



HAL
open science

Identification et caractérisation des micro-organismes de la flore intestinale possédant des fonctions immunomodulatrices chez l'hôte.

Sarah Jegou

► To cite this version:

Sarah Jegou. Identification et caractérisation des micro-organismes de la flore intestinale possédant des fonctions immunomodulatrices chez l'hôte.. Microbiologie et Parasitologie. 2018. hal-01979926

HAL Id: hal-01979926

<https://ephe.hal.science/hal-01979926>

Submitted on 16 Jan 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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
Présenté par

Sarah Jegou

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Identification et caractérisation des micro-organismes de la flore
intestinale possédant des fonctions immunomodulatrices chez
l'hôte.**

Soutenu le 06 décembre 2018 devant le jury suivant :

Mme Thi My Anh NEILDEZ – Président
M Harry SOKOL – Tuteur scientifique
M Bruno CANQUE – Tuteur pédagogique
M Philippe GERARD – Rapporteur
M Nicolas LAPAQUE – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Tuteur scientifique : Professeur Harry SOKOL

CNRS UMR 7203, Sorbonne université, ENS, ERL INSERM 1157, Laboratoire des biomolécules, équipe 4, Micro-organismes et physiopathologie intestinale. Site de la faculté de médecine de Saint-Antoine, Paris

Tutorat pédagogique : Professeur Bruno CANQUE

UMR INSERM/UPVII/EPHE 1126.

Institut Universitaire d'Hématologie, Centre Hayem, Hôpital Saint Louis, Paris

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
Présenté par

Sarah Jegou

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Identification et caractérisation des micro-organismes de la flore
intestinale possédant des fonctions immunomodulatrices chez
l'hôte.**

Soutenu le 06 décembre 2018 devant le jury suivant :

Mme Thi My Anh NEILDEZ – Président
M Harry SOKOL – Tuteur scientifique
M Bruno CANQUE – Tuteur pédagogique
M Philippe GERARD – Rapporteur
M Nicolas LAPAQUE – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Tuteur scientifique : Professeur Harry SOKOL

CNRS UMR 7203, Sorbonne université, ENS, ERL INSERM 1157, Laboratoire des biomolécules, équipe 4, Micro-organismes et physiopathologie intestinale. Site de la faculté de médecine de Saint-Antoine, Paris

Tutorat pédagogique : Professeur Bruno CANQUE

UMR INSERM/UPVII/EPHE 1126.

Institut Universitaire d'Hématologie, Centre Hayem, Hôpital Saint Louis, Paris

Remerciements

Je tiens tous d'abord à remercier le Professeur Harry SOKOL de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de recherche, d'avoir accepté de me laisser faire cette formation et d'avoir été mon tuteur scientifique durant les 3 années de ce diplôme. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir offert l'opportunité de conduire cette aventure scientifique.

Je remercie également le Professeur Bruno Canque qui fut mon tuteur pédagogique et qui m'a conseillé pour construire mon parcours à l'EPHE.

Je souhaite remercier les membres du jury : Mme Thi My Anh NEILDEZ d'avoir accepté de le présider, M Philippe GERARD d'avoir accepté d'être mon rapporteur et M Nicolas LAPAQUE d'avoir accepté d'être mon examinateur.

Je remercie les membres du labo U1157, ceux qui sont déjà parti mais avec qui l'ambiance n'a été sans pareil : Valentin, Claire et Emilie. Et ceux qui sont toujours là Loïc et les Elodie's. C'est grâce à vous que le labo a été ma deuxième maison, surtout les vendredis soir !...

Je remercie Annie Munnier de la plateforme de cytométrie pour son aide et son soutien durant de très intéressantes conversations.

J'ai une très très bonne nouvelles pour Gilles, Ariane, Chloé et Elodie (t'as vus tu es même 2 fois dans mes remerciements !!), vous n'aurez plus à m'écouter radoter sur les moindres étapes de ce parcours ! En tous cas merci d'avoir été là dans les moments difficiles car vous m'avez supportée sans broncher et ça ce fut très fort de votre part.

Un grand merci à Gilles de m'avoir accompagnée, soutenue, supportée, conseillée, tu as été en quelque sorte mon pilier.

Pour finir je remercie ma famille de m'avoir aidée à accéder à cette formation. Merci à vous ainsi qu'à Juliette et Kevin d'être simplement là.

Table des matières

Partie I - Etat de l'art	3
Chapitre 1 : Le microbiote intestinal	4
1.1) Description et techniques d'identification	4
1.2) Facteurs influençant le microbiote.....	5
1.3) Métabolisme du microbiote	8
1.4) Fonction du microbiote.....	10
1.5) Effet du microbiote sur l'hôte.....	15
1.6) La barrière intestinale	16
Chapitre 2 : Interaction microbiote-système immunitaire	18
2.1) Organisation du système immunitaire intestinal	18
2.2) Régulation du système immunitaire par le microbiote	20
2.3) Régulation du microbiote intestinal par le système immunitaire	25
Chapitre 3 : Les perturbations du microbiote et leurs implications en physiopathologie	29
3.1) Qu'est-ce que la dysbiose ?	29
3.2) Les maladies liées à la dysbiose : exemple des MICI	33
Partie II - Objectif de l'étude.....	36
Partie III - Matériels et Méthodes.....	39
1.1) Présentation de la collection des bactéries intestinales étudiées	40
1.2) Stimulation bactérienne et culture cellulaire	45
1.3) Analyse de la réponse à la stimulation	47
Partie IV - Résultats	57
Chapitre 1 : Etude des composants bactériens sur la production cytokinique des PBMC ...	58
1.1) Optimisation de la stimulation des PBMC par les culots et surnageants bactériens .	58
1.2) Réponse à la stimulation.....	59

Chapitre 2 : Etude approfondie de la production de cytokines par Luminex	67
2.1) Etude de la production des cytokines induite par les culots bactériens	67
2.2) Sélection des bactéries à étudier	70
Chapitre 3 : Etude des populations cellulaires stimulées par cytométrie en flux	72
3.1) Population monocytaire	72
3.2) Production de cytokines par les monocytes	73
Partie V - Discussion et perspectives	75
Chapitre 1 : Les surnageants induisent peu la production de cytokines	77
Chapitre 2 : Les culots bactériens étudiés possèdent des profils variés	78
2.1) Les Bacteroidetes	78
2.2) Les Firmicutes	80
Chapitre 3 : Questions et perspectives	81
3.1) Nouvelles pistes d'analyse	81
3.2) Perspectives de nos résultats	84
Partie VI - Bibliographie	86

Liste des abréviations :

AGCC : *Acide gras à chaîne courte*
AHR : *Aryl Hydrocarbon Receptor*
ATCC : *American type culture collection*
BFA : *Brefeldine A*
CD : *Cluster de différenciation*
CEI : *Cellule épithéliale intestinale*
CFU : *Colony forming units*
CG : *Chitin-Glucan*
CMH : *Complexe majeur d'histocompatibilité*
conv : *conventionnelle*
CPA : *Cellule présentatrice d'antigène*
CSH : *Cellules souches hématopoïétiques*
DC : *Dendritic cell*
DSMZ : *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*
DSS : *Dextran Sodium Sulfate, : Dextran Sodium Sulfate, : Dextran Sodium Sulfate*
EDTA : *Éthylène Diamine Tétra-Acétique*
EFS : *Etablissement Français du sang*
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
GALT : *Gut associate lymphoid tissue*
GF : *Germ free*
Ig : *Immunoglobuline*
ILC : *Innate lymphoïde cells*
KO : *Knock Out*
LB : *Lymphocyte B*
LIE : *Lymphocytes intra-épithéliaux*
LPS : *Lipopolysaccharide*
LT : *Lymphocyte T*
MAM : *Microbial Anti-inflammatory Molecule*
MC : *Maladie de Crohn*
MDP : *Muramyl-dipeptide*
MICI : *Maladie inflammatoire chronique de l'intestin*
NKT : *Natural Killer T*
NLR : *Nod-like receptor*
NOD : *Non obese diabetic*
PAM : *Peptide anti-microbien*
PBMC : *Peripheral blood mononuclear cells*
PBS : *Phosphate-buffered saline*
PE : *Phycoérythrine*
PGRPs : *Peptidoglycan Recognition Proteins*
PKC : *Protéine kinase C*
PMA : *Phorbol myristate acetate*
PRR : *Pattern recognition receptor*
PSA : *Polysaccharide capsulaire A*

RCH : *Recto-colite hémorragique*
SFB : *Segmented filamentous bacteria, : Segmented filamentous bacteria*
SI : *Système immunitaire*
SILT : *Solitary isolated lymphocyte tissue*
SpA : *Spondyloarthritis*
SVF : *Sérum de veau foetal*
TGF- β : *Transforming growth factor beta*
TLR : *Toll-like receptor*
TMF : *Transplantation de microbiote fécal*
WT : *wild type*

Liste des figures :

Figure 1 : Comparaison de la composition microbienne de caecum de souris traitées à l'amoxicilline, le métronidazole, et le bismuth (Antibiotic Treated). Le traitement se fait dans la nourriture pendant 10 jours. La période de recouvrement est constituée d'une alimentation normale pendant 2 semaines. (Antonopoulos et al. 2009)	8
Figure 2 : Chaîne trophique de la fermentation des glucides (https://www.slideshare.net/NawalKanouni/microbiote-casa-2)	9
Figure 3 Schéma de l'épithélium intestinal avec les cryptes et les villosités (https://www.stemcell.com/technical-resources/area-of-interest/organoid-research/intestinal-research/overview.html)	11
Figure 4: Les différents TLR associés à leurs ligands (Seth Rakoff-Nahoum and Ruslan Medzhitov, Toll like receptor and cancer, Nature Review Cancer Vol9, January 2009, 58)	13
Figure 5 : Voie de signalisation PRR (« Review on Nod-Like Receptors (NLR) or CATERPILLER - InvivoGen » s. d.)	15
Figure 6 : Représentation des différentes couches de cellules constituant la muqueuse intestinale (http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA12/HA12E.html)	19
Figure 7 : Organisation des tissus lymphoïdes (http://slideplayer.com/slide/7892218/#)	20
Figure 8 : Cellules mononuclées du sang périphérique (https://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-cells/hematopoietic-cells/hematopoietic-knowledge-center/pbmcs.aspx)	21
Figure 9 : Différenciation des CD4 en LT effecteurs et LT régulateurs (https://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-13_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf)	24
Figure 10 : Stratégie en entonnoir afin de sélectionner les bactéries	38
Figure 11: Arbre phylogénétique des bactéries sélectionnées -Méthode Neighbor Joining- NJ	42
Figure 12 : Séparation des PBMC par gradient de densité(Lin et al. 2014)	46
Figure 13 : Principe de l'ELISA indirect utilisé	48
Figure 14 : Principe du Luminex : à gauche : le dégradé de rouge de chaque bille qui est associé à une cytokine, ce rouge sera reconnu lors du passage au Bioplex 200 et permettra	

l'identification des cytokines présentes. Puis visualisation du procédé de marquage jusqu'à la lecture.	49
Figure 15 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux	52
Figure 16 : Stratégie de sélection des cellules lymphocytaires dans les PBMC	56
Figure 17 : Stratégie d'identification des populations de monocytes, macrophages et cellules dendritiques	56
Figure 18 : Production de TNF α (pg/mL) par les PBMC suite à une stimulation par les culots	61
Figure 19 : Production de TNF α (pg/mL) par les PBMC suite à une stimulation par les surnageants	62
Figure 20 : Production d'IL10 (pg/mL) par les PBMC suite à une stimulation par les culots	64
Figure 21 : Production d'IL10 (pg/mL) par les PBMC suite à une stimulation par les surnageants	65
Figure 22 : Ratio IL10/TNF α induit par les culots bactériens sélectionnés pour la suite de l'étude	66
Figure 24 : Représentation Heatmap de la production de cytokine induite par les culots bactériens	71
Figure 25 : Diminution de la population HLA-DR+/CD14+ lors de la stimulation par les culots bactériens R gnavus et P copri.	73
Figure 26 : Production de TNF α par les populations CD3-/HLA-DR+/CD14+	74
Figure 27 : Schéma de la mise en place du système de l'équipe de Tsilingiri.(Tsilingiri et al. 2012)	83
Figure 28 : Illustration du modèle de costimulation Caco-2/TC7 et PBMC	83
Figure 29 : Impact du butyrate sur l'épithélium intestinal et le système immunitaire	84

Liste des tableaux :

Tableau I : Cellules constituant l'épithélium intestinal (Tomas J et Sansonetti P (2017). Dialogue hôte-microbiote : interactions entre microbiote et épithélium intestinal. Dans « Le microbiote intestinal, un organe à part entière », Marteau P et Doré J, 56)(Gerbe et al. 2016)	12
Tableau II : Les TLR et leurs PAMP associés	26
Tableau III : Sommaire de l'influence sur le microbiote de différents types d'alimentation (Kirsty Brown et al. 2012).....	32
Tableau IV : Primers ADN 16s pour PCR et séquençage bactérien	41
Tableau V : Cycles de PCR effectués pour amplifier l'ADN 16S	41
Tableau VI : Bactéries sélectionnées avec l'arbre phylogénétique. On peut voir la provenance, le code de la bactérie ainsi que le milieu liquide dans lequel elles ont été cultivées.....	45
Tableau VII : Détail des cytokines lues en multiplex (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) (Rutz, Eidenschenk, et Ouyang 2013).....	51
Tableau VIII : Identifications des marqueurs cibles	53
Tableau IX : Les 2 panels de cytométrie	53
Tableau X : Panel numéro 1 : LT, LB et cytokines.....	54
Tableau XI : Panel numéro 2 : monocytes et cytokines	54

Partie I - Etat de l'art

Chapitre 1 : Le microbiote intestinal

1.1) Description et techniques d'identification

Le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes (bactéries, levures, virus, champignons) vivant dans l'intestin. Il est constitué de 10^{14} micro-organismes. Il représente 2 à 10 fois le nombre de cellules du corps humain et présente une très grande diversité. Pendant plusieurs années, les chercheurs ont voulu caractériser la composition du microbiote en utilisant des approches dépendantes de la culture. Mais comme dans tout écosystème bactérien, ces approches ne permettent pas d'accéder à l'ensemble de la diversité bactérienne. Dans le tube digestif il existe des bactéries aérobies, anaérobies facultatives et anaérobies strictes, dans les années 80 l'identification des bactéries se faisaient principalement par culture bactérienne et l'anaérobie strict posait un problème. De plus les milieux de cultures ne reproduisent pas le milieu « naturel » intestinal. Des milieux spécifiques possédant les nutriments manquant sont été développés et ont été utilisés en condition anaérobie mais il a été montré que seulement 30% des micro-organismes intestinaux dénombrables en microscopie peuvent être cultivés *in vitro* (Suau *et al.* 1999). Avec le développement de la biologie moléculaire, de nouvelles approches ont été utilisées. Le gène codant l'ARN16S ribosomal contient des régions conservées et des régions variables et hypervariables selon les espèces de bactéries. En le séquençant il est donc possible d'identifier 90% des bactéries intestinales indépendamment de la culture (Seksik *et al.* 2003).

Le microbiote intestinal est composé de 4 phyla majeurs : Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria et Actinobacteria. Ce sont les Firmicutes et les Bacteroidetes qui représentent à eux seuls 90 à 99% des bactéries de l'écosystème intestinal (Turnbaugh, Hamady, *et al.* 2009).

