lay, P. M. Hogarth, *J Immunol* **166**, 1781 (Feb 1, 2001).
- 97.P. Launay *et al.*, *J Biol Chem* **274**, 7216 (Mar 12, 1999).
- 98.H. C. Morton *et al.*, *J Biol Chem* **270**, 29781 (Dec 15, 1995).
- 99.R. C. Monteiro, J. G. Van De Winkel, *Annu Rev Immunol* **21**, 177 (2003).
- 100.I. S. Hansen *et al.*, *Nat Commun* **9**, 863 (Feb 28, 2018).
- 101.J. M. Wilton, *Clin Exp Immunol* **34**, 423 (Dec, 1978).
- 102.D. E. Van Epps, R. C. Williams, Jr., *J Exp Med* **144**, 1227 (Nov 2, 1976).
- 103.B. Pasquier *et al.*, *Immunity* **22**, 31 (Jan, 2005).
- 104.S. M. Lechner, C. Papista, J. M. Chemouny, L. Berthelot, R. C. Monteiro, *J Nephrol* **29**, 5 (Feb, 2016).
- 105.R. C. Fabiano, S. V. Pinheiro, E. S. A. C. Simoes, *Inflamm Res* **65**, 757 (Oct, 2016).
- 106.Q. Sun, Z. Zhang, H. Zhang, X. Liu, *Plos One* **11**, e0166700 (2016).
- 107.C. J. Greene *et al.*, *Oncotarget* **8**, 107052 (Dec 5, 2017).
- 108.Q. Liu *et al.*, *Leuk Lymphoma* **55**, 892 (Apr, 2014).
- 109.B. Pasquier, Y. Lepelletier, C. Baude, O. Hermine, R. C. Monteiro, *J Leukoc Biol* **76**, 1134 (Dec, 2004).
- 110.I. C. Moura *et al.*, *J Am Soc Nephrol* **15**, 622 (Mar, 2004).
- 111.T. Matysiak-Budnik *et al.*, *J Exp Med* **205**, 143 (Jan 21, 2008).
- 112.J. Abed *et al.*, *Mucosal Immunol* **7**, 315 (Mar, 2014).
- 113.J. Gornowicz-Porowska, A. Seraszek-Jaros, M. Bowszyc-Dmochowska, E. Kaczmarek, M. Dmochowski, *Folia Histochem Cytobiol* **55**, 212 (2017).
- 114.T. B. Geijtenbeek *et al.*, *Cell* **100**, 575 (Mar 3, 2000).
- 115.T. B. Geijtenbeek *et al.*, *Nat Immunol* **1**, 353 (Oct, 2000).
- 116.E. M. Rapoport *et al.*, *Glycoconj J*, (Jan 31, 2018).
- 117.L. M. van den Berg, S. I. Gringhuis, T. B. Geijtenbeek, *Ann N Y Acad Sci* **1253**, 149 (Apr, 2012).
- 118.A. Erbacher, F. Gieseke, R. Handgretinger, I. Muller, *Hum Immunol* **70**, 308 (May, 2009).
- 119.M. Sanchez-Navarro, J. Rojo, *Drug News Perspect* **23**, 557 (Nov, 2010).
- 120.J. Baumann, C. G. Park, N. J. Mantis, *Immunol Lett* **131**, 59 (Jun 15, 2010).
- 121.G. D. Brown *et al.*, *J Exp Med* **196**, 407 (Aug 5, 2002).
- 122.S. Saijo *et al.*, *Nat Immunol* **8**, 39 (Jan, 2007).
- 123.B. N. Gantner, R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, D. M. Underhill, *J Exp Med* **197**, 1107 (May 5, 2003).
- 124.T. Kamiya *et al.*, *Mucosal Immunol*, (Oct 25, 2017).
- 125.Y. G. Pan, Y. L. Yu, C. C. Lin, L. L. Lanier, C. L. Chu, *Front Immunol* **8**, 1424 (2017).
- 126.M. A. Koch *et al.*, *Cell* **165**, 827 (May 5, 2016).
- 127.O. Pabst, V. Cerovic, M. Hornef, *Trends Immunol* **37**, 287 (May, 2016).
- 128.K. Suzuki *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1981 (Feb 17, 2004).
- 129.J. L. Kubinak, J. L. Round, *Nat Rev Immunol* **16**, 767 (Dec, 2016).
- 130.K. Moor *et al.*, *Nature* **544**, 498 (Apr 27, 2017).
- 131.E. W. Rogier, A. L. Frantz, M. E. Bruno, C. S. Kaetzel, *Pathogens* **3**, 390 (Apr 29, 2014).
- 132.M. I. Fernandez *et al.*, *Immunity* **18**, 739 (Jun, 2003).
- 133.S. Boullier *et al.*, *J Immunol* **183**, 5879 (Nov 1, 2009).