La population microbienne est très variable selon les individus et peut être influencée par un grand nombre de facteurs. Le projet MétaHit a permis de séquencer un grand nombre de microbiotes d'individus. Tous d'abord ils ont analysés le métagénome de 39 individus répartis sur 3 continents (français, danois, italiens, espagnols, américains et japonais) ce qui a permis de les classer en 3 groupes nommés entérotypes indépendamment de l'âge, du sexe, du continent etc. Ensuite ils ont étendu l'analyse à 85 échantillons issus de la population danoise

et 157 issu de la population américaine afin de déterminer si la classification était valable, les résultats indiquent que tous ces individus peuvent être classés en 3 groupes distincts. Ceux-ci sont déterminés par l'abondance de trois types de bactéries prédominantes qui sont : *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus*. Ce qui est remarquable c'est que les entérotypes ne dépendent pas de l'origine géographique, ni du sexe, ni de l'état de santé de l'individu. On peut ainsi, grâce à ce programme, réaliser des études comparatives afin de mieux décrire les altérations du microbiote liées à certaines maladies (Arumugam *et al.* 2011). Bien qu'il existe des profils communs dans la population, le microbiote intestinal est tout de même propre à chaque individu.

Il est accepté pour le moment que la première colonisation du microbiote intestinal se fait au moment de l'accouchement. En effet, *in utero*, le tube digestif du fœtus est stérile. Lors de la naissance par voie basse, il est colonisé par le microbiote fécal et vaginal de la mère. Il a été montré que le développement du système immunitaire était affecté par la composition initiale du microbiote et que lors d'un accouchement par césarienne la population de *Bifidobacteria* et *Bacteroides* était diminuée (Biasucci *et al.* 2010). Il y a d'autres études qui suggèrent qu'il y aurait une première colonisation intra utérine par le liquide amniotique (Rautava *et al.* 2012). Ensuite le microbiote évolue différemment selon le mode d'alimentation du nourrisson (allaitement ou lait maternisé), ce qui entraîne ou non une augmentation des Bifidobactéries pendant les premières années de la vie, mais également selon l'origine ethnique qui impactera le mode alimentaire de la mère et de l'enfant (Martín *et al.* 2009 ; Stearns *et al.* 2017). L'établissement d'un microbiote à priori stable se fait durant les trois premières années de la vie (Yatsunenko *et al.* 2012). Le microbiote peut être perturbé au cours de la vie mais possède de façon générale une très bonne capacité de résilience, ce qui consiste en le fait de pouvoir récupérer un fonctionnement ou un développement normal suite à une perturbation.

1.2) Facteurs influençant le microbiote

Chez l'adulte en situation stable et sans variation des facteurs environnementaux, le microbiote dominant subit peu de variations bien qu'il soit difficile d'établir un microbiote type à cause de la diversité interindividuelle induite par les facteurs génétiques ainsi que l'alimentation (Yatsunenko *et al.* 2012).

a) Facteurs génétiques

Afin de démontrer l'impact des facteurs génétiques, Zoetendal et son équipe ont comparés le microbiote intestinal de jumeaux monozygotes (impact de la génétique), de couples maritaux (impact du mode de vie) et de personnes n'ayant aucun lien. Leurs résultats montrent une similarité plus importante chez les jumeaux que chez les couples. Ils ont comparé différents degrés de parenté et concluent que le génotype a un effet plus important que le mode de vie sur le microbiote dominant. Pour eux, cela appuie le fait que la première colonisation du microbiote lors de l'accouchement est importante pour l'établissement du microbiote dominant (Erwin G. Zoetendal 2001). Plus précisément ce serait les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui joueraient un rôle dans l'établissement d'une composition donnée du microbiote selon une étude faite sur des souris (Toivanen, *et al.* 2001).

b) Facteurs alimentaires

L'impact de l'alimentation est principalement lié à la capacité de certaines bactéries à dégrader et ainsi profiter de certains composés.

Afin d'observer l'impact de l'alimentation sur le microbiote intestinal, Tap *et al.* ont montrés qu'en comparant des régimes végétariens et omnivores, on retrouve seulement 5% de variabilité (Tap *et al.* 2009). On observe un impact de l'alimentation par le fait que certaines bactéries vont avoir plus ou moins la capacité de dégrader des composés issus de ces aliments.

D'un autre côté, De Filippo *et al.* ont comparé le microbiote intestinal d'enfants européens qui possèdent une alimentation riche en protéines animales et en graisses *versus* celui d'enfants du Burkina Faso dont l'alimentation inclus beaucoup de glucides et est pauvre en protéines animales. Chez les enfants européens le microbiote est dominé par les *Bacteroides* car ils ont la capacité de dégrader les protéines alors que chez les enfants africains c'est *Prevotella* qui domine à cause du régime plus riche en fibre. Ce qui démontre une modification du microbiote par le régime alimentaire, bien qu'il faille garder à l'esprit que le mode de vie est différent lui aussi. Ils ont aussi montrés que seulement les régimes à long terme vont avoir un impact réel sur le microbiote, les régimes à court terme vont montrer

une légère modification du microbiote mais celle-ci sera plus proche de la composition du microbiote avant régime que de celle d'un individu ayant le type d'alimentation du régime donné (De Filippo *et al.* 2010).

De plus le type d'alimentation va être responsable de la production de produits terminaux par l'intermédiaire de la présence de certaines bactéries. Par exemple, la dégradation des protéines par *Bacteroides* issues d'une forte consommation de viande rouge va donner divers produits tel que l'ammoniac, du phénol et indole, des composés nitreux et sulfuré. Ces produits de dégradations peuvent être impliqués dans le cancer colorectal. La présence des composés nitreux sulfurés est associée à une augmentation d'une population bactérienne réductrice de sulfate notamment *Desulfovibrio* qui va produire du H₂S qui est responsable d'une augmentation de l'apoptose et d'une hyper prolifération de la muqueuse intestinale, tout ceci sera directement lié à des processus pathologique (Hughes, Magee, et Bingham 2000).

c) *Facteurs médicamenteux*

Il est actuellement connu que les antibiotiques altèrent le microbiote intestinal. En 2009 nous pouvons lire dans une publication de Antonopoulos *et al.* qui fait l'expérience d'administrer un cocktail d'amoxicilline, de métronidazole, et de bismuth a des souris sur une période de 10 jours suivie d'une période de recouvrement puis de séquencer le gène codant l'ARNr 16S afin d'identifier le microbiote intestinal présent. Nous pouvons voire une très forte perturbation du microbiote intestinal pendant la prise d'antibiotique (Figure 1) et l'on remarque que même après le rétablissement de la flore, celle-ci garde une population de Proteobacteria plus importante que les contrôles au détriment des Firmicutes.

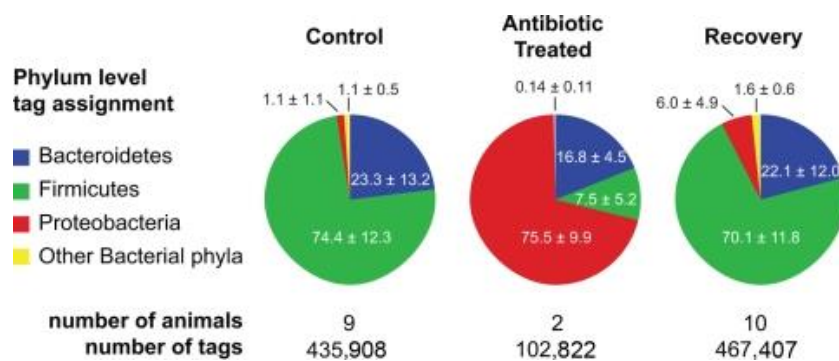


Figure 1 : Comparaison de la composition microbienne de caecum de souris traitées à l’amoxicilline, le métronidazole, et le bismuth (Antibiotic Treated). Le traitement se fait dans la nourriture pendant 10 jours. La période de recouvrement est constituée d’une alimentation normale pendant 2 semaines. (Antonopoulos *et al.* 2009)

Les antibiotiques ont donc un impact sur le microbiote intestinal surtout à court terme. D’autre part ils peuvent aussi permettre le développement de bactéries pathogènes tel que *Clostridium difficile* après traitement à la cefoxitine (Mulligan *et al.* 1984).

Différents facteurs agissent sur la modulation du microbiote, celui-ci étant à son tour capable de moduler un grand nombre de choses à commencer par le métabolisme des aliments.

1.3) Métabolisme du microbiote

Le microbiote possède une action de métabolisation de certains nutriments du bol alimentaire. Bien qu’il varie d’un individu à un autre, ses propriétés métaboliques restent généralement les mêmes ce qui s’explique par la redondance des activités métaboliques bactériennes comme la synthèse des acides gras à chaîne courte, des acides aminés essentiels et des vitamines (Dusko Ehrlich et MetaHIT consortium 2010). Dans l’intestin la plus grande masse du microbiote se trouve dans le colon, il va pouvoir métaboliser ce qui n’est pas digéré dans la partie supérieure du tractus digestif.

La fonction métabolique du microbiote est donc corrélée avec ce qu’il y a de disponible dans le colon pour la fermentation. Lors de la fermentation, la majorité des espèces bactériennes utilisent la glycolyse pour transformer le glucose des glucides en pyruvate qui est

lui-même utilisé dans différentes voies ce qui conduit à la production d'une variété de composés tels que les acides gras à chaînes courtes (AGCC) (butyrate, acétate, propionate), les gaz (hydrogène, dioxyde de carbone, voir du méthane) et de l'ammoniaque. La conversion de macromolécules en métabolites secondaires implique différents groupes bactériens, par exemple l'acétate est produit par la plupart des espèces dominantes (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, etc.) alors que le butyrate est majoritairement produit par quelques espèces de Firmicutes (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia spp* et *Eubacterium rectale*) (Bernalier-Donadille 2010; Pryde *et al.* 2002). Les acides gras à chaînes courtes sont rapidement absorbés au niveau de l'épithélium intestinal et sont métabolisés dans différents organes (Figure 2).

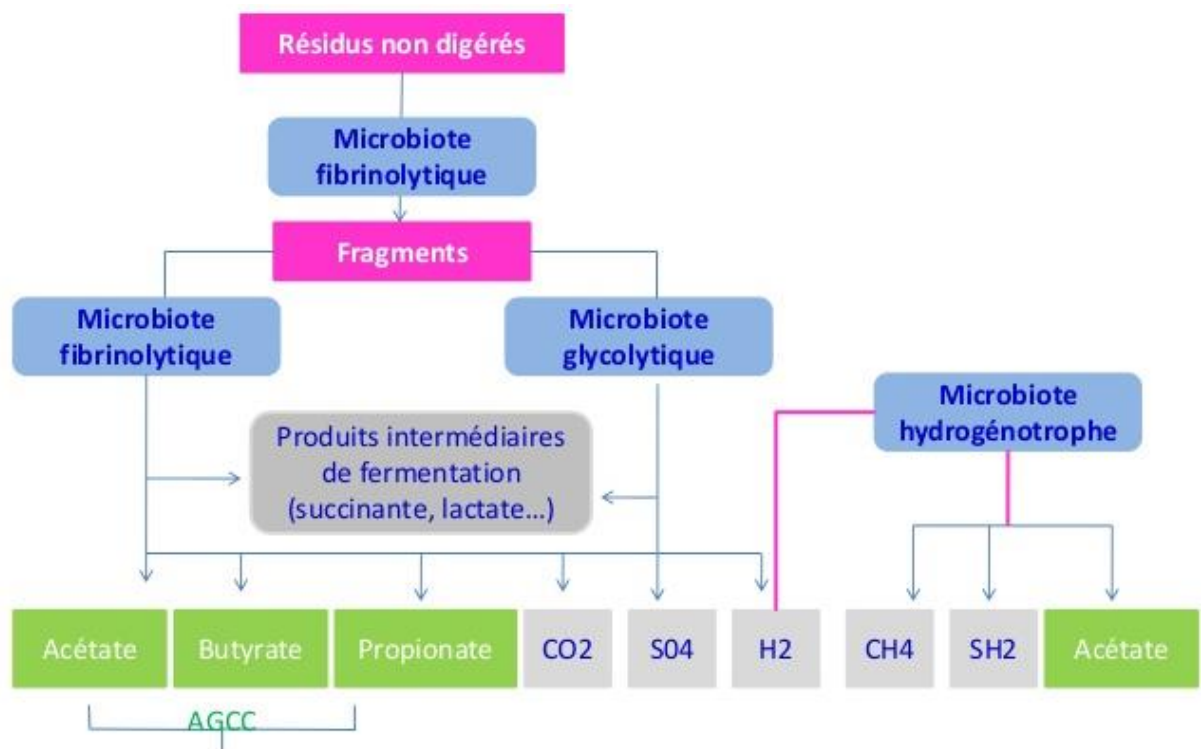


Figure 2 : Chaîne trophique de la fermentation des glucides (<https://www.slideshare.net/NawalKanouni/microbiote-casa-2>)

Le butyrate issu de la fermentation des fibres va permettre la production d'autres acides gras à chaînes courtes et peut aussi moduler l'expression génétique (McIntyre, Gibson, et Young 1993). Le butyrate entraîne une hyper acétylation des histones par une activité inhibant l'histone désacétylase, ceci permet de stimuler l'apoptose et d'inhiber certains dommages liés au stress ce qui explique le ralentissement de la progression des cellules

tumorales comme la lignée cellulaire humaine de cancer colique HT-29 (Barnard et Warwick 1993). Cet acide gras est donc important pour les cellules intestinales. De plus il a été montré qu'il possède de nombreux effets bénéfiques pour l'intestin, il joue un rôle important dans l'homéostasie intestinale, l'amélioration de l'inflammation, le statut oxydatif, le renforcement de la barrière épithéliale intestinale et la modulation de la sensibilité et de la motilité intestinale (Canani *et al.* 2011).

Le microbiote possède également une activité de dégradation des protéines qui représente la principale source d'azote pour celui-ci. Les produits de dégradation peuvent entraîner la production de produits potentiellement toxiques comme l'ammoniaque qui peut faire partie des mécanismes initiateurs du cancer colique.

Pour finir le microbiote exerce aussi un effet sur le métabolisme des gaz, avec principalement la formation d'hydrogène. Des quantités importantes d'hydrogènes sont produites et il est indispensable de l'éliminer pour la fermentation (Bernalier-Donadille 2010). Une partie est excrétée par voie pulmonaire et anale mais une majeure partie est utilisée par les organismes hydrogénotrophes en permettant ainsi une oxydation plus complète des substrats et un gain plus important en ATP pour le microbiote.

1.4) **Fonction du microbiote**

a) *Structure de l'épithélium intestinal*

Comme le montre la figure 3, l'épithélium intestinal est constitué de cryptes et de villosités qui assurent des fonctions spécifiques. Les cryptes sont composées de cellules souches et sont une zone de prolifération cellulaire. Elles permettent ainsi un renouvellement de l'épithélium intestinal tous les 3 à 5 jours. Au niveau des villosités se localise la fonction d'absorption des nutriments et les zones de contact avec le microbiote intestinal.

The Intestinal Epithelium

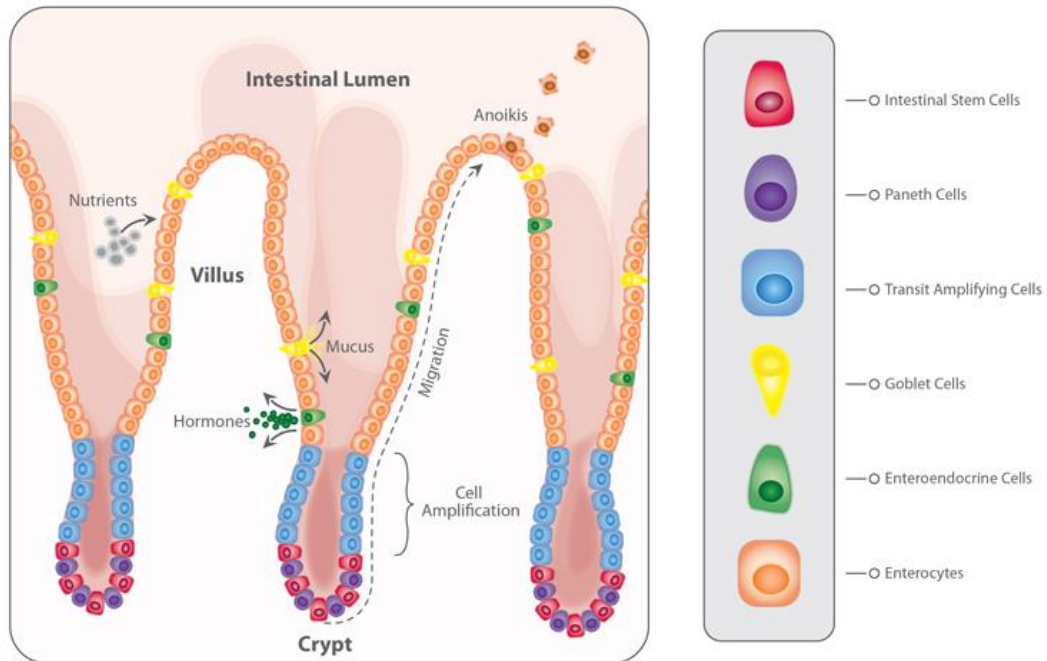


Figure 3 Schéma de l'épithélium intestinal avec les cryptes et les villosités (<https://www.stemcell.com/technical-resources/area-of-interest/organoid-research/intestinal-research/overview.html>)

Différents types de cellules constituent l'épithélium intestinal :

Cellules	Fonctions
Souches	Renouvellement intestinal et prolifération cellulaire
Entérocytes	Absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes
Caliciformes	Production de mucus et surveillance immunitaire
De Paneth	Sécrétion des peptides antimicrobiens (PAM) et maintien des cellules souches
Entéro-endocrine	Sécrétion d'hormones gastro-intestinales impliquées dans l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire
Tuft	Sécrétion de beta-endorphine, détection des helminthes
M	Séparation des plaques de Peyer à la lumière

Tableau I : Cellules constituant l'épithélium intestinal (Tomas J et Sansonetti P (2017). Dialogue hôte-microbiote : interactions entre microbiote et épithélium intestinal. Dans « Le microbiote intestinal, un organe à part entière », Marteau P et Doré J, 56) (Gerbe *et al.* 2016)

b) Communication avec le microbiote

L'intestin est une surface d'échange avec l'extérieur, c'est pourquoi il faut une barrière efficace afin d'éviter que n'importe quel type de pathogène pénètre à l'intérieur de l'organisme. Il existe une barrière physique constituée de jonctions intercellulaires imperméables aux molécules et microorganismes de l'environnement. Nous allons voir par la suite que le rôle de barrière est aussi tenu par le mucus qui est produit par les cellules caliciformes. De plus ces cellules seraient aussi impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes prélevés de la lumière pour la *lamina propria* (McDole *et al.* 2012).

(1) Le mucus

Le mucus est formé de couches de protéines glycosylées, que l'on appelle mucine, ce qui constitue un réseau viscoélastique et gélifiant. A l'intérieur de ce réseau nous pouvons trouver plusieurs molécules aux propriétés immunologiques et bactéricides comme les peptides antimicrobiens (PAM) ou des immunoglobulines (Ig) et en particulier des IgA. Cet ensemble va maintenir une distance entre les bactéries et l'épithélium (Y. S. Kim et Ho 2010).

Le mucus est sécrété de façon constitutive mais il peut aussi être induit en réponse à des stimuli tel que des cytokines pro-inflammatoires, ainsi il peut y avoir un relargage massif de mucine dans la lumière intestinale. Il a été montré que la mutation du gène MUC2 perturbait la production du mucus. Chez les mutants MUC2 (ou les patients présentant un polymorphisme de MUC2), les bactéries peuvent atteindre l'épithélium et vont créer des réactions inflammatoires exacerbées (Johansson *et al.* 2014).

La mucine est soit exprimée à la surface des cellules soit sécrétée comme glycoprotéine pour aider à constituer la barrière mucoale le long de l'intestin. L'importance de la O-glycosylation de la mucine joue plusieurs rôles physiologiques importants pour la couche de mucus. Parmi ces rôles on retrouve celui de favoriser l'établissement et le développement du microbiote. Les motifs structuraux des mucines vont avoir une importance

dans leur reconnaissance et leur dégradation par les bactéries, ainsi le mucus joue aussi le rôle de niche écologique (Marcobal *et al.* 2013).

(2) Les cellules épithéliales intestinales

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) possèdent des récepteurs connus sous le nom de PRR (Pattern Recognition Receptor) qui permettent de mettre en place une surveillance et une reconnaissance des micro-organismes en assurant ainsi la transmission d'informations de danger au système immunitaire.

Un premier type de PRR est la famille des récepteurs de type Toll (Toll Like Receptor), chaque TLR reconnaît des ligands microbiens spécifiques comme le lipopolysaccharides (LPS), la flagelline ou encore l'ADN microbien (figure 4).

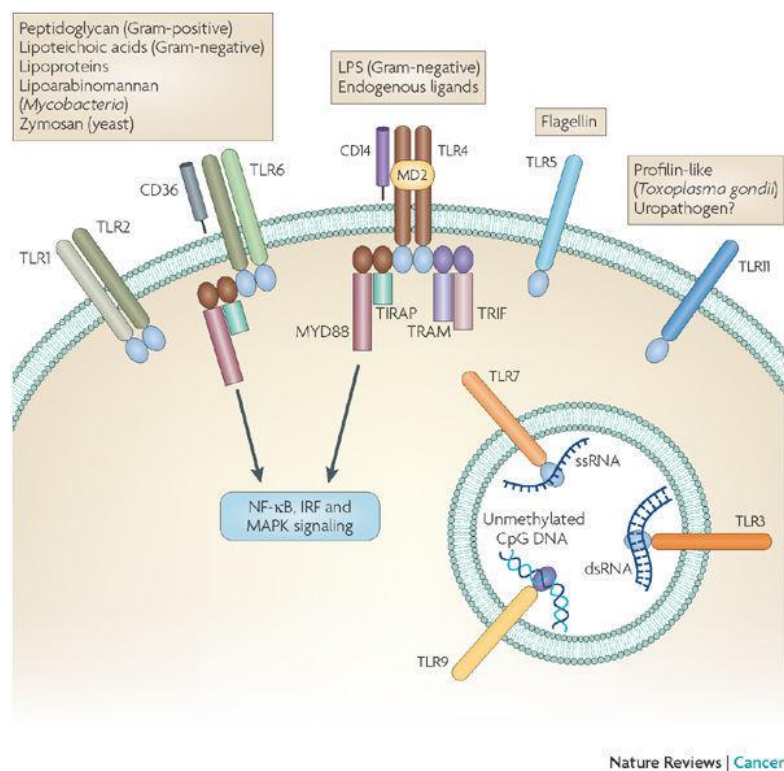


Figure 4: Les différents TLR associés à leurs ligands (Seth Rakoff-Nahoum and Ruslan Medzhitov, Toll like receptor and cancer, Nature Review Cancer Vol9, January 2009, 58)

Les CEI sont exposées à une forte densité microbienne, c'est pourquoi l'expression des TLR est fortement régulée. Par exemple, TLR2 et TLR4, qui reconnaissent respectivement le peptidoglycane et le LPS, sont présents au fond des cryptes intestinales

pour être ainsi éloignés de la forte densité bactérienne. On observe une sensibilité différente des CEI suivant l'âge, par exemple TLR3, qui est capable de reconnaître l'ARN double brin viral, est aussi capable de reconnaître les bactéries Gram positives chez le nouveau-né (Furrie *et al.* 2005).

Il a été observé que l'expression des récepteurs TLR4 est augmentée chez les patients atteints de MICI, ils ont un rôle potentiel dans la réponse pro-inflammatoire exacerbée. L'expression de TLR4 est contrôlée par des modifications épigénétiques. Nous avons vu précédemment que certains micro-organismes sont capables de produire du butyrate, celui-ci étant impliqué dans les modifications épigénétiques. C'est ce que l'on observe ici, lorsque le microbiote est symbiotique, il possède des bactéries productrices de butyrate, celui va entraîner des modifications épigénétiques au niveau des séquences codantes de TLR4 et ainsi va diminuer son expression. Lors d'une dysbiose, le microbiote va être déséquilibré et les bactéries productrices de butyrate seront moins présentes, ainsi il n'y aura pas de régulation de TLR4 et la réaction inflammatoire sera exacerbée (Takahashi *et al.* 2011).

Le second type de PRR sont les récepteurs de type NOD (ou NLR pour NOD Like Receptor). Ce sont des protéines cytoplasmiques qui reconnaissent les peptidoglycanes de la paroi bactérienne. Ces récepteurs sont présents dans les cellules de Paneth et vont pouvoir entraîner une réaction immunitaire innée. En figure 5 nous pouvons voir un schéma détaillé des différents types de PRR et leurs voies de signalisations.

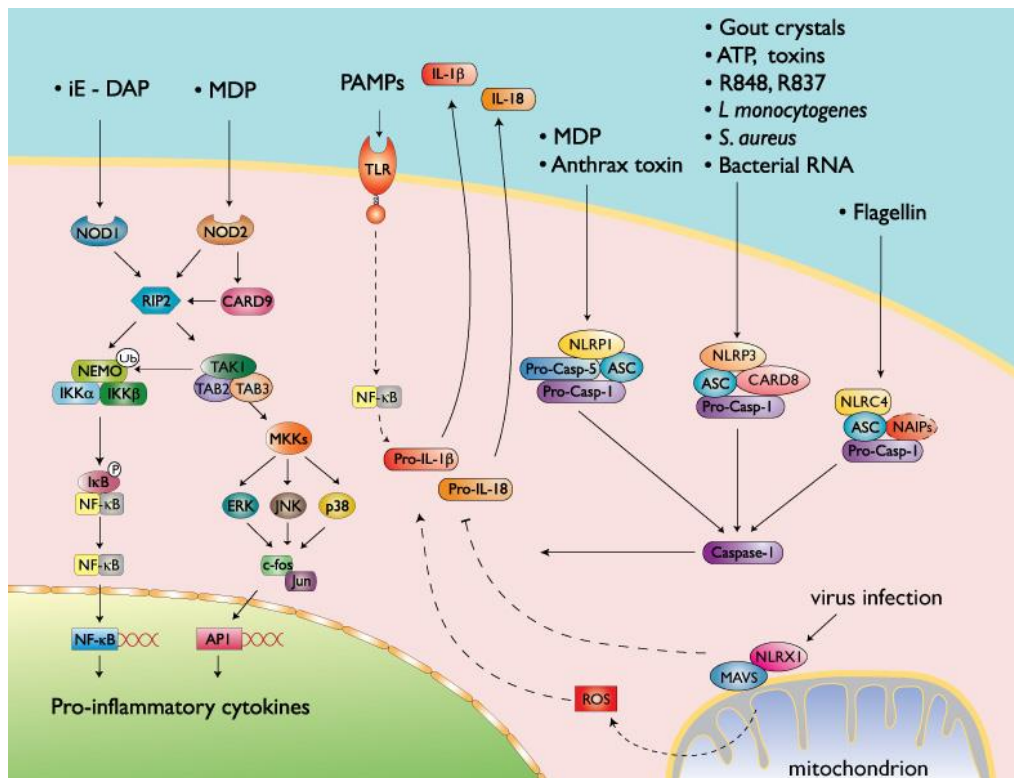


Figure 5 : Voie de signalisation PRR (« Review on Nod-Like Receptors (NLR) or CATERPILLER - InvivoGen » s. d.)

Les mutations qui peuvent survenir sur ce système de reconnaissance sont impliquées dans le développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Par exemple il a été montré que le dysfonctionnement de NOD2 entraînait une modification du microbiote intestinal et est impliqué dans l'inflammation chronique. Cette mutation est associée à la maladie de Crohn (Strober *et al.* 2014).

Il existe aussi des mécanismes tolérogènes entre le microbiote et l'hôte. Les bactéries possèdent des caractéristiques génomiques propres qui sont identifiables par l'hôte.

1.5) Effet du microbiote sur l'hôte

La présence du microbiote intestinal influence la production et à la prolifération de CEI, il a été montré qu'en inoculant un microbiote normal à des souris axéniques, celles-ci avaient une augmentation du nombre de CEI en prolifération ainsi qu'une augmentation de la

profondeur des cryptes intestinales (Tomas *et al.* 2013). D'autre part Reikvam *et al* ont montrés que suite à l'administration d'un cocktail d'antibiotiques à des souris il y a une forte diminution de l'activité de prolifération cellulaire ainsi qu'un ralentissement du cycle cellulaire (Reikvam *et al.* 2011).

L'homéostasie intestinale est représentée par un équilibre entre la prolifération cellulaire d'une part et la différenciation et l'exfoliation cellulaire d'autre part. Le microbiote agit sur ces deux voies et est ainsi très important pour l'équilibre cellulaire de l'hôte.

Comme nous l'avons vu précédemment, la paroi intestinale est un réseau dense grâce aux jonctions qui lient les CEI entre elles. Il y a des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. À la naissance, les jonctions ne sont pas complètes et permettent une certaine perméabilité intestinale. C'est la colonisation progressive du tube digestif par les bactéries commensales qui va induire l'effet de barrière. Il a été montré que certaines bactéries comme *E. coli* C25 peuvent augmenter la perméabilité intestinale alors que d'autres comme *Lactobacillus rhamnosus* GG augmentent l'effet de barrière en modulant l'organisation des jonctions adhérentes et serrées (Seth *et al.* 2008). La perméabilité intestinale va aussi avoir un impact sur le transport d'ions et de molécules entre les cellules ce qui peut entraîner des conséquences néfastes sur le mucus par exemple et l'effet de barrière peut être compromis. De plus il a été montré qu'un défaut dans les transporteurs d'ions entre les CEI est à l'origine du développement de maladies chroniques intestinales (Farkas *et al.* 2011).

1.6) La barrière intestinale

Le microbiote intestinal engendre un effet de barrière de façon directe et indirecte.

a) *Effet direct du microbiote en tant que barrière intestinale*

De façon directe, la grande sensibilité des individus aux agressions intestinales lors de la prise d'antibiotique est déjà connue. Chaque bactérie qui va coloniser l'intestin est généralement adaptée à un type de niche écologique et va s'y loger et modifier l'écosystème à son avantage, il a été montré que si une espèce bactérienne est déjà présente, il est difficile

qu'une autre bactérie, qu'elle appartienne à la même espèce ou non, s'y implante à son tour (Lee *et al.* 2013). Les antibiothérapies peuvent avoir pour effet de libérer une niche et ainsi laisser la place à des bactéries pathogènes. C'est le cas avec *Clostridium difficile* par exemple.

Dans l'effet barrière direct du microbiote on peut compter aussi les bactériocines, ce sont des peptides sécrétés par les bactéries qui peuvent avoir des propriétés bactéricides ou bactériostatiques. Pour finir, comme vu précédemment le microbiote est impliqué dans la transformation des acides biliaires primaires en secondaires, ils joueraient un rôle dans la protection contre les pathogènes avec par exemple l'acide désoxycholique qui inhiberait la croissance de *C. difficile* (Sorg et Sonenshein 2008).

b) Effet de barrière induit de façon indirecte par le microbiote

L'intérêt de l'effet indirect du mucus a été vu précédemment. Sa production est partiellement sous le contrôle du microbiote. Il a d'ailleurs été montré que chez les souris axéniques les cellules caliciformes sont réduites et que, par conséquent, l'épaisseur de la couche de mucus est diminuée (Kandori *et al.* 1996).

Le mucus est d'autant plus important car il contient aussi les peptides antimicrobiens (les défensines par exemple) sécrétés par les CEI suite à une stimulation induite par le microbiote. Grâce à ce système le microbiote reste relativement éloigné des CEI.