- 134.A. Mathias, S. Longet, B. Corthesy, *Infect Immun* **81**, 3027 (Aug, 2013).
- 135.A. Phalipon *et al.*, *Immunity* **17**, 107 (Jul, 2002).
- 136.C. Perrier, N. Sprenger, B. Corthesy, *J Biol Chem* **281**, 14280 (May 19, 2006).
- 137.J. J. Bunker *et al.*, *Science* **358**, (Oct 20, 2017).
- 138.J. J. Bunker *et al.*, *Immunity* **43**, 541 (Sep 15, 2015).
- 139.J. Diana *et al.*, *J Immunol* **191**, 2335 (Sep 1, 2013).
- 140.R. Salerno-Goncalves, F. Safavie, A. Fasano, M. B. Szein, *Clin Exp Immunol* **185**, 338 (Sep, 2016).
- 141.C. Saha *et al.*, *Front Immunol* **8**, 275 (2017).
- 142.M. Wehrli *et al.*, *J Immunol* **193**, 5649 (Dec 1, 2014).
- 143.A. J. Macpherson, K. D. McCoy, F. E. Johansen, P. Brandtzaeg, *Mucosal Immunol* **1**, 11 (Jan, 2008).
- 144.K. A. Kadaoui, B. Corthesy, *J Immunol* **179**, 7751 (Dec 1, 2007).
- 145.I. S. Hansen, W. Hoepel, S. A. J. Zaat, D. L. P. Baeten, J. den Dunnen, *J Immunol* **199**, 4124 (Dec 15, 2017).
- 146.M. van Egmond *et al.*, *Nat Med* **6**, 680 (Jun, 2000).
- 147.L. van der Steen *et al.*, *Gastroenterology* **137**, 2018 (Dec, 2009).
- 148.E. Aleyd *et al.*, *J Immunol* **192**, 2374 (Mar 1, 2014).
- 149.E. Aleyd, M. H. Heineke, M. van Egmond, *Immunol Rev* **268**, 123 (Nov, 2015).
- 150.M. H. Heineke, M. van Egmond, *Eur J Clin Invest* **47**, 184 (Feb, 2017).
- 151.K. Moor, E. Slack, *Antibodies* **4**, 295 (2015).
- 152.P. N. Boyaka, *J Immunol* **199**, 9 (Jul 1, 2017).
- 153.M. R. Neutra, P. A. Kozlowski, *Nat Rev Immunol* **6**, 148 (Feb, 2006).
- 154.M. Iwata *et al.*, *Immunity* **21**, 527 (Oct, 2004).
- 155.S. H. Kim, Y. S. Jang, *Clin Exp Vaccine Res* **6**, 15 (Jan, 2017).
- 156.H. Shin, A. Iwasaki, *Nature* **491**, 463 (Nov 15, 2012).
- 157.E. L. Johansson, L. Wassen, J. Holmgren, M. Jertborn, A. Rudin, *Infect Immun* **69**, 7481 (Dec, 2001).
- 158.P. A. Kozlowski, S. Cu-Uvin, M. R. Neutra, T. P. Flanagan, *Infect Immun* **65**, 1387 (Apr, 1997).
- 159.P. A. Crowley-Nowick *et al.*, *J Clin Immunol* **17**, 370 (Sep, 1997).
- 160.M. Yu, M. Vajdy, *Expert Opin Biol Ther* **10**, 1181 (Aug, 2010).
- 161.M. N. Kweon, *Cytokine* **54**, 1 (Apr, 2011).
- 162.H. Kraan *et al.*, *J Control Release* **190**, 580 (Sep 28, 2014).
- 163.P. Moingeon, L. Mascarell, *Semin Immunol* **30**, 52 (Apr, 2017).
- 164.F. Frati *et al.*, *Drug Des Devel Ther* **4**, 99 (Jul 21, 2010).
- 165.C. Keijzer, R. van der Zee, W. van Eden, F. Broere, *Front Immunol* **4**, 245 (2013).
- 166.N. Lycke, *Nat Rev Immunol* **12**, 592 (Jul 25, 2012).
- 167.H. Kiyono, S. Fukuyama, *Nat Rev Immunol* **4**, 699 (Sep, 2004).
- 168.Y. Date *et al.*, *Int Immunol* **29**, 471 (Dec 18, 2017).
- 169.M. Wang, Z. Gao, Z. Zhang, L. Pan, Y. Zhang, *Hum Vaccin Immunother* **10**, 3544 (2014).
- 170.N. Rochereau *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* **137**, 214 (Jan, 2016).
- 171.M. Kilian, J. Mestecky, M. W. Russell, *Microbiol Rev* **52**, 296 (Jun, 1988).
- 172.N. Rochereau *et al.*, *Eur J Immunol* **45**, 773 (Mar, 2015).