De plus, des plasmocytes qui vont produire des IgA sécrétoires spécifiques d'un antigène donné sont présents dans la *lamina propria*. Ces IgA sont constitués d'IgA dimérique sécrétés par les plasmocytes et d'une pièce sécrétoire produite par les CEI. Le dimère va être capté par la pièce sécrétoire au niveau basolatérale des cellules épithéliales puis un phénomène de transcytose dirigée va permettre l'excrétion complète des IgA sécrétoires au pôle apical. Les IgA sécrétoires sont la première ligne de défense dans la protection de l'épithélium intestinal face aux entérotoxines et aux microorganismes pathogènes.

Le microbiote intestinal joue un rôle direct et indirect dans le maintien de la barrière intestinale ce qui est indispensable pour le maintien de l'homéostasie. L'effet direct se traduit par la compétition entre le microbiote résident et les pathogènes pour les niches écologiques ainsi que pour les nutriments. L'effet indirect, lui, passe par la stimulation immunitaire muqueuse.

Chapitre 2 : Interaction microbiote-système immunitaire

En 1963 Bauer *et al.* publient une première étude sur la relation microbiote-système immunitaire (SI). Ils font la comparaison de différents tissus entre des souris Germ free (GF) et des souris conventionnelles (conv). Ils constatent qu'il y a des différences structurales et cytologiques dans les ganglions lymphatiques et la rate ce qui les amène à en déduire qu'il y a un lien entre le microbiote et le développement du SI (Bauer et al. 1963). Ces dernières années plusieurs altérations dans l'établissement du microbiote tels que la prise d'antibiotique, la césarienne, l'hygiène etc. ont été associées à des défauts de maturation du système immunitaire qui seraient responsable du développement de pathologies chroniques (Bach 2002).

Ce chapitre se composera de trois parties, une première expliquant l'organisation du système immunitaire intestinal, la seconde sur l'effet du microbiote sur le système immunitaire et la troisième sur l'effet du système immunitaire sur le microbiote.

2.1) Organisation du système immunitaire intestinal

Il y a plusieurs types cellulaires qui constituent le SI intestinal, le siège de la réponse innée est généralement localisé dans la muqueuse qui comprend l'épithélium, la *lamina propria*, et la *muscularis mucosae* (Figure 6).

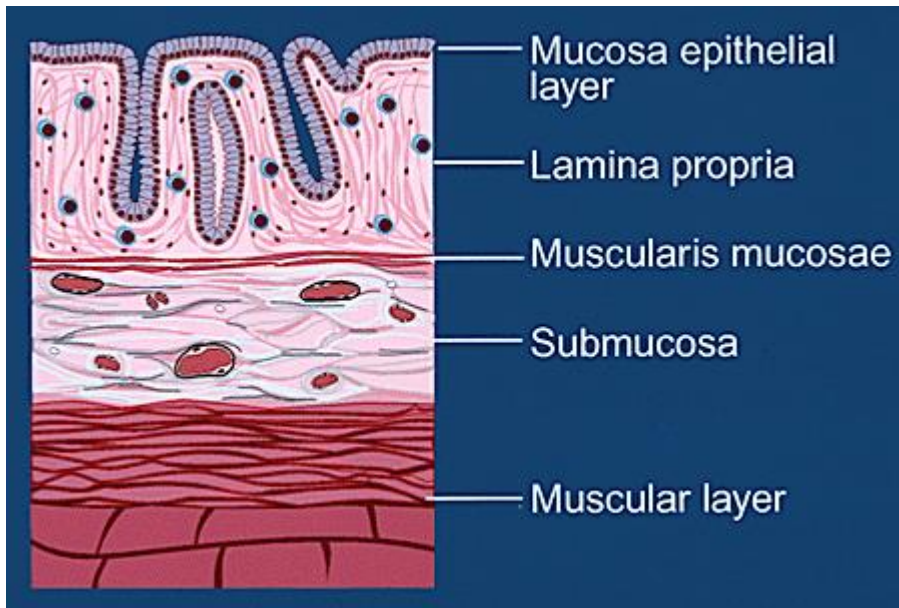


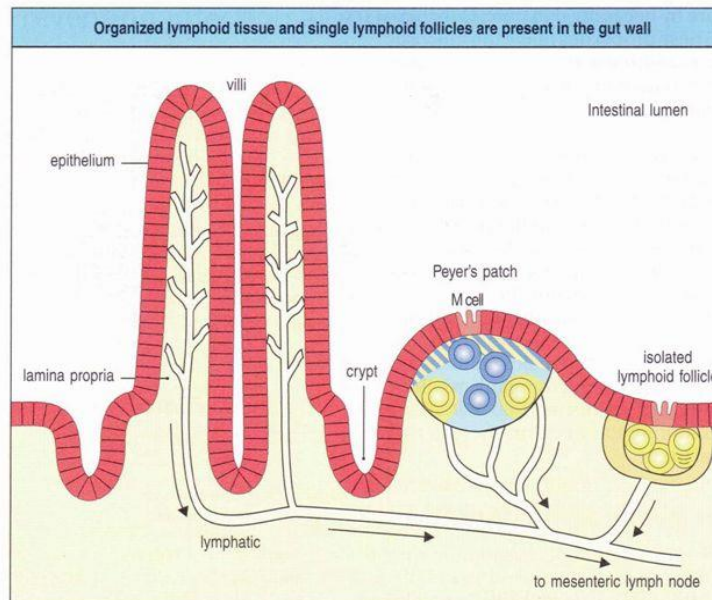
Figure 6 : Représentation des différentes couches de cellules constituant la muqueuse intestinale (<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA12/HA12E.html>)

La *lamina propria* est constituée de tissu conjonctif avec des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des neurones et des cellules immunitaires. La *lamina propria* et les lymphocytes intra épithéliaux (LIE) représentent deux compartiments immunitaires différents. Les LIE sont principalement composées de lymphocytes T (LT) CD8⁺ et de LT $\gamma\delta$, cette dernière population lymphocytaire représentant la population de LT non conventionnels par opposition aux LT $\alpha\beta$ qui sont la population de LT conventionnels. De plus, même si les CEI ne sont pas considérées comme des cellules immunitaires, elles possèdent des fonctions de défense comme la sécrétion des PAM notamment par les cellules de Paneth ainsi que la production de mucus par les cellules caliciformes. Les CEI expriment des récepteurs de l'immunité innée : les PRR qui vont reconnaître des motifs moléculaires de pathogènes pour ainsi déclencher une réponse innée telle que la phagocytose.

L'intestin possède également des structures lymphoïdes (GALT pour gut associated lymphoid tissue) qui sont drainées par les ganglions lymphatiques. Ces structures sont recouvertes de cellules M qui ont le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), elles vont capturer et transporter les antigènes présents dans la lumière intestinale et vont les transférer notamment aux cellules dendritiques (DC) qui vont à leurs tours les présenter aux lymphocytes B (LB). Les plaques de Peyer sont constituées de nombreux foyers de LB et de quelques foyers de lymphocytes T (LT). Ces foyers incluent des centres germinatifs ce qui est

le signe d'une stimulation antigénique, du priming des LT et de la production d'IgA. Les GALT sont aussi constitués de SILT (solitary isolated lymphoid tissue). Ces structures lymphoïdes comprennent des petites plaques cryptiques (cryptopatches) ainsi que des follicules lymphoïdes matures isolés (figure 7) (Mowat et Agace 2014).

Gut-associated lymphoid tissues



Peyer's patches 5-100 follicles forming a dome structure
 M-cells: microfold cells --- no glycocalyx – antigen uptake

Figure 7 : Organisation des tissus lymphoïdes (<http://slideplayer.com/slide/7892218/#>)

2.2) Régulation du système immunitaire par le microbiote

Les cellules du système immunitaire se retrouvent dans le sang, ce sont les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear cells). Ils sont constitués de plusieurs lignées cellulaires (Figure 8)

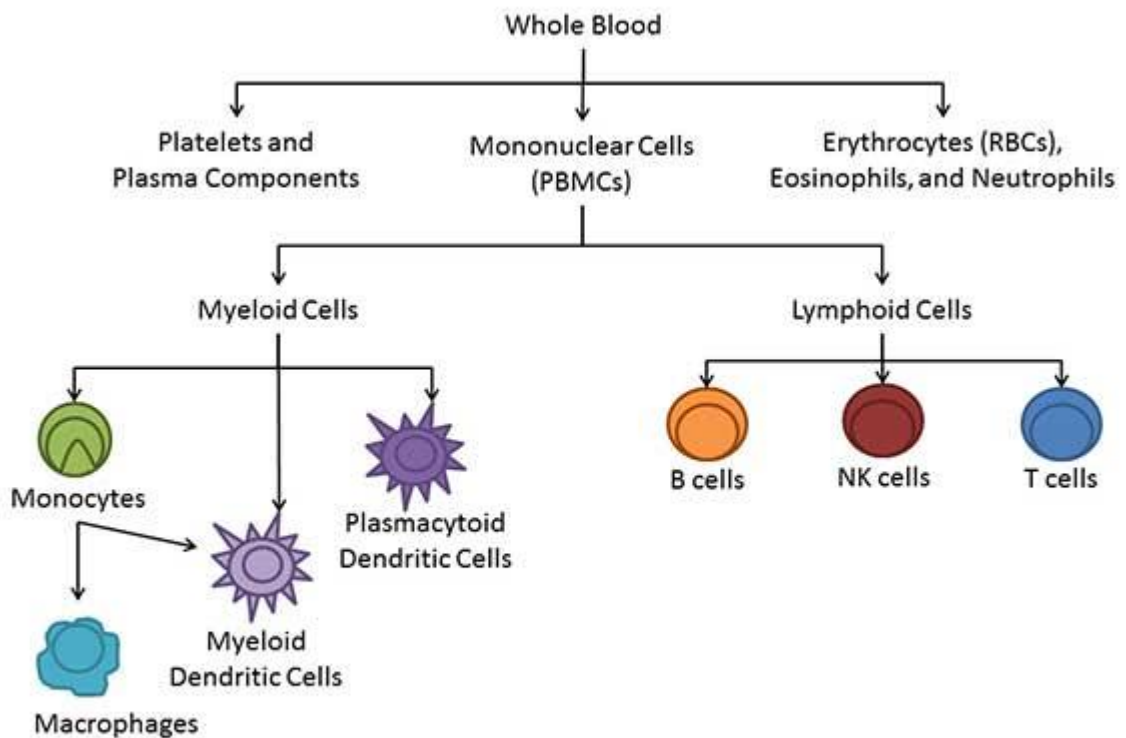


Figure 8 : Cellules mononuclées du sang périphérique (<https://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-cells/hematopoietic-cells/hematopoietic-knowledge-center/pbmcs.aspx>)

La plupart des connaissances actuelles sur le microbiote intestinal sont établies grâce aux modèles murins. L'utilisation de ce modèle permet la production d'animaux axéniques (sans microbiote) qui peuvent être colonisés par une bactérie d'intérêt ou un cocktail de bactéries. Il est ainsi possible d'étudier l'évolution du SI en fonction du microbiote présent.

a) *L'immunité Innée*

- (1) Impact sur les organes lymphoïdes secondaires et le tissu intestinal

Les souris axéniques ont des défauts de développement des organes lymphoïdes et du tissu intestinal. En effet on observe chez ces animaux une diminution de la taille des plaques de Peyer, un nombre réduit de lymphocytes intra épithéliaux, une diminution de certaines populations de lymphocytes T, une réduction de la sécrétion intestinale d'IgA et une production de cytokines limitée (Sommer et Bäckhed 2013).

Les bactéries n'ont pas toutes le même effet sur le développement du SI. Il a été montré qu'en administrant la bactérie ubiquitaire *Bacteroides fragilis* à des souris axéniques, une restauration des défauts de développement des organes lymphoïdes se produisait. Certaines espèces peuvent jouer un rôle plus important dans le développement du SI *via* une interaction directe avec les cellules ou alors grâce à la sécrétion des polysaccharides A qui sont des polysaccharides zwitterioniques propres à *Bacteroides fragilis* dans la lumière intestinale (Mazmanian *et al.* 2005).

(2) Barrière et immunité innée

Comme vu précédemment dans le paragraphe «1.6) La barrière intestinale » le microbiote intestinal possède une fonction de maintien de la barrière intestinale en induisant la production de mucus, de PAM et d'IgA.

(3) Les cellules de l'immunité innée

L'absence de microbiote diminue le nombre de DC spécifiquement dans l'intestin. Le microbiote va aussi réguler le développement ou recrutement des macrophages et des monocytes (Walton *et al.* 2006).

De plus il a été montré que les LIE possèdent un profil transcriptomique au niveau des cytokines différent en comparant des souris axéniques à des souris conventionnelles. La réponse face au déclenchement d'une colite expérimentale révèle que le microbiote est indispensable pour la production de la majorité des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires (Ismail, Behrendt, et Hooper 2009).

On peut observer que les cellules dendritiques ainsi que les macrophages, vont réguler très finement la réponse immunitaire adaptative par leur production de cytokines. Les capacités immunorégulatrices de ces cellules vont être induites par une interaction avec le microbiote directement ou avec des métabolites de celui-ci. Par exemple les phagocytes CD11b⁺ et CD11c⁺ possèdent un récepteur au butyrate et à la niacine qui sont des métabolites du microbiote et qui vont induire la production d'IL10 et ainsi promouvoir la différenciation des LTreg (Rescigno 2014).

b) L'immunité adaptative

Chez les souris axéniques, un défaut de développement de certaines populations lymphocytaires est observé. Ces modifications ne sont pas seulement dans l'épithélium

intestinal, une mauvaise structuration de la rate et des ganglions lymphatiques ainsi que des zones lymphocytaires atrophiées sont mises en évidence.

(1) Lymphocytes B

Comme vu précédemment, les souris axéniques souffrent d'une très forte diminution de la maturation des LB et de la sécrétion d'IgA dans l'intestin. Les IgA sont secrétées par les LB au niveau des muqueuses et permettent un maintien à distance du microbiote vis-à-vis de la muqueuse. Il a été observé que certaines bactéries ont la capacité d'augmenter la production intestinale d'IgA. Par exemple, la bactérie *Candidatus arthromitus*, connue aussi sous le nom de bactérie segmentée filamenteuse (SFB), augmente beaucoup cette production (Klaasen *et al.* 1993).

L'absence de microbiote agit donc sur la population de LB en diminuant la production d'IgA qui permet le maintien de la barrière intestinale.

(2) Lymphocytes T

Chez les souris conventionnelles on retrouve les LT CD8, les lymphocytes cytotoxiques, qui sont principalement localisés dans l'espace intra-épithélial et les CD4, les lymphocytes auxiliaires, localisés dans la *lamina propria*.

Les LT CD4 sont fortement réduits chez les souris axéniques en particulier les Th17 et les Th1. Les Treg sont peu touchés dans l'intestin grêle mais sont fortement diminués dans le colon. L'homéostasie intestinale est établie grâce à la balance entre les Th17 et les Treg. Les MICI sont marqués par un fort déséquilibre entre ces deux populations avec une accumulation des Th17 qui favorisent une inflammation chronique. Il existe différentes voies de différenciation des Th CD4⁺ selon les cytokines présentes dans l'environnement (Figure 9).

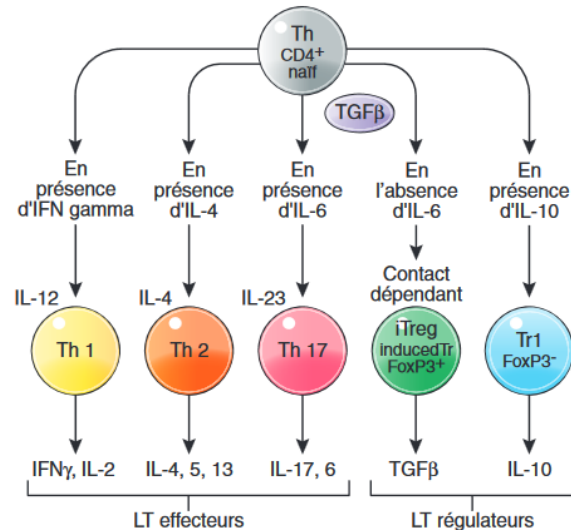


Figure 9 : Différenciation des CD4 en LT effecteurs et LT régulateurs (https://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-13_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf)

(a) *Les lymphocytes T régulateurs*

Les Treg ont le rôle de régulateurs auprès des autres cellules du système immunitaire. Ils contrôlent la réponse aux antigènes et aux composés du soi, de plus, ils aident à protéger des maladies auto immunes. Leurs rôles est assuré grâce à la production de cytokines immunorégulatrices comme l'IL10 et le TGF- β (Transforming Growth Factor Beta). Ils participent à maintenir l'homéostasie. Il a été montré que le nombre et la capacité immunorégulatrices des Treg sont réduits chez les souris axéniques (Sommer et Bäckhed 2013).

Certaines espèces bactériennes ont un lien avec l'induction de la tolérance. Par exemple *Bacteroides fragilis* est capable de provoquer une production d'IL10 par les Treg et de limiter l'expansion des Th17 par l'intermédiaire d'un composant de sa paroi, le polysaccharide capsulaire A (PSA) (Surana et Kasper 2012).

(b) *Les lymphocytes auxiliaires*

A ce jour il existe trois types de lymphocytes T auxiliaires connus : Les Th1, les Th2 et les Th17. Selon le type de cytokines produites, les LT CD4 vont se différencier en l'une de ces catégories. En règle générale lors d'une infection par un pathogène intracellulaire, ce sont

les Th1 qui vont être induits et vont produire de l'IFN γ et de l'IL12. Les Th2, eux, sont impliqués dans une réponse à des pathogènes extracellulaires comme les helminthes en produisant de l'IL4. Les Th17 eux sont impliqués dans les maladies auto-immunes et les infections bactériennes des muqueuses (Korn *et al.* 2009). Ils sécrètent les cytokines pro-inflammatoires IL17 et IL22 et induisent la production d'IL6 et IL8 par les cellules stromales ce qui conduit au recrutement de neutrophiles et donc à l'inflammation. Comme les Treg, certaines bactéries peuvent provoquer la différenciation des Th17 comme la bactérie SFB par l'intermédiaire des DC (Schnupf, Gaboriau-Routhiau, et Cerf-Bensussan 2013). Le microbiote agit aussi sur la voie des Th2 qui est une piste intéressante pour la prévention de l'asthme, des allergies et de la dermatite atopique qui sont dus à l'hyperactivation de Th2 (Fujimura et Lynch 2015).

Le système immunitaire est influencé par le microbiote intestinal. Le développement des antibiotiques et l'hygiénisme a conduit à une diminution importante des infections mais en parallèle, une augmentation de la susceptibilité aux maladies auto-immunes et aux allergies est observée (Bach 2002). Il a été montré que les souris axéniques sont plus susceptibles au développement du diabète de type 1 que les souris conventionnelles et que la monocolonisation des souris NOD (non-obese diabete) par SFB les protèges contre la maladie. En revanche, les souris conventionnelles dépourvues de SFB ne sont pas protégées (Schnupf, Gaboriau-Routhiau, et Cerf-Bensussan 2013). Une autre étude nous montre aussi que le microbiote est important dans la résistance face au virus de l'influenza A. En effet les souris soumises à des cocktails d'antibiotiques ont un défaut d'activation des récepteurs microbiens cytoplasmiques ainsi qu'une diminution de la migration des DC qui empêche l'activation des LB, LT CD4+ et LT CD8+. Par ailleurs la stimulation des souris sous antibiotiques par différents ligands des TLR permet de rétablir la capacité du système immunitaire (Ichinohe *et al.* 2011).

2.3) Régulation du microbiote intestinal par le système immunitaire

Le système immunitaire joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la composition du microbiote afin de permettre le maintien de l'homéostasie intestinale.

a) *Immunité innée*

Les cellules immunitaires et les cellules épithéliales possèdent des PRR qui vont reconnaître les motifs bactériens et induire une réponse cellulaire ou humorale. Ces PRR sont stratégiquement positionnés dans la cellule, il y en a sur la membrane cellulaire pour les bactéries et champignons extracellulaires, dans les endosomes pour les virus et enfin dans le cytoplasme. Ces récepteurs reconnaissent les motifs conservés sur les pathogènes : les PAMP. Ces PAMP sont spécifiques et essentiels à la survie des pathogènes.

(1) Les TLR

Chez les mammifères il existe 11 membres dans la famille des TLR qui reconnaissent des PAMP différents :

TLR	PAMP
1, 2, 4 et 6	Lipides bactériens
3, 7 et 8	ARN viral
9	ADN bactérien
5 et 10	Protéines de bactéries ou parasites

Tableau II : Les TLR et leurs PAMP associés

La signalisation des TLR est dépendante de 2 molécules adaptatrices, MyD88 pour tous les TLR sauf le TLR 3 et TRIF pour les TLR 3 et 4.

Il a été montré que des souris déficientes en MyD88 avaient une modification de leur microbiote intestinal (Larsson *et al.* 2012).

(2) Les NLR

Les NLR sont des récepteurs cytosoliques. Les principaux étudiés sont NOD1 et NOD2. Les agonistes de ces récepteurs sont bactériens. NOD1 a pour ligand DAP (d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid) qui est principalement produit par les bactéries Gram négatives et il est présent sur quelques bactéries Gram positives comme *Listeria* et *Bacillus* (Moreira et Zamboni 2012, 1). NOD2 lui est un récepteur du muramyl dipeptide (MDP) bactérien. Les souris déficientes pour ces récepteurs présentent une altération de la composition de leur microbiote (Couturier-Maillard *et al.* 2013). Une autre étude souligne le fait qu'une mutation de NOD2 influence la composition du microbiote intestinal. Cette étude

nous montre que les patients atteints de la maladie de Crohn et mutés pour NOD2 (le premier gène de risque connus) ont une dysbiose également en dehors des poussées inflammatoire, ceci nous montre bien que le système immunitaire innée influence le microbiote (Rehman *et al.* 2011).

Lamas *et al.* ont étudiés la voie de CARD9 (caspase recruitment domain family member 9) qui est également un gène de susceptibilité chez les MICI, il code pour une protéine qui est dans la voie de signalisation des PRR, il possède un rôle dans la réponse aux bactéries médiée par NOD2. Les souris Knock Out (KO) pour CARD9 ont un microbiote altéré et sont plus susceptibles aux colites. Lorsque le microbiote des souris CARD9 KO est transféré à des souris wild type (WT), elles deviennent à leurs tours sensibles aux colites. Le microbiote des souris CARD9 KO est incapable de métaboliser le tryptophane en ligand de l'aryl hydrocarbon receptor (AHR) ce qui implique qu'il n'y a pas de production d'IL22 qui aurait permis le rétablissement de la colite. Il est possible de rétablir ce défaut en administrant 3 types différents de *Lactobacillus* capables de métaboliser le tryptophane (Lamas *et al.* 2016).

b) Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont particulièrement présentes au niveau des muqueuses. Ce sont des effecteurs de la réponse innée qui sont dépourvus de récepteurs aux antigènes mais qui ont une diversité fonctionnelle proche des LThelper. Il y a trois types d'ILC, ILC1 vont inhiber la production d'IFN γ , les ILC2 productrices d'IL13, d'IL5 et d'IL4 comme les Th2 et pour finir les ILC3 qui ressemblent aux Th17 en exprimant ROR γ t et le récepteur à l'IL23 qui leurs confèrent la capacité de sécréter de l'IL17 et de l'IL22. Les ILC influencent la composition du microbiote de par leur localisation et leur production cytokinique à l'exception des ILC2. Les ILC3 sont la première source intestinale d'IL22, cytokine centrale pour la production de nombreuses protéines antimicrobiennes (Goldberg *et al.* 2015).

c) L'immunité adaptative

Il a été montré que les souris présentant des déficiences dans le fonctionnement de leur système immunitaire avaient des conséquences considérables sur leur microbiote. Le gène

Rag1 est un gène qui va coder pour la protéine Rag. Celle-ci est impliquée dans le réarrangement V-D-J (Variable-Diversité-Jonction). Chaque anticorps possède une partie constante et une partie variable, lors du développement des lymphocytes les loci sont réarrangés par l'intermédiaire de Rag pour donner une spécificité antigénique. Des souris Rag1^{-/-} ne pourront donc pas avoir de réarrangement V-D-J et donc d'anticorps ou de récepteurs spécifiques d'un antigène, elles ne possèdent ni LB ni LT. Il a été montré que ces souris ont un microbiote beaucoup moins diversifié que les souris WT (Kato Lucia M. *et al.* 2014).

(1) Lymphocytes T

Il a été montré que chez des souris déficientes en LT, la diversité du microbiote est largement diminuée par rapport aux souris témoins et ce, dans des conditions non inflammatoires. Dans ces souris déficientes en LT, un transfert de LT FoxP3⁺ augmente la diversité du microbiote (Kato Lucia M. *et al.* 2014). De plus ce sont les LT FoxP3⁺ qui vont induire la production des IgA en contribuant au recrutement des LB dans l'intestin par l'intermédiaire de l'IL21 (Cao *et al.* 2015).

D'autres parts, il y a les cellules Natural killer T (NKT) qui sont des LT exprimant également les marqueurs des NK. Les NKT possèdent la molécule CD1d qui est spécialisée dans la présentation des antigènes lipidiques. Ces cellules régulent aussi le microbiote intestinal. En effet les souris mutées pour ce CD1d possèdent un microbiote altéré avec une augmentation en SFB, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette modification semble passer par la production et la maturation des IgA (Brennan, Brigl, et Brenner 2013).

(2) Lymphocytes B

Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes à l'état activé. Dans l'intestin ils se situent dans la *lamina propria*, et plus précisément dans les follicules lymphoïdes isolés et dans les plaques de Peyer. Ils vont produire les IgA, capables de passer la barrière intestinale afin d'aller dans la lumière pour se fixer aux bactéries. Les IgA, étant les immunoglobulines les plus présentes dans l'intestin, ont un rôle central dans l'interaction avec le microbiote intestinal (Macpherson, Köller, et McCoy 2015). La plupart des IgA intestinales sont directement dirigées contre les bactéries de la flore intestinale. Leurs effets permettent de restreindre l'accès du microbiote à l'épithélium intestinal et ils peuvent permettre de modifier les molécules exprimées par les bactéries ou encore de promouvoir la survie de certaines bactéries (Shulzhenko *et al.* 2011).

Pour conclure, nous avons pu voir que le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le développement des cellules immunitaires intestinales mais aussi dans le système immunitaire systémique. En retour le système immunitaire peut contrôler la diversité ainsi que la composition du microbiote. Lorsqu'il y a un déséquilibre d'un côté ou bien d'un autre il y a une perte de l'homéostasie et c'est ainsi que des pathologies peuvent se développer.

Chapitre 3 : Les perturbations du microbiote et leurs implications en physiopathologie

3.1) Qu'est-ce que la dysbiose ?

La dysbiose correspond à une altération de la composition et de la fonction du microbiote, ceci est induit par des facteurs environnementaux et/ou liés à l'hôte. Ceci met à l'épreuve la capacité de résistance et de résilience de la flore intestinale (Levy *et al.* 2017a).

a) Caractéristiques de la dysbiose du microbiote intestinal

(1) Prolifération des pathobiontes

Les pathobiontes sont des membres des bactéries commensales pouvant produire une pathologie, ils sont présents en moindre abondance mais lorsqu'il y a un trouble intestinal ils peuvent proliférer. Par exemple le groupe des Enterobactéries est fréquemment associé aux infections entériques et aux inflammations (Stecher, Maier, et Hardt 2013).

(2) Diminution des symbiontes

Les symbiontes sont les bactéries qui constituent la flore intestinale, nous vivons en symbiose avec elles. Il est possible qu'une dysbiose soit amenée par la perte des symbiontes. Celle-ci peut être la conséquence de la mort de bactéries par la prise d'antibiotique par exemple ou de la diminution de la prolifération bactérienne. La perte des symbiontes peut avoir des répercussions fonctionnelles importantes. Il a été montré que la restauration de cette flore rétablissait le phénotype associé à la dysbiose (Levy *et al.* 2017b).

(3) Perte de la diversité

La dysbiose est souvent associée à une perte de l'alpha diversité qui représente le nombre d'espèces présentes dans l'intestin. La richesse du microbiote intestinal est acquise et croît durant les premières années de la vie et peut être influencée par l'alimentation et les maladies métaboliques. On peut observer une diminution de la diversité bactérienne dans le cas de dysbiose induite par une alimentation anormale, dans les MICI, dans le SIDA et dans le diabète de type 1 (Levy *et al.* 2017b).

b) Causes de la dysbiose

Il est important de pouvoir comprendre les mécanismes de la dysbiose car celle-ci peut être liée à la manifestation, au diagnostic et au traitement d'une maladie. Plusieurs facteurs peuvent influencer la dysbiose. Il est difficile d'observer les perturbations du microbiote humain à cause du nombre de profils différents, la plupart des études sont donc faites sur souris avec une alimentation, un environnement et un génotype contrôlés.

(1) Perturbation antibiotique

La consommation d'antibiotique représente la première cause de dysbiose. Celle-ci est plus prononcée en fonction de la durée de la prise d'antibiotique et de si celui-ci est à spectre large ou étroit (Hawrelak 2004). Afin de montrer l'impact à long terme des antibiotiques chez l'humain, une équipe a administré de la clindamycine pendant 7 jours à des sujets sains et a comparé le microbiote à un groupe contrôle. La collecte d'échantillons de selles a été faite sur 2 ans. Ils ont pu observer une diminution importante de la diversité des Bacteroides qui ne se rétablit pas durant cette période. De plus ils observent aussi une augmentation des gènes de résistances aux antibiotiques (Jernberg *et al.* 2007).

Etant donné que le microbiote influe sur le système immunitaire, la modification de celui par les antibiotiques peut altérer la réponse immune. Par exemple le traitement à l'amoxicilline va essentiellement éradiquer l'espèce *Lactobacillus* dans l'intestin grêle et réduire la densité des bactéries anaérobies et aérobies dans le colon. Les changements induits par l'amoxicilline réduisent l'expression des gènes du CMH I et II dans l'intestin grêle et augmentent l'expression de protéase *via* les mastocytes dans la partie distale de celui-ci

(Ubeda et Pamer 2012). Dans un autre exemple il a été montré que le traitement par le métronidazole augmentait l'expression de Reg3 γ et de l'IL-25 (cytokine pro-inflammatoire) dans le colon des souris, ceci montre une augmentation de la stimulation microbienne. Le traitement au métronidazole montre aussi un nombre plus élevé de macrophages et de NK dans la *lamina propria* colique ainsi que la diminution de l'expression intestinale de Muc2 qui est le composant majeur de la couche de mucus (Wlodarska *et al.* 2011).

Par ces différentes modifications, la prise d'antibiotiques peut être responsable du déclenchement de certaines maladies. Par exemple la prise de streptomycine peut être responsable des infections aux *Salmonella* spp (Sekirov *et al.* 2008). Nous savons aussi que l'exposition aux antibiotiques représente le principal facteur de risque pour une infection à *Clostridium difficile*. Les personnes hospitalisées prenant des antibiotiques ont 60% de risque en plus de contracter l'infection. Une exposition prolongée aux antibiotiques ou à de plus fortes doses est associé à une augmentation du risque d'infection par *C difficile*. Certains antibiotiques sont associés à un risque plus important (clindamycine, céphalosporine et fluoroquinolones) (Kevin Brown *et al.* 2015)

(2) Alimentation

L'alimentation possède un rôle très important car c'est l'un des substrats que les bactéries vont consommer, c'est donc le type d'alimentation qui va former ou modifier le microbiote. L'influence de l'alimentation sur le microbiote a été montrée pendant la phase de colonisation, en effet les enfants nourris au sein ont un niveau plus élevé de *Bifidobacteria* spp alors que les enfants nourris au lait maternisé ont un niveau plus élevé de *Bacteroides* spp (Fallani *et al.* 2010).