- 173.H. Shima *et al.*, *Int Immunol* **26**, 619 (Nov, 2014).
- 174.R. R. Dourmashkin, G. Virella, R. M. Parkhouse, *J Mol Biol* **56**, 207 (Feb 28, 1971).
- 175.P. W. Tucker, J. L. Slightom, F. R. Blattner, *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7684 (Dec, 1981).
- 176.M. van Egmond *et al.*, *Blood* **93**, 4387 (Jun 15, 1999).
- 177.J. Mikulic, G. Bioley, B. Corthesy, *J Mol Biol* **429**, 2387 (Jul 21, 2017).
- 178.K. Ariizumi *et al.*, *J Biol Chem* **275**, 20157 (Jun 30, 2000).
- 179.E. A. Gelzayd, S. C. Kraft, J. B. Kirsner, *Gastroenterology* **54**, 334 (Mar, 1968).
- 180.K. Hjelt, C. H. Sorensen, O. H. Nielsen, P. A. Krasilnikoff, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **7**, 867 (Nov-Dec, 1988).
- 181.G. Magri *et al.*, *Immunity* **47**, 118 (Jul 18, 2017).
- 182.M. Boes *et al.*, *J Immunol* **160**, 4776 (May 15, 1998).
- 183.P. Brandtzaeg, *J Oral Microbiol* **5**, (2013).
- 184.T. E. Michaelsen *et al.*, *Scand J Immunol* **85**, 43 (Jan, 2017).
- 185.N. M. Croft, M. Hodges, *Scand J Gastroenterol* **40**, 965 (Aug, 2005).
- 186.A. Shibuya *et al.*, *Nat Immunol* **1**, 441 (Nov, 2000).
- 187.S. Bournazos, J. M. Woof, S. P. Hart, I. Dransfield, *Clin Exp Immunol* **157**, 244 (Aug, 2009).
- 188.H. Shima *et al.*, *Int Immunol* **22**, 149 (Mar, 2010).
- 189.Y. Hitoshi *et al.*, *Immunity* **8**, 461 (Apr, 1998).
- 190.K. S. Lang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2593 (Feb 12, 2013).
- 191.K. Honjo, Y. Kubagawa, H. Kubagawa, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E2540 (Jul 9, 2013).
- 192.H. Kubagawa *et al.*, *J Exp Med* **206**, 2779 (Nov 23, 2009).
- 193.R. Ouchida *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2699 (Oct 2, 2012).
- 194.P. Brandtzaeg, *Immunology* **29**, 559 (Sep, 1975).
- 195.P. Brandtzaeg, *J Immunol* **112**, 1553 (Apr, 1974).
- 196.M. W. Reeves, G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, J. J. Farmer, 3rd, *J Clin Microbiol* **27**, 313 (Feb, 1989).
197. .
- 198.M. Achtman *et al.*, *PLoS Pathog* **8**, e1002776 (2012).
- 199.A. J. Baumler, R. M. Tsois, T. A. Ficht, L. G. Adams, *Infect Immun* **66**, 4579 (Oct, 1998).
- 200.G. C. Langridge *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 863 (2015).

- 201.E. J. Klemm *et al.*, *Nat Microbiol* **1**, 15023 (Jan 25, 2016).
- 202.A. N. Gill *et al.*, *Pediatr Infect Dis J* **36**, 910 (Sep, 2017).
- 203.J. S. Gunn *et al.*, *Trends Microbiol* **22**, 648 (Nov, 2014).
204. .
- 205.J. S. Marr, *The Lancet* **353**, 1714 (1999).
- 206.M. McClelland *et al.*, *Nature Genetics* **36**, 1268 (2004).
- 207.M. Raffatellu *et al.*, *Infect Immun* **73**, 3367 (Jun, 2005).
- 208.R. P. Wilson *et al.*, *Cell Microbiol* **10**, 876 (Apr, 2008).
- 209.T. Wangdi *et al.*, *PLoS Pathog* **10**, e1004306 (Aug, 2014).
- 210.P. A. Barrow, *Avian Pathol* **22**, 651 (Dec, 1993).
- 211.E. Zaidi, R. Bachur, M. Harper, *Pediatr Infect Dis J* **18**, 1073 (Dec, 1999).
- 212.J. Galofre *et al.*, *Clin Infect Dis* **18**, 873 (Jun, 1994).
- 213.J. J. Gilchrist, C. A. MacLennan, A. V. S. Hill, *Nature Reviews Immunology* **15**, 452 (2015).
- 214.S. J. Dunstan *et al.*, *Nature Genetics* **46**, 1333 (2014).
- 215.J. R. Andrews, E. T. Ryan, *Vaccine* **33**, C8 (2015).
- 216.N. Batool, M. Waqar, S. Batool, *Gene* **576**, 544 (Jan 15, 2016).
- 217.J. J. Gilchrist *et al.*, *The Lancet* **385**, S13 (2015).
- 218.S. E. Park *et al.*, *Clinical Infectious Diseases* **62**, S23 (2016).
- 219.T. S. Nyirenda, W. L. Mandala, M. A. Gordon, P. Mastroeni, *Microbes Infect*, (Dec 15, 2017).
- 220.M. C. Cacemiro *et al.*, *Adv Exp Med Biol*, (Apr 27, 2017).
- 221.N. A. Feasey *et al.*, *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0003979 (2015).
- 222.N. Tran Vu Thieu *et al.*, *Journal of Infection* **75**, 104 (2017).
- 223.S. R. Prabakaran *et al.*, *Journal of Microbiological Methods* **139**, 150 (2017).
- 224.X. Zhang *et al.*, *Journal of Microbiological Methods* **139**, 202 (2017).
- 225.E. Fernandes *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics* **52**, 239 (2014).
- 226.J. D. Nelson, H. Kusmiesz, L. H. Jackson, E. Woodman, *Pediatrics* **65**, 1125 (Jun, 1980).
- 227.M. S. Dryden, R. J. Gabb, S. K. Wright, *Clin Infect Dis* **22**, 1019 (Jun, 1996).
- 228.I. A. Onwuezobe, P. O. Oshun, C. C. Odigwe, (2012).
- 229.C. Cremon *et al.*, *Gastroenterology* **147**, 69 (2014).
- 230.G. C. Buckle, C. L. Walker, R. E. Black, *J Glob Health* **2**, 010401 (Jun, 2012).
- 231.V. Mogasale *et al.*, *Lancet Glob Health* **2**, e570 (Oct, 2014).
- 232.V. Mogasale *et al.*, *BMC Infectious Diseases* **16**, (2016).
- 233.J. Wain, R. S. Hendriksen, M. L. Mikoleit, K. H. Keddy, R. L. Ochiai, *Lancet* **385**, 1136 (Mar 21, 2015).
- 234.K. Hoelzer, A. I. Moreno Switt, M. Wiedmann, *Vet Res* **42**, 34 (Feb 14, 2011).
- 235.Susan C. Morpeth, Habib O. Ramadhani, John A. Crump, *Clinical Infectious Diseases* **49**, 606 (2009).
- 236.Shannon E. Majowicz *et al.*, *Clinical Infectious Diseases* **50**, 882 (2010).
- 237.T. T. Ao *et al.*, *Emerging Infectious Diseases* **21**, 941 (2015).
- 238.S. Baker, I. V. Uche, C. A. MacLennan, A. Saul, *PLoS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005118 (2017).
- 239.K. L. Kotloff *et al.*, *Lancet* **382**, 209 (Jul 20, 2013).
- 240.J. R. Verani *et al.*, *Clinical Infectious Diseases* **61**, S302 (2015).
- 241.I. V. Uche, C. A. MacLennan, A. Saul, *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005118 (Jan, 2017).
- 242.N. A. Feasey, G. Dougan, R. A. Kingsley, R. S. Heyderman, M. A. Gordon, *Lancet* **379**, 2489 (Jun 30, 2012).
- 243.G. Ramachandran, K. Aheto, M. E. Shirliff, S. M. Tennant, J. Kaper, *Pathogens and Disease* **74**, ftw049 (2016).
- 244.K. B. Gibney, J. O'Toole, M. Sinclair, K. Leder, *International Journal of Infectious Diseases* **28**, 176 (2014).
- 245.M. Chironna *et al.*, *Public Health* **128**, 438 (2014).
- 246.G. Jones *et al.*, *Eurosurveillance* **21**, (2016).
- 247.N. Jourdan-da Silva *et al.*, *Euro Surveill* **23**, (Jan, 2018).
- 248.T. C. Darton, C. J. Blohmke, A. J. Pollard, *Current Opinion in Gastroenterology* **30**, 7 (2014).
- 249.J. A. Crump, R. S. Heyderman, *Clinical Infectious Diseases* **61**, S235 (2015).
- 250.A. H. Haselbeck *et al.*, *Current Opinion in Infectious Diseases* **30**, 498 (2017).
- 251.J. O. Oundo *et al.*, *East Afr Med J* **79**, 633 (Dec, 2002).
- 252.S. I. Smith, A. Seriki, A. Ajayi, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **35**, 1913 (Dec, 2016).
- 253.P. Rishi *et al.*, *Plos One* **10**, e0137967 (2015).
- 254.A. E. Mather *et al.*, *Science* **341**, 1514 (2013).
- 255.R. M. Card *et al.*, *mBio* **8**, e00777 (2017).
- 256.N. A. Feasey *et al.*, *Nat Genet* **48**, 1211 (Oct, 2016).