Plusieurs types d'alimentation ont été étudiés chez les souris et l'homme, Brown et al ont fait une revue détaillée sur le sujet où l'on trouve le tableau suivant :

Alimentation	Bactéries modifiées	Effet sur les bactéries	Références
Riche en matière grasse	<i>Bifidobacteria</i> spp	Diminue	(Zhang <i>et al.</i> 2010)
Riche en matière grasse et en sucre	<i>Clostridium innocuum</i> , <i>Catenibacterium mitsuokai</i> et <i>Enterococcus</i> spp	Augmente	(Turnbaugh, Ridaura, <i>et al.</i> 2009)
	<i>Bacteroides</i> spp	Diminue	(Turnbaugh, Ridaura,

			<i>et al.</i> 2009)
Appauvrie en glucide	Bacteroidetes	Augmente	(Walker <i>et al.</i> 2011)
Calories restreintes	<i>Clostridium coccoïdes</i> , <i>Lactobacillus</i> spp et <i>Bifidobacteria</i> spp	Diminue (empêche la croissance)	(Santacruz <i>et al.</i> 2009)
Glucides complexes	<i>Mycobacterium avium</i> sous espèces paratuberculosis et Enterobacteriaceae	Diminue	(Walker <i>et al.</i> 2011)
	<i>B longum</i> sous espèces <i>longum</i> , <i>B breve</i> et <i>B</i> <i>thetaitaomicron</i>	Augmente	(Pokusaeva, Fitzgerald, et van Sinderen 2011)
Sucres raffinés	<i>C difficile</i> et <i>C</i> <i>perfringens</i>	Augmente	(Berg, Kelly, et Farraye 2013; Begley, Hill, et Gahan 2006)
Végétarien	<i>E coli</i>	Diminue	(Zimmer <i>et al.</i> 2012)
Haut niveau en oméga 6 de l'huile de carthame	Bacteroidetes	Diminue	(Turnbaugh <i>et al.</i> 2008; de La Serre <i>et al.</i> 2010)
	Firmicutes, Actinobacteria et Proteobacteria	Augmente	(Turnbaugh <i>et al.</i> 2008; de La Serre <i>et al.</i> 2010)
	δ -Proteobacteria	Augmente	(Hildebrandt <i>et al.</i> 2009)
Graisse du lait animal	δ -Proteobacteria	Augmente	(Devkota <i>et al.</i> 2012)

Tableau III : Sommaire de l'influence sur le microbiote de différents types d'alimentation (Kirsty Brown *et al.* 2012)

Ces changements du microbiote ont un effet très important sur la réponse inflammatoire et métabolique de l'hôte. Cela peut donc jouer un rôle dans le déclenchement de certaines maladies liées à des dysbiose comme l'obésité, le diabète de type 2, la maladie cœliaque etc.

(3) Génétique

Il a déjà été abordé au début de ce mémoire que la génétique avait un rôle sur le développement du microbiote. Des études ont été effectuées sur des jumeaux monozygotes et dizygotes et il s'avère que le pourcentage de similarité du microbiote dominant est de 82% chez les monozygotes contre 68% chez les dizygotes et pour finir 45% chez les enfants non apparentés (Stewart, Chadwick, et Murray 2005).

Par ailleurs, il est connu pour certains gènes une implication dans l'élaboration du microbiote. Par exemple un déficit en NOD2 diminue la capacité de l'hôte à tuer les bactéries. Il a été montré chez des souris et chez l'homme qu'une mutation sur ce gène entraînait une altération du microbiote intestinal et pouvait être déclencheur de la maladie de Crohn (Rehman *et al.* 2011).

3.2) Les maladies liées à la dysbiose : exemple des MICI

Aujourd'hui on lie plusieurs maladies à la dysbiose comme l'obésité, le diabète de type 2 et la maladie cœliaque. En tous cas il a été observé une dysbiose au cours de ces maladies et l'analyse du microbiote pourrait permettre l'établissement d'un diagnostic plus précoce mais aussi dans certains cas, l'étude du microbiote et le rétablissement de celui-ci pourrait conduire à une approche thérapeutique. Ici nous allons aborder le cas des MICI.

a) *Les MICI*

Les MICI comprennent la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH) et sont caractérisées par une inflammation de la paroi du tube digestif qui peut aller de la bouche à l'anus pour la MC et qui touche le colon et le rectum pour la RCH. Ces maladies sont le plus souvent diagnostiquées chez des sujets jeunes, âgés de 20 à 30 ans pour la MC et de 30 à 40 ans pour la RCH, et évoluent par alternance entre des phases de poussée et de rémission. Il s'agit de pathologies hautement invalidantes, pour lesquelles il n'existe pas de traitement curatif. Les médicaments actuels (anti-inflammatoires, immunomodulateurs) permettent un contrôle durable de la maladie. Néanmoins, un traitement chirurgical est

nécessaire chez environ un patient sur deux 10 ans après le diagnostic, dans le cas d'une résistance aux médicaments ou de complications (par exemple un cancer). La prévalence des MICI à travers la population a subi une très forte augmentation au cours des cinquante dernières années dans les pays développés d'Amérique du nord et d'Europe de l'ouest principalement. Les chiffres sont passés de 8-14 cas pour 100000 habitants à 120-200/100000 personnes atteintes de RCH, et de 6-15/100000 à 50-200/100000 personnes atteintes de MC. De plus, il a été constaté que les changements environnementaux au sein de ces populations jouent un rôle important dans l'augmentation des MICI (Cosnes *et al.* 2011).

La physiopathologie des MICI est due à plusieurs facteurs : la susceptibilité génétique, les facteurs environnementaux, le système immunitaire et le microbiote intestinal. L'association génétique la plus clairement établie est celle de la mutation du gène NOD2 comme nous l'avons vu précédemment. Ce sont notamment les mutations de gènes impliquées dans la reconnaissance bactérienne, l'immunité innée et l'autophagie qui vont ressortir dans le cadre des MICI. Les rôles du tabac et de l'appendicectomie ont été aussi établis. Le tabac étant protecteur pour la RCH et délétère pour la MC.

Les patients atteints de la MC ont une diminution du phylum des Firmicutes, notamment les groupes phylogénétiques des *Clostridium leptum* et *Clostridium coccoides* qui sont des producteurs importants de butyrate. Cet acide gras à chaîne courte représente une source énergétique pour les cellules épithéliales intestinales mais aussi un inhibiteur de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse. La perte de ces groupes contribuent donc au développement de MICI (Manichanh *et al.* 2006). Il a été aussi observé une augmentation de la famille des Enterobacteriaceae avec le groupe invasif de *E. coli* qui est impliqué dans l'étiopathogénèse de la MC. Le nombre de *E. coli in situ* est corrélée avec la sévérité des maladies iléales (Baumgart *et al.* 2007).

b) Le microbiote comme solution

Chez les malades atteints de MICI l'augmentation des bactéries pro-inflammatoires et la diminution des bactéries immunorégulatrices est constatée, il est possible d'imaginer qu'en rétablissant le microbiote, un phénotype sain pourrait être rétabli.

La transplantation de microbiote fécal (TMF) consiste en l'introduction du microbiote d'une personne saine dans le tube digestif d'une personne malade ce qui va rééquilibrer la

flore intestinale de celui-ci. Les patients atteints par une infection à *Clostridium difficile* ont régulièrement des récurrences, afin de remédier à ce déséquilibre, le premier essai de TMF efficace et documenté a été effectué en 1983, depuis plusieurs centaines d'essais ont été effectués et la première étude randomisée contrôlée a été publiée en 2013. Cette étude comprenait trois groupes de patients ayant une forme récurrente de *C. difficile* : un groupe recevant de la vancomycine seule, un groupe recevant de la vancomycine puis une TMF et un groupe recevant de la vancomycine puis une préparation colique neutre qui sert de témoin. L'efficacité du traitement est établie sur la résolution de la diarrhée sans rechute sur dix semaines, celle-ci est de 30,1% pour le groupe vancomycine contre 81,3% pour le groupe TMF (et 23,1% pour le groupe témoin), les patients n'ayant pas eu de bon résultats suite à la TMF en ont subi une seconde et cela augmente le score de l'efficacité à 93,8% (van Nood *et al.* 2013). La TMF est quelque chose de très bien tolérée et sans effets secondaires graves.

Etant donnée l'efficacité de la TMF avec *C. difficile* il est intéressant de tester cette approche dans le cadre des MICI bien que ces pathologies soient liées à plusieurs facteurs autres que la dysbiose. La TMF pourrait rétablir l'échange hôte-microbiote en plus de rétablir un état de normobiose du microbiote.

Plusieurs études ont été menées sur les patients atteints de rectocolite hémorragique sans résultat convaincant par rapport aux TMF sur les patients à *C. difficile*. Une étude a été menée sur des patients atteints de la maladie de Crohn, les résultats sont plus encourageants. Plusieurs facteurs doivent être encore mis au point tel que le donneur optimal, le moment de la transplantation, la voie d'administration etc. En attendant, ces études permettent d'identifier des composants actifs du microbiote qui peuvent être isolés et utilisés comme potentiels agents thérapeutiques. Par exemple il a été montré que *Faecalibacterium prausnitzii* joue un rôle clé dans l'homéostasie intestinale (Sokol *et al.* 2008). Quévrain *et al.* ont permis d'identifier une protéine immunorégulatrice produite par cette bactérie (Quévrain *et al.* 2016). Il sera possible à l'avenir d'utiliser les bactéries issues du microbiote seules ou combinées comme microbiote artificiel afin de rétablir une normobiose contrôlée (Pigneur et Sokol 2016).

Le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière. Il possède une complexité extraordinaire et est impliqué dans énormément de fonctions biologiques. Sa disparité entre les individus en fait quelque chose d'unique et rend les études qui le concernent d'autant plus complexes.

Partie II - Objectif de l'étude

Comme vu précédemment, le microbiote intestinal est extrêmement complexe. Il est influencé par plusieurs facteurs tels que l'alimentation, la prise d'antibiotique et la génétique de l'hôte. Son interaction avec l'hôte va entraîner diverses fonctions comme le développement du système immunitaire ou le métabolisme de certains composés. L'étude du microbiote a mené à la découverte du lien entre celui-ci et plusieurs maladies comme la maladie cœliaque, les MICI, les allergies, les maladies auto-immunes ou encore certaines maladies psychiatriques, ce qui impose de découvrir quel est le lien précis entre les micro-organismes intestinaux et certaines fonctions de l'hôte.

Ceci nous amène à mon projet qui consiste en l'identification et la caractérisation de micro-organismes du microbiote intestinal possédant des fonctions immunomodulatrices chez l'hôte. Le corps humain possède 100 000 milliards de bactéries dans ses intestins et ceci représente 1000 espèces différentes. La beta diversité est très différente et il n'est pas possible de définir un microbiote unique. Pour ce projet, le choix s'est porté sur des bactéries représentatives des grands groupes bactériens composant le microbiote intestinal.

Mon projet consiste en un descriptif des bactéries issues de la flore intestinale par rapport à leurs activités de stimulation des cellules du système immunitaire. L'activité globale est documentée, les stimulations sont donc effectuées avec les surnageants de culture bactérienne qui vont nous permettre d'observer l'effet des molécules produites par les bactéries ainsi que les culots bactériens morts qui vont nous permettre d'observer l'effet des composants intra et extracellulaires des bactéries. Cette stimulation va permettre d'analyser si certains micro-organismes vont entraîner une très forte inflammation ou au contraire une protection contre l'inflammation. De plus, grâce à la cytométrie en flux, les cellules impliquées dans la réponse immunitaire en réponse à la stimulation par les bactéries testées seront déterminées.

Le nombre de bactéries à tester étant très important, une stratégie en « entonnoir » a été adoptée afin d'effectuer un échantillonnage (Figure 10). Dans un premier temps un arbre phylogénétique est construit afin de placer les 121 bactéries isolées et de collection, ceci permet de sélectionner 65 bactéries représentatives des grands groupes bactériens issus du microbiote intestinal. Ensuite les surnageants de culture de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) stimulées par les bactéries sont analysés par ELISA, ceci permettant une première description du potentiel des bactéries et la sélection de celles qui auront un profil

type (très inflammatoire, peu inflammatoire voire régulateur). Les 19 produits de stimulations sélectionnées sont ensuite analysés par Luminex sur une plateforme. Cette analyse nous permet d'effectuer un échantillonnage de 6 bactéries représentatives des réactions inflammatoires. Celles-ci seront testées dans différentes conditions sur PBMC totaux et la réponse inflammatoire sera analysée par cytométrie en flux.

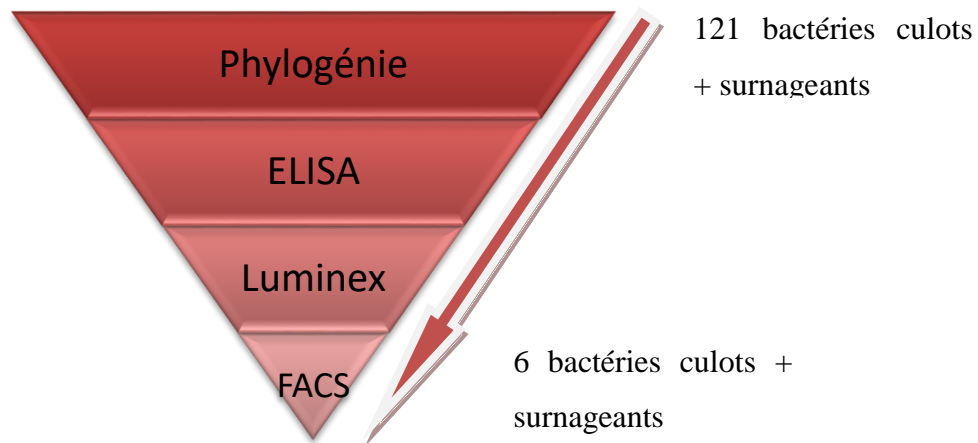


Figure 10 : Stratégie en entonnoir afin de sélectionner les bactéries

Je vais donc tous d'abord vous présenter le matériel et méthodes de mon projet, quels sont les moyens mis en œuvre afin d'obtenir mes résultats que je présenterai ensuite, puis je terminerai sur une discussion.

Partie III - Matériels **et** **Méthodes**

1.1) Présentation de la collection des bactéries intestinales étudiées

Dans un premier temps les bactéries ont été sélectionnées à partir de la littérature et obtenues par les collections publiques à l'ATCC et DSMZ. Dans un second temps elles ont été isolées d'un donneur sain par Chantale Bridonneau du laboratoire Micalis afin d'augmenté la biodiversité.

a) Isolement et identification des bactéries à partir de selles fraîches

La technique consiste dans l'isolement des souches bactériennes en chambre anaérobie ayant un mélange de gaz 90% azote, 5% CO₂ et 5% H₂ à partir 1 gramme de selles fraîches. Dans un premier temps l'échantillon est dilué en condition anaérobie puis les dilutions 10⁻⁸ et 10⁻⁹ sont mises en culture sur gélose en boîte de Pétri dans un milieu riche complexe GYHBHI (Gélosé, Yeast, Hémine, Brain Heart Infusion) cellobiose, maltose, cystéine et jus de rumen. Les colonies obtenues sont repiquées, en prenant soin de choisir les plus variées possibles à l'œil. 96 colonies sont donc repiquées sur 2 séries de 8 boîtes à 12 cadrans, une série de boîtes sortira de la chambre pour être exposée pendant 1 heure à l'air avant d'être ré incubée en chambre anaérobie. Ainsi nous pourrons déterminer les souches anaérobies strictes et facultatives. Ensuite toutes les souches bactériennes sont repiquées et en priorité les souches anaérobies strictes qui sont très fragiles. Un stock de bactéries est également constitué dans du milieu de culture 16% glycérol et congelées à -80°C.

Une fois les bactéries isolées nous les identifions. Nous avons choisi d'utiliser la PCR sur colonie, en prélevant une colonie et en l'ajoutant directement dans le milieu réactionnel de la PCR. Lors du premier cycle de PCR qui consiste en la dénaturation, les bactéries sont lysées et leurs ADN est libérés et va ainsi servir de matrice. Dans notre cas cette méthode a fonctionné sur 66 échantillons. Pour les 28 restants il a fallu faire une extraction d'ADN génomique en passant par un broyage avec des microbilles puis une purification avec un kit Promega afin de faire la PCR. Les primers de la PCR sont indiqués dans le tableau IV et les cycles dans le tableau V :

Primers 16s F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Primer 16s R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Tableau IV : Primers ADN 16s pour PCR et séquençage bactérien

Étapes	Température	Durée
Initiation	95°C	10min
Dénaturation	95°C	30sec
Hybridation	55°C	1min
Elongation	72°C	1min
Elongation finale	72°C	10min
Fin	10°C	∞

Tableau V : Cycles de PCR effectués pour amplifier l'ADN 16S

Chez la bactérie, la petite sous unité ribosomique est constituée d'ARN 16S. Cet ARN est non codant et possède une région constante et une région hypervariable. C'est le séquençage de la région hypervariable qui va permettre de discriminer les différents taxons bactériens. Cette taxonomie génétique se fonde sur la distance génétique entre les bactéries. Ainsi il est possible d'identifier les différentes bactéries isolées par leur séquence. Par ailleurs les bactéries ne sont pas toutes répertoriées, elles ne sont donc pas toutes identifiables.

b) Sélection des bactéries identifiées

Ensuite afin de ne pas tester toutes les bactéries isolées et séquencées, le logiciel MUSCLE a été utilisé afin d'aligner les séquences et ainsi permettre de créer un arbre phylogénétique grâce à FigTree. L'arbre se dessine en fonction de la distance phylogénétique qu'il y a entre chaque bactérie. Ainsi le champ de recherche a été réduit en choisissant un panel représentatif des bactéries présentes. En éliminant les redondances, les 121 bactéries cultivées sont réduites à 65 bactéries à analyser. Ci-dessous, l'arbre de la sélection finale (Figure 11).

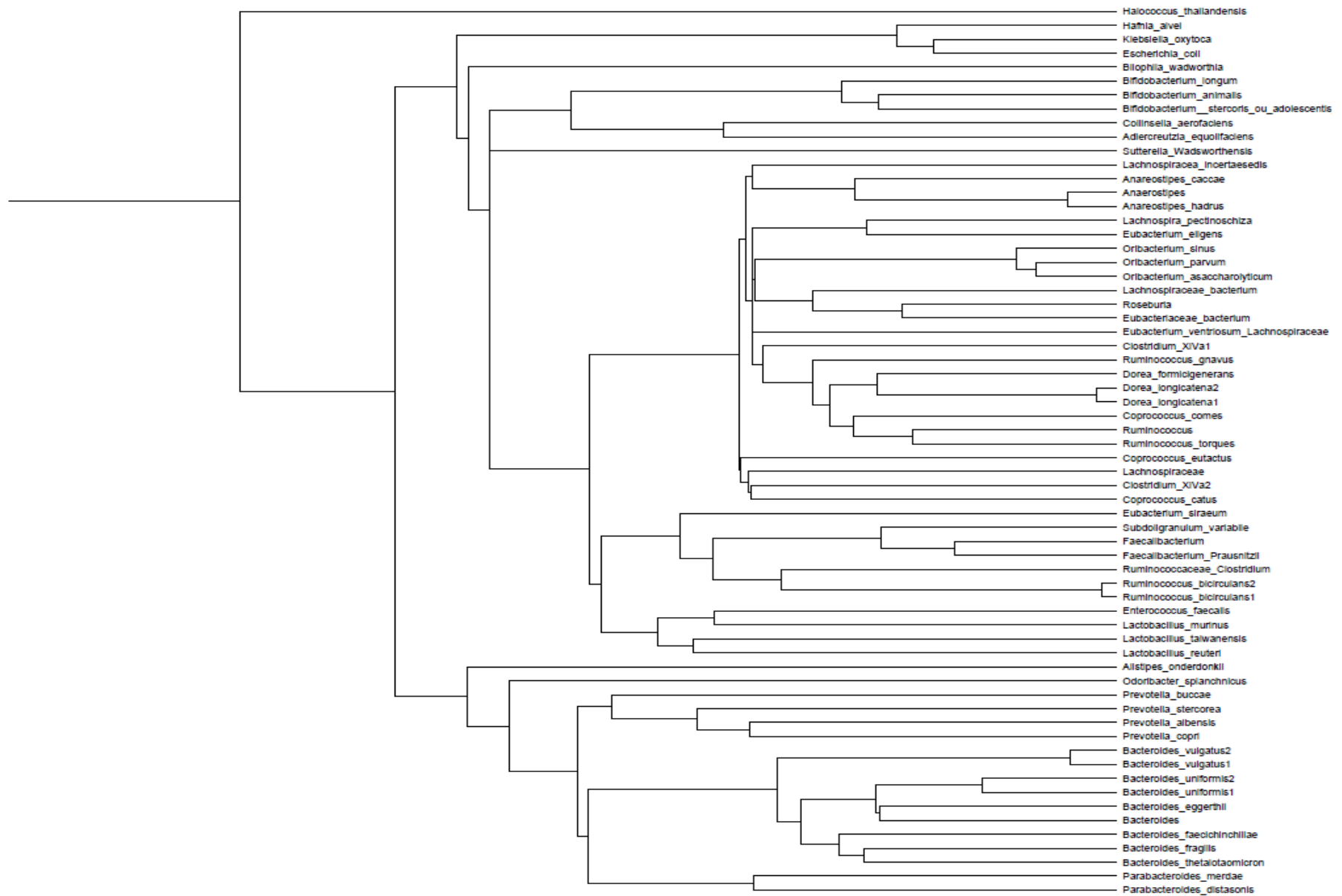


Figure 11: Arbre phylogénétique des bactéries sélectionnées -Méthode *Neighbor Joining*- NJ

Les 4 phyla principaux du microbiote intestinal : les Firmicutes, les Bacteroides, les Protéobactéries et les Actinobactéries sont représentés.

Les bactéries sélectionnées, leurs provenances respectives et leurs milieux de culture associés sont présentés dans le Tableau VI :

Bactéries	Provenances	Codes	Milieux
Adlercreutzia equolifaciens	DSMZ	19450	WCB+H+Cyst+K3+sang
Alistipes onderdonkii	Micalis	MH2-A5	YBHI complet + jus de rumen
Anaerostipes	Micalis	MH2-12	MRS
Anaerostipes caccae	DSMZ	14662	LYBHI C. +H+K1+K3
Anaerostipes hadrus	DSMZ	3319	LYBHI C. +H+K1+K3
Bacteroides eggerthii	Micalis	MH1-8	M17 complet
Bacteroides faecichinchillae	Micalis	MH2-D11	YBHI complet + jus de rumen
Bacteroides fragilis	DSMZ	2151	LYBHI+cystéine
Bacteroides thetaiotaomicron	ATCC	29148	M17+glucose+hémine+cyst.
Bacteroides uniformis	Micalis	MH2-G1	YBHI complet + jus de rumen
Bacteroides vulgatus1	DSMZ	1447	LYBHI+cystéine
Bacteroides vulgatus2	Micalis	MH2-E3	YBHI complet + jus de rumen
Bifidobacterium animalis	Micalis	MH1-12	MRS cyst
Bifidobacterium longum	ATCC	15707	LYBHI+cystéine
Bifidobacterium stercosis ou adolescentis	Micalis	MH1-13	MRS
Bilophila wadworthia	DSMZ	11045	BBE+cysteine+taurine
Clostridium XIVa1	Micalis	MH2-A2	YBHI complet + jus de rumen
Clostridium XIVa2	Micalis	MH2-B1	YBHI complet + jus de rumen
Colinsella aerofaciens	Micalis	MH2-D3	YBHI complet + jus de rumen
Coprococcus catus	Micalis	MH2-G4	YBHI complet + jus de rumen
Coprococcus comes	Micalis	MH2-9	MRS cyst
Coprococcus eutactus	Micalis	MH2-G9	YBHI complet + jus de rumen
Dorea formicigenerans	DSMZ	3992	YBHI C.K1K3
Dorea longicatena1	DSMZ	13814	YBHI C.K1
Dorea longicatena2	Micalis	MH2-A10	YBHI complet + jus de rumen

Enterococcus faecalis	Micalis	MH2-5	MRS cyst
Escherichia coli	ATCC	123	LB
Eubacteriaceae bacterium	Micalis	MH2-E12	YBHI complet + Jus de rumen
Eubacterium eligens	Micalis	MH2-F8	YBHI complet + Jus de rumen
Eubacterium siraeum	DSMZ	3986	YBHI complet + jus de rumen
Eubacterium ventriosum	Micalis	MH2-14	MRS cyst
Faecalibacterium	Micalis	MH2-D10	YBHI complet + Jus de rumen
Faecalibacterium prausnitzii	DSMZ	17677	LYBHI+cystéine+cell+malt
Hafnia alvei	Micalis	MH2-H4	YBHI complet + jus de rumen
Klebsiella oxytoca	Micalis	MH1-1	LB
Lachnospira pectinoschiza	Micalis	MH2-C11	YBHI complet + jus de rumen
Lachnospiraceae	Micalis	MH2-G11	YBHI complet + jus de rumen
Lachnospiraceae bacterium	Micalis	MH2-G3	YBHI complet + Jus de rumen
Lachnospiraceae incertaesedis	Micalis	MH2-E11	YBHI complet + jus de rumen
Lactobacillus murinus	CNCM	I-5020	MRS
Lactobacillus reuteri	CNCM	I-5022	MRS cysteine
Lactobacillus taiwanensis	CNCM	I-5019	MRS
Odoribacter splanchnicus	Micalis	MH2-E6	YBHI complet + jus de rumen
Oribacterium asaccharolyticum	DSMZ	24638	WCB+H+Cyst+K1
Oribacterium parvum	DSMZ	24637	LYBHI+cystéine+cell+malt
Oribacterium sinus	DSMZ	17245	WCB+H+Cyst+K1
Parabacteroides distasonis	DSMZ	20701	M17 complet
Parabacteroides merdae	Micalis	MH2-B3	YBHI complet + jus de rumen
Prevotella albensis	DSMZ	11370T	YBHI C.K1K3
Prevotella buccae	DSMZ	20615T	YBHI C.K1K3
Prevotella copri	DSMZ	18205	M17+glucose+hémine+cyst.
Prevotella stercorea	Micalis	MH2-D12	YBHI complet + jus de rumen
Roseburia	Micalis	MH2-F12	YBHI complet + jus de rumen
Ruminococcaceae clostridium	Micalis	MH2-B7	YBHI complet + Jus de rumen
Ruminococcus	Micalis	MH2-G10	YBHI complet + jus de rumen
Ruminococcus bicirculans1	Micalis	MH2-B5	YBHI complet + jus de rumen
Ruminococcus bicirculans2	Micalis	MH2-G2	YBHI complet + jus de rumen
Ruminococcus gnavus	ATCC	29149	LYBHI+cystéine+cell+malt
Ruminococcus torques	ATCC	27756	LYBHI+cystéine
Subdoliganulum variabile	DSMZ	15176	LYBHI+cystéine+cell+malt

Suturella wadsworthensis	DSMZ	14016	YBHI+cyst+H+K1+K3+form+f um.
---------------------------------	------	-------	---------------------------------

Tableau VI : Bactéries sélectionnées avec l'arbre phylogénétique. On peut voir la provenance, le code de la bactérie ainsi que le milieu liquide dans lequel elles ont été cultivées.

1.2) Stimulation bactérienne et culture cellulaire

a) *Conditions d'obtentions des stimuli bactériens*

Culots et surnageants proviennent de l'équipe Micalis situés à l'INRA de Jouy-en-Josas. Les bactéries sont cultivées dans des milieux spécifiques pour leurs croissances, il y a un nombre important de milieux différents. Ceux-ci seront employés comme contrôle lors des stimulations par les surnageants. Chaque surnageant et culot bactérien sera testé en stimulation cellulaire :

- Le surnageant bactérien est prélevé à la suite d'une centrifugation à 6000g pendant 15 minutes puis filtré sur des filtres à 0,2µm. Il permet d'analyser la capacité pro-inflammatoire ou immunorégulatrice des molécules sécrétées par les bactéries dans le milieu. Le milieu seul sera utilisé en contrôle lors de la stimulation car il peut y avoir des effets produits et cela nous servira à normaliser la réaction des cellules face au surnageant.

- Après centrifugation le culot bactérien est récupéré puis congelé, il est donc composé de bactéries mortes. Elles sont ensuite re-suspendues dans un volume approprié de PBS 1X afin que l'on obtienne 10⁸CFU/mL. Les culots bactériens sont congelés, ils sont donc constitués de fragments bactériens, avec ces échantillons l'effet de la paroi et des constituants bactériens seront observés. Le PBS 1X est utilisé comme contrôle.

Nous choisissons de tester en tout 65 bactéries différentes sur 5 donneurs de sang issus de l'EFS. Ces stimulations seront faites en duplicatas sur une durée de 24 heures.

b) PBMC

Les PBMC sont les cellules mononuclées du sang périphérique. C'est-à-dire ce sont les cellules possédant un seul noyau à contrario des érythrocytes et des plaquettes qui n'ont pas de noyau d'une part et des granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles) qui ont un noyau multilobé d'autre part. Les PBMC sont donc composés des lymphocytes (LT, LB, Natural Killer (NK)) ainsi que des cellules myéloïdes (Monocytes, DC).

Le sang est issu de l'Etablissement Français du Sang (EFS) collecté dans des tubes EDTA qui sert d'anticoagulant. A partir de ces échantillons de sang, il s'agit de purifier les cellules d'intérêt, les PBMC, par un gradient de densité. Pour cela, du Ficoll (Sigma, ref 10771) qui a pour densité $d = 1.077 \text{ g/mL}$ est utilisé, les érythrocytes ont une densité plus élevée et vont précipiter alors que les cellules d'intérêt (lymphocytes, monocytes, macrophages) vont être plus légers et vont former un anneau au-dessus du Ficoll. Le sang est dilué au demi dans du PBS 1X puis délicatement déposé sur un volume à demi égale de Ficoll. Ensuite les tubes sont centrifugés 30min à 400g avec un minimum d'accélération et sans frein. Après centrifugation il faut récupérer l'anneau de cellules qui se dessine et qui contient l'ensemble des cellules mononuclées du sang périphérique tout en excluant les globules rouges (Figure 12).