- 257.J. Wain *et al.*, *Clin Infect Dis* **25**, 1404 (Dec, 1997).
- 258.A. Karkey, G. E. Thwaites, S. Baker, *Current Opinion in Gastroenterology*, 1 (2017).
- 259.C. S. Chiou *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 6501 (2014).
- 260.V. K. Wong *et al.*, *Nature Genetics* **47**, 632 (2015).
- 261.S. Kariuki, M. A. Gordon, N. Feasey, C. M. Parry, *Vaccine* **33**, C21 (2015).
- 262.V. K. Wong *et al.*, *The Lancet* **387**, S10 (2016).
- 263.P. Garcia *et al.*, *Plos One* **9**, e89635 (2014).
- 264.T. Wirth, *Nature Genetics* **47**, 565 (2015).
- 265.A. Cloeckeaert *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1872 (May, 2007).
- 266.L. Colobatiu *et al.*, *Gut Pathogens* **7**, (2015).
- 267.N. Balaban *et al.*, *PLoS Biology* **12**, e1001928 (2014).
- 268.B. Claudi *et al.*, *Cell* **158**, 722 (2014).
- 269.M. Diard *et al.*, *Science* **355**, 1211 (Mar 17, 2017).
- 270.A. Kulp, M. J. Kuehn, *Annu Rev Microbiol* **64**, 163 (2010).

- 271.K. Nishino, T. Latifi, E. A. Groisman, *Mol Microbiol* **59**, 126 (Jan, 2006).
- 272.N. M. Vega, K. R. Allison, A. N. Samuels, M. S. Klempner, J. J. Collins, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14420 (Aug 27, 2013).
- 273.A. S. Azman *et al.*, *PLOS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005283 (2017).
- 274.R. Gayet, G. Bioley, N. Rochereau, S. Paul, B. Corthesy, *Microbiol Mol Biol Rev* **81**, (Sep, 2017).
- 275.S. L. Liu, K. E. Sanderson, *J Bacteriol* **177**, 5099 (Sep, 1995).
- 276.Q.-H. Zou, R.-Q. Li, G.-R. Liu, S.-L. Liu, *Infection, Genetics and Evolution* **26**, 295 (2014).
- 277.O. Gal-Mor, E. C. Boyle, G. A. Grassl, *Frontiers in Microbiology* **5**, (2014).
- 278.K. E. Holt *et al.*, *Nature Genetics* **40**, 987 (2008).
- 279.R. W. Crawford, D. L. Gibson, W. W. Kay, J. S. Gunn, *Infect Immun* **76**, 5341 (Nov, 2008).
- 280.D. L. Gibson *et al.*, *J Bacteriol* **188**, 7722 (Nov, 2006).
- 281.E. Haghjoo, J. E. Galan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4614 (Mar 30, 2004).
- 282.S. Spano, J. E. Ugalde, J. E. Galan, *Cell Host Microbe* **3**, 30 (Jan 17, 2008).
- 283.S.-J. Chang, J. Song, J. E. Galán, *Cell Host & Microbe* **20**, 682 (2016).
- 284.J. E. Galan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 6338 (Jun 7, 2016).
- 285.A. Chong, S. Lee, Y. A. Yang, J. Song, *Yale J Biol Med* **90**, 283 (Jun, 2017).
- 286.L. D. Rodriguez-Rivera, B. M. Bowen, H. C. den Bakker, G. E. Duhamel, M. Wiedmann, *Gut Pathogens* **7**, (2015).
- 287.C. R. Eade *et al.*, *Infect Immun* **84**, 2198 (Aug, 2016).
- 288.I. Spadoni *et al.*, *Science* **350**, 830 (Nov 13, 2015).
- 289.J. W. Foster, H. K. Hall, *J Bacteriol* **173**, 5129 (Aug, 1991).
- 290.H. Dong *et al.*, *Nature* **511**, 52 (2014).
- 291.J. M. Marshall, J. S. Gunn, A. J. Bäumlner, *Infection and Immunity* **83**, 3946 (2015).
- 292.Y. Shi, L. Mu, *Cell Mol Immunol* **14**, 339 (Apr, 2017).
- 293.K. J. Rangan, H. C. Hang, *Trends Biochem Sci* **42**, 887 (Nov, 2017).
- 294.R. M. Nardi, M. E. Silva, E. C. Vieira, E. A. Bambirra, J. R. Nicoli, *Braz J Med Biol Res* **22**, 1389 (1989).
- 295.I. Sekirov *et al.*, *Infect Immun* **76**, 4726 (Oct, 2008).
- 296.E. Deriu *et al.*, *Cell Host Microbe* **14**, 26 (Jul 17, 2013).
- 297.S. Yurist-Doutsch, M. C. Arrieta, S. L. Vogt, B. B. Finlay, *Annu Rev Genet* **48**, 361 (2014).
- 298.M. Fernandez-Santoscoy *et al.*, *Front Cell Infect Microbiol* **5**, 93 (2015).
- 299.K. S. Ost, J. L. Round, *Immunity* **46**, 977 (Jun 20, 2017).
- 300.S. Thiemann *et al.*, *Cell Host Microbe* **21**, 682 (Jun 14, 2017).
- 301.R. D. Wagner, S. J. Johnson, *BMC Microbiol* **17**, 77 (Mar 29, 2017).
- 302.B. D. Jones, N. Ghori, S. Falkow, *J Exp Med* **180**, 15 (Jul 1, 1994).
- 303.K. E. Sivick *et al.*, *Cell Host Microbe* **15**, 203 (Feb 12, 2014).
- 304.L. Cervantes-Barragan *et al.*, *Eur J Immunol* **39**, 126 (Jan, 2009).
- 305.E. Jouanguy *et al.*, *Curr Opin Immunol* **11**, 346 (Jun, 1999).
- 306.A. Kupz *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2252 (Feb 5, 2013).
- 307.C. R. Sturge *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10711 (Jun 25, 2013).
- 308.C. Perez-Shibayama *et al.*, *J Immunol* **192**, 5192 (Jun 1, 2014).
- 309.D. J. Cua, C. M. Tato, *Nat Rev Immunol* **10**, 479 (Jul, 2010).
- 310.M. Perez-Toledo *et al.*, *Front Immunol* **8**, 230 (2017).
- 311.S. H. Browne, P. Hasegawa, S. Okamoto, J. Fierer, D. G. Guiney, *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 194 (Mar, 2008).
- 312.T. Nikolaus *et al.*, *J Bacteriol* **183**, 6036 (Oct, 2001).
- 313.R. S. Negm, T. G. Pistole, *Can J Microbiol* **45**, 658 (Aug, 1999).
- 314.C. J. Reynolds *et al.*, *Immunology* **143**, 438 (Nov, 2014).
- 315.C. A. MacLennan, L. B. Martin, F. Micoli, *Hum Vaccin Immunother* **10**, 1478 (2014).
- 316.S. I. Tamura, T. Kurata, *Jpn J Infect Dis* **53**, 98 (Jun, 2000).
- 317.M. Larena, J. Holmgren, M. Lebens, M. Terrinoni, A. Lundgren, *J Immunol* **194**, 3829 (Apr 15, 2015).
- 318.F. Pigny *et al.*, *J Infect Dis* **214**, 438 (Aug 1, 2016).
- 319.A. Phalipon *et al.*, *J Exp Med* **182**, 769 (Sep 1, 1995).
- 320.P. Michetti, M. J. Mahan, J. M. Schlauch, J. J. Mekalanos, M. R. Neutra, *Infect Immun* **60**, 1786 (May, 1992).
- 321.L. I. Favre, F. Spertini, B. Corthesy, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **786**, 143 (Mar 25, 2003).
- 322.P. Crottet, S. Cottet, B. Corthesy, *Biochem J* **341** (Pt 2), 299 (Jul 15, 1999).
- 323.S. Barat *et al.*, *PLoS Pathog* **8**, e1002966 (2012).
- 324.P. D. Kumar, S. Krishnaswamy, *Protein Expr Purif* **40**, 126 (Mar, 2005).
- 325.S. J. Santegoets *et al.*, *J Leukoc Biol* **80**, 1337 (Dec, 2006).
- 326.A. des Rieux *et al.*, *Eur J Pharm Sci* **30**, 380 (Apr, 2007).
- 327.S. Ben Mkaddem, E. Rossato, N. Heming, R. C. Monteiro, *Autoimmun Rev* **12**, 666 (Apr, 2013).
- 328.J. Torres, S. Mehandru, J. F. Colombel, L. Peyrin-Biroulet, *Lancet* **389**, 1741 (Apr 29, 2017).
- 329.M. E. Koshland, R. M. Chapuis, B. Recht, J. C. Brown, *J Immunol* **118**, 775 (Mar, 1977).
- 330.P. Brandtzaeg, *Clin Exp Immunol* **44**, 221 (May, 1981).
- 331.C. A. Ogden, R. Kowalewski, Y. Peng, V. Montenegro, K. B. Elkon, *Autoimmunity* **38**, 259 (Jun, 2005).
- 332.F. Mackay, P. Schneider, P. Rennert, J. Browning, *Annu Rev Immunol* **21**, 231 (2003).
- 333.E. Castigli *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3903 (Mar 16, 2004).

- 334.E. Castigli *et al.*, *J Exp Med* **201**, 35 (Jan 3, 2005).
- 335.G. Teng, F. N. Papavasiliou, *Annu Rev Genet* **41**, 107 (2007).
- 336.S. E. Majowicz *et al.*, *Clin Infect Dis* **50**, 882 (Mar 15, 2010).
- 337.T. C. Darton, C. J. Blohmke, A. J. Pollard, *Curr Opin Gastroenterol* **30**, 7 (Jan, 2014).
- 338.C. Jung, J. P. Hugot, F. Barreau, *Int J Inflam* **2010**, 823710 (Sep 19, 2010).
- 339.C. A. MacLennan *et al.*, *J Clin Invest* **118**, 1553 (Apr, 2008).
- 340.O. L. Wijburg *et al.*, *J Exp Med* **203**, 21 (Jan 23, 2006).
- 341.P. Crottet, B. Corthesy, *J Immunol* **161**, 5445 (Nov 15, 1998).
- 342.I. Secundino *et al.*, *Immunology* **117**, 59 (Jan, 2006).
- 343.S. Leach, J. D. Clements, J. Kaim, A. Lundgren, *Plos One* **7**, e51718 (2012).
- 344.E. B. Norton *et al.*, *Vaccine* **33**, 1909 (Apr 15, 2015).
- 345.S. J. McSorley, *Immunol Rev* **260**, 168 (Jul, 2014).
- 346.S. J. Lee, S. Dunmire, S. J. McSorley, *Immunol Lett* **148**, 138 (Dec 17, 2012).
- 347.G. Bioley *et al.*, *Front Immunol* **8**, 1043 (2017).
- 348.W. M. Bogers, R. K. Stad, L. A. van Es, M. R. Daha, *Complement Inflamm* **8**, 347 (1991).
- 349.A. Roos *et al.*, *J Immunol* **167**, 2861 (Sep 1, 2001).
- 350.D. Hermant, R. Menard, N. Arricau, C. Parsot, M. Y. Popoff, *Mol Microbiol* **17**, 781 (Aug, 1995).
- 351.M. Fukushima, K. Kakinuma, R. Kawaguchi, *J Clin Microbiol* **40**, 2779 (Aug, 2002).
- 352.B. Corthesy, G. Bioley, *Front Immunol* **9**, 431 (2018).
- 353.C. R. Stokes, J. F. Soothill, M. W. Turner, *Nature* **255**, 745 (Jun 26, 1975).
- 354.V. Flacher *et al.*, *J Immunol* **177**, 7959 (Dec 1, 2006).
- 355.J. M. Phillips-Quagliata, *Immunogenetics* **53**, 1033 (Mar, 2002).
- 356.P. Lipniunas, G. Gronberg, H. Krotkiewski, A. S. Angel, B. Nilsson, *Arch Biochem Biophys* **300**, 335 (Jan, 1993).
- 357.B. D. Wines *et al.*, *J Biol Chem* **286**, 33118 (Sep 23, 2011).
- 358.A. J. Macpherson, M. B. Geuking, E. Slack, S. Hapfelmeier, K. D. McCoy, *Immunol Rev* **245**, 132 (Jan, 2012).
- 359.M. Vajdy *et al.*, *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 1269 (Nov, 2004).
- 360.N. Jackson, E. Compton, J. Trowsdale, A. P. Kelly, *Eur J Immunol* **44**, 962 (Apr, 2014).
- 361.J. M. Sahler, C. R. Eade, C. Altier, J. C. March, *Infect Immun* **86**, (May, 2018).
- 362.K. Biswas, M. Hoggard, R. Jain, M. W. Taylor, R. G. Douglas, *Front Microbiol* **9**, 134 (2015).
- 363.J. Gerritsen, H. Smidt, G. T. Rijkers, W. M. de Vos, *Genes Nutr* **6**, 209 (Aug, 2011).
- 364.I. N. Norderhaug, F. E. Johansen, H. Schjerven, P. Brandtzaeg, *Crit Rev Immunol* **19**, 481 (1999).
- 365.D. Tsiantoulas *et al.*, *Sci Rep* **7**, 3540 (Jun 14, 2017).
- 366.L. Mellander, B. Carlsson, L. A. Hanson, *J Pediatr* **104**, 564 (Apr, 1984).
- 367.H. Wang, J. E. Coligan, H. C. Morse, 3rd, *Front Immunol* **7**, 99 (2016).
- 368.V. N. Petrova, C. A. Russell, *Nat Rev Microbiol* **16**, 60 (Jan, 2018).
- 369.B. Bernocchi, R. Carpentier, D. Betbeder, *Int J Pharm* **530**, 128 (Sep 15, 2017).
- 370.B. S. Shim, Y. Choi, I. S. Cheon, M. K. Song, *Immune Netw* **13**, 81 (Jun, 2013).
- 371.Q. Duan *et al.*, *J Vaccines Vaccin* **8**, (Aug, 2017).
- 372.D. A. Peterson, N. P. McNulty, J. L. Guruge, J. I. Gordon, *Cell Host Microbe* **2**, 328 (Nov 15, 2007).
- 373.E. J. Breese *et al.*, *Gastroenterology* **106**, 1455 (Jun, 1994).

Impact de la réponse IgA dans une nouvelle stratégie de vaccination muqueuse contre *Salmonella* et dans la régulation de la réponse adaptative

Les entérobactéries *Salmonella* espèce *enterica* sous-espèce *enterica* sont divisées en plusieurs sérovars dont les quatre principaux Typhimurium, Enteritidis, Typhi et Paratyphi sont responsables soit de gastroentérites soit de fièvres typhoïdes, à raison de plus de 90 millions de cas et 400 000 décès par an. L'apparition de souches multi-résistantes nécessite la mise en place d'une vaccination prophylactique à ce jour peu utilisée contre des pathogènes responsables de maladies entériques du fait des limitations induites par les contraintes d'une administration par voie orale. Notamment, l'environnement intestinal est caractérisé par une balance entre tolérance immunitaire et réaction inflammatoire régulée en partie par les immunoglobulines (Ig) M et surtout par les IgA sécrétoires. Alors que les IgM sont principalement retrouvées sous forme pentamériques, les IgA des sécrétions muqueuses sont dimériques alors que celles rencontrées dans le sérum sont sous forme monomérique. Les IgA sont des anticorps pour lesquels deux isotypes ont été décrits chez l'Homme: IgA1 et IgA2. Le premier but de ce travail de thèse a été d'explorer les fonctions des différents isotypes et isoformes des IgA humaines. Nous avons ainsi pu noter un rôle anti-inflammatoire des IgA1 à l'inverse d'un rôle pro-inflammatoire des IgA2. Enfin, nous avons souligné un processus de régulation de l'expression des récepteurs aux IgA par les IgA elles-mêmes ainsi qu'un axe IgA/lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Le deuxième objectif de ce travail de thèse a consisté à mettre en place un vaccin multivalent composé des antigènes SseB et OmpC de *Salmonella* liés à des Ig sécrétoires. Cette étude a mis en évidence une solide réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique aux antigènes couplés à des IgA ou IgM après vaccination intra-nasale aussi bien au niveau systémique que muqueux. Par ailleurs, une plus forte sécrétion d'anticorps spécifiques et de cytokines ainsi qu'une plus forte prolifération de lymphocytes T ont été observés en couplant à la fois OmpC et SseB sur l'IgA. Ces données suggèrent donc l'utilisation des Ig comme vecteur vaccinal nasal pour un vaccin multivalent muqueux. Ce travail de thèse ouvre de nouvelles perspectives pour la mise en place de vaccins muqueux et pour l'utilisation d'anticorps comme vecteurs. Notamment, la réponse recherchée pourrait être induite en fonction de l'isoforme ou de l'isotype de l'anticorps utilisé. Enfin, cette variation de réponse suivant la conformation de l'IgA pourrait apporter de nombreuses réponses quant à leurs rôles dans les muqueuses

Impact of IgA response in both a novel mucosal vaccine strategy against *Salmonella* and the regulation of adaptive immunity

The enterobacteria *Salmonella* species *enterica* sub-species *enterica* are divided into several serovars such as Typhimurium, Enteritidis, Typhi and Paratyphi which are the major causative agents of either gastroenteritis or typhoid fever. They are responsible for more than 90 million cases and 400 000 deaths each year. The increase in multi-drug resistant strains requires the implementation of prophylactic vaccines against enteric pathogen, which are poorly used today owing to the limitations linked to the oral route of administration. Besides, the intestinal environment is characterized by a balance between immune tolerance and inflammatory response tightly regulated by secretory immunoglobulins (Ig) M but especially by IgA. While IgM are found under pentameric form, mucosal IgA are mainly dimeric and serum IgA monomeric. Two IgA isotypes have been described in humans: IgA1 and IgA2. The first aim of this thesis has been to explore the functions of the different isotypes and isoforms of human IgA. We pointed out a pro-inflammatory role of IgA2 whereas IgA1 rather oriented the immunity towards an anti-inflammatory response. We have also highlighted both the regulation of IgA receptors expression by IgA and an IgA/CD8 cytotoxic T cells axis. The second aim was to design a multivalent vaccine against *Salmonella* by coupling two antigens – SseB and OmpC – to secretory Ig. This study has pointed out solid specific humoral and cellular responses against both these antigens coupled to either IgA or IgM after intra-nasal immunization in mucosal but also systemic compartments. We have also demonstrated the possibility to preserve and increase the antigen immunogenicity with a multivalent vaccine. This thesis thus paves the way for new secretory Ig-vectorized mucosal vaccines. In this context the immune response could be modulated through the chosen isotype or isoform. Finally, the differences in immune activation generated by structural changes in IgA could shed some light on their role in mucosal homeostasis.