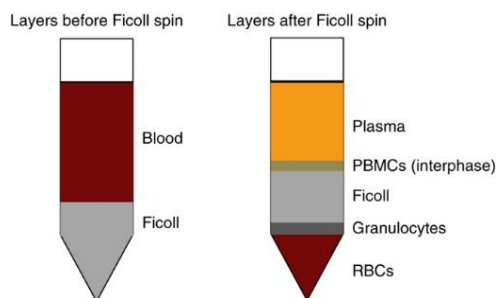


Figure 12 : Séparation des PBMC par gradient de densité(Lin et al. 2014)

Les cellules ainsi récupérées sont lavées deux fois avec du PBS 1X et une centrifugation de 10min à 400g puis elles sont comptées. Les cellules sont ensuite ensemencées à une densité de 1 million de cellules/mL à raison de 180 μL /puits en plaque 96 puits dans du RPMI 1640 (Gibco, ref 11875-093) 10% sérum de veau fœtal (SVF) (PAA laboratoire GmbH, ref A15-101) 1% pénicilline/streptomycine (PAA laboratoire GmbH, ref P11-010) à 37°C, 5% CO₂.

c) Contrôles positifs et négatifs de la stimulation

Le contrôle positif est de la PMA (phorbol myristate acetate) (500ng/mL, Invivogen, ref t1rl-pma) couplée à de la ionomycine (1µg/mL, Sigma, ref : I0634). La PMA est un petit composé organique qui diffuse à travers la membrane cellulaire pour aller dans le cytoplasme où elle va activer la protéine kinase C (PKC) et la ionomycine est un ionophore calcique qui va induire un signal calcique ce qui va activer une voie signalétique de la réponse immunitaire. Ce couple est très régulièrement utilisé en contrôle positif de stimulation des PBMC. Les stimulations sont effectuées pendant 24h.

Les contrôles négatifs employés sont le PBS seul pour les stimulations avec les culots bactériens et les milieux de cultures associées aux cultures bactériennes pour les surnageants bactériens. Ensuite les surnageants cellulaires de stimulation sont centrifugés puis récupérés pour être congelés à -80°C, ils seront utilisés ultérieurement.

1.3) Analyse de la réponse à la stimulation

a) ELISA

Le principe de l'ELISA consiste en la détection d'antigène présent dans le surnageant par l'interaction d'une part avec un anticorps spécifique de cet antigène et d'autre part un anticorps lié à un complexe coloré qui permettra de doser l'antigène recherché au spectromètre en prenant comme référence une gamme étalon (Figure 13). Tous les surnageants issus de la stimulation des PBMC ont été testés ainsi.

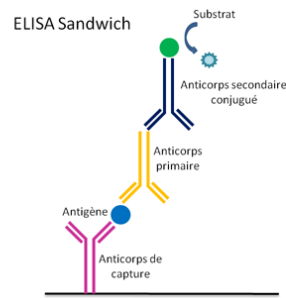


Figure 13 : Principe de l'ELISA indirect utilisé

2 cytokines ont été dosées par ELISA indirects (IL10 : eBioscience, ref88-7106-88 ; TNF α : eBioscience, ref88-7346-88). L'un ciblant une cytokine pro-inflammatoire, le TNF α qui est une cytokine sécrétée par différentes cellules immunitaires tel que les macrophages, les LT CD4⁺ et les NK. Le TNF α est impliqué dans l'inflammation systémique et dans la réponse de phase aiguë, il stimule l'activité cytotoxique des macrophages. Il est induit par la stimulation des TLR qui reconnaissent les PAMP issus de bactéries (Hamaï *et al.* 2009). D'autre part nous avons étudié la sécrétion d'IL10, une cytokine immunorégulatrice. Elle est exprimée par les monocytes principalement mais aussi par les lymphocytes Th2 ainsi que les Treg. Cette cytokine permet de réguler la réponse pro inflammatoire et d'ainsi limiter les dégâts causés aux tissus afin de maintenir ou de restaurer l'homéostasie (Iyer et Cheng 2012).

b) Dosage des cytokines par la technique du multiplex

La technique du multiplex ressemble à l'ELISA couplé à la cytométrie. Il permet de quantifier et identifier simultanément plusieurs protéines (ici nos cytokines d'intérêt) dans un volume très petit. Nous avons sélectionné un kit avec des billes magnétiques spécifiques de 8 cytokines d'intérêt : TNF α , IL6, IL12p70, IL1 β , IL10, IL22, IL17a et IL23 (Biotechne, ref: 5483a990).

Le principe est de mettre en contact le surnageant de culture avec un mélange de billes qui possèdent une fluorescence différente selon l'analyte et qui sont pré coatées pour cet analyte spécifique avec un anticorps de capture. Ainsi l'anticorps se fixe aux cytokines d'intérêt. Ensuite les analytes sont biotynilés puis le couple phycoérythrine(PE)-streptavidin

est ajouté à la mixture afin de révéler les unités fixées. La lecture est effectuée sur un Bioplex 200. Cet appareil a la même fluidique qu'un cytomètre, il lit les billes l'une après l'autre en les faisant passer dans une gaine. Les billes passent devant deux lasers, l'un excitant la couleur verte du PE qui va permettre de quantifier le nombre d'analytes fixés sur la bille et l'autre qui va exciter la couleur rouge qui est associées aux billes et qui va permettre d'identifier quelle cytokine est lue (Figure 14).

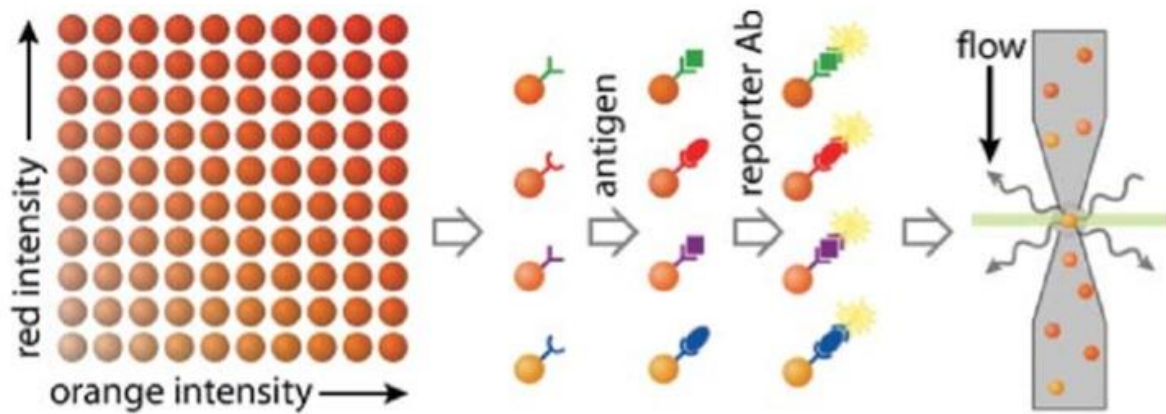


Figure 14 : Principe du Luminex : à gauche : le dégradé de rouge de chaque bille qui est associé à une cytokine, ce rouge sera reconnu lors du passage au Bioplex 200 et permettra l'identification des cytokines présentes. Puis visualisation du procédé de marquage jusqu'à la lecture.

Les cytokines suivantes sont mesurées :

Cytokines	Voies	Effets
TNFα	Secrétée principalement par les macrophages	<ul style="list-style-type: none"> - Pro-inflammatoire - Impliquée dans plusieurs processus comme la différenciation cellulaire, la prolifération, l'apoptose, le métabolisme des lipides et la coagulation - Impliquées dans plusieurs maladies auto-immunes, cancers etc.
IL6	Inflammation et maturation des lymphocytes B	<ul style="list-style-type: none"> - Pro-inflammatoire - Capable d'induire la fièvre dans les cas de maladies auto-immunes ou infection
IL12p70	Agit sur les lymphocytes T et les Natural Killer	<ul style="list-style-type: none"> - Indispensable pour la production d'IFNγ par les lymphocytes T

		- Important pour la différenciation en Th1 et Th2
IL1β	Produit par les macrophages activés comme pro protéine	- Pro-inflammatoire - Impliquée dans plusieurs processus dans l'activité cellulaire comme la différenciation, la prolifération et l'apoptose
IL10	Produit par les monocytes et quelques peu par les lymphocytes	- Effets pléiotropiques dans l'immunorégulation et l'inflammation - Diminue l'expression des cytokines de Th1, des antigènes du CMH de classe II et des molécules de costimulation des macrophages - Amélioration de la survie des lymphocytes B, de la prolifération et de la production d'anticorps - Des souris KO pour l'IL10 suggère qu'elle a un rôle immunorégulateur essentiel dans le tract intestinal
IL22	Souvent coexprimé avec l'IL17, produit par les lymphocytes T	- Soutient l'intégrité et la fonction de barrière des tissus dérivés de cellules épithéliales telles que la peau, le pancréas, le petit intestin, le colon, le foie, les poumons et les reins face à des pathogènes ou pendant une réponse auto-immune. Ceci en promouvant une prolifération épithéliale (doit être bien contrôlé) - En synergie avec d'autres cytokines telles que l'IL17 et le TNF α , elle induit l'expression de protéines antimicrobiennes impliquées dans la défense de l'hôte au niveau de la peau, des voies respiratoires et de l'intestin - Promu la production de médiateurs inflammatoires tels que l'IL6, l'IL1beta et les lipopolysaccharides-binding protein
IL17a	Produit par les lymphocytes T activés	- Pro-inflammatoire - Peut stimuler l'expression de l'IL6 - Un fort niveau d'expression est associé à des maladies chroniques inflammatoires
IL23	Produit par les lymphocytes T	- Stimule la production d'IFN γ - Agit sur les lymphocytes T CD4 mémoire

Tableau VII : Détail des cytokines lues en multiplex (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) (Rutz, Eidenschenk, et Ouyang 2013)

Plusieurs voies sont étudiées grâce à ce panel de cytokines. L'activation ou/et la différenciation de lymphocytes B, Th1, Th2, Treg et Th17 selon les cytokines produites pourront être supposées. Ceci servira pour sélectionner les bactéries qui ont différents profils inflammatoires.

c) Cytométrie

Afin de caractériser et d'identifier les cellules impliquées dans la réaction immunitaire face aux bactéries testées, les échantillons cellulaires ont été analysés en cytométrie en flux par le CytoFlex de Beckman Coulter. L'idée est de stimuler des PBMC de donneur sain avec d'une part les culots bactériens et d'autre part les surnageants. Ces culots et surnageants ont été sélectionnés grâce aux résultats du multiplex.

(1) Principe de la cytométrie en flux

Le principe de la cytométrie en flux repose sur le fait de pouvoir mesurer différentes caractéristiques d'une suspension de particules (ici des cellules) comme la taille, la forme et la complexité de celles-ci mais en plus des paramètres que l'on pourra choisir en utilisant des composés fluorescents. La suspension est aspirée par la machine et va permettre d'aligner les particules dans une gaine, celles-ci vont ensuite passer devant un laser et des détecteurs qui vont capter les signaux envoyés, il y a trois types de signaux différents :

- La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui mesure la taille des particules
- La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui indique la forme, la structure interne et la granulosité des particules
- Les signaux de fluorescence qui comprennent l'auto-fluorescence de la cellule ainsi que la fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome, ceci permettent d'observer un caractère propre à une cellule

Ensuite les données sont traitées par un système électronique et informatique. Elles sont représentées sous forme de graphiques ou d'histogrammes. Il a fallu mettre en place une stratégie d'identification des populations cellulaires d'intérêts ainsi que des cytokines exprimées (Figure 15).

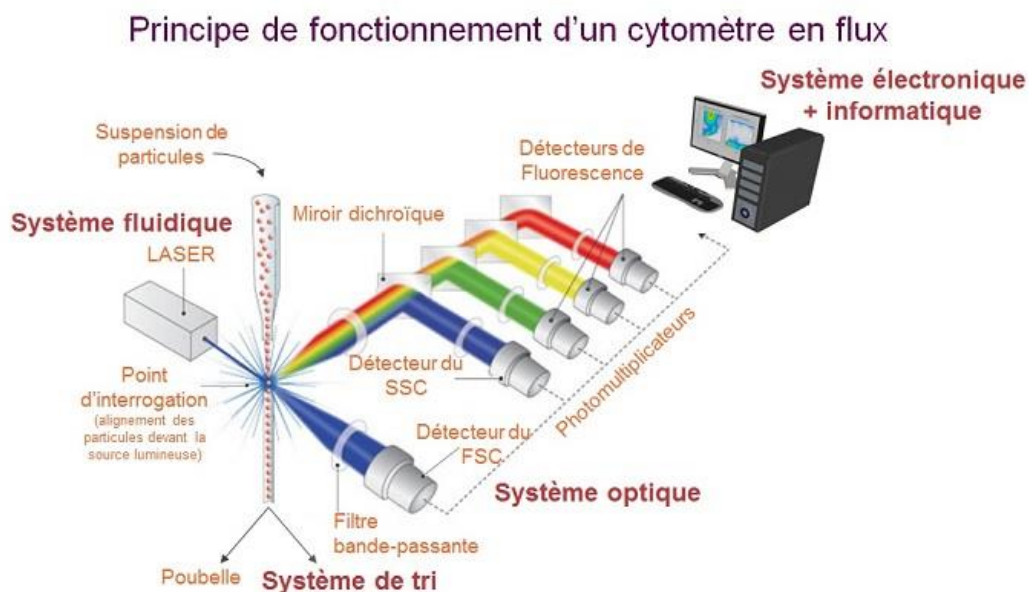


Figure 15 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

(2) Mise en place des cocktails d'anticorps

Afin de mettre en place ce protocole il a fallu réunir plusieurs critères. Tous d'abord il faut cibler les marqueurs que l'on veut identifier afin d'établir les paramètres à sélectionner pour la mise en place du protocole.

Cibles	Marqueurs
Lymphocyte T	CD3
Lymphocyte T CD8	CD8
Lymphocyte T CD4	CD4
Lymphocyte T régulateur (LTreg)	FoxP3
Lymphocyte B	CD19
Monocyte	CD14 ; CD16 ; HLA-DR
Cytokines	IFN γ ; TNF α ; IL17 ; IL22 ; IL10

Tableau VIII : Identifications des marqueurs cibles

Pour observer des cytokines, leur sécrétion dans le milieu est bloquée par l'ajout de bréfeldine A (BFA) (5µg/mL, eBioscience, ref : 00-4506-51) pendant 4h lors de la stimulation. La BFA agit en empêchant le passage des protéines du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi, ainsi elles restent dans la cellule. Pour observer le FoxP3, marqueur intranucléaire qui permet de cibler les LTreg, et les cytokines qui sont intracytoplasmique, un kit spécial est utilisé, il va perméabiliser la cellule et le noyau afin que lors du marquage les anticorps puissent accéder à leurs cibles. Il s'agit du kit d'eBioscience « Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization » (ref : 00-5521-00).

A l'instar des stimulations pour ELISA et multiplex, le couple PMA ionomycine est pris pour contrôle positif. Ce couple ne fonctionne pas sur les monocytes. 2 panels différents sont donc mis en place : l'un pour marquer les lymphocytes et l'autre pour marquer les monocytes.

Les anticorps sont donc réunis ainsi :

	Panel 1	Panel 2
Marqueurs extracellulaire	CD3 ; CD8 ; CD4 ; CD19	CD3 ; CD14 ; CD16 ; HLA-DR
Marqueurs intracellulaire/nucléaire	FoxP3 ; IFN γ ; TNF α ; IL17 ; IL22 ; IL10	IFN γ ; TNF α ; IL10

Tableau IX : Les 2 panels de cytométrie

La sélection des fluorochromes se fait en fonction de plusieurs critères. Dans un premier temps il faut vérifier les caractéristiques du cytomètre utilisé, ici ce sera le CytoFLEX de Beckman Coulter qui possède 3 lasers et donc laisse un large choix de fluorochrome. De plus il faut associer les fluorochromes les plus forts avec les antigènes les moins exprimés et les fluorochromes les moins forts avec les antigènes les plus exprimés.

Ainsi nous construisons les 2 panels suivant :

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
CD3	PE-EF610	UCHT1	eBioscience	61-0038-42

CD4	PerCP/Cy5.5	A161A1	BioLegend	357414
CD8	Brilliant Violet 421™	RPA-T8	BioLegend	301036
FOXP3	FITC	PCH101	eBioscience	11-4776-42
CD19	Brilliant Violet™ 786	SJ25C1	Becton Dickinson	563325
IL-10	PE	JES3-19F1	BioLegend	506804
IFN-γ	APC/Fire™ 750	4S.B3	BioLegend	502548
TNFA	Alexa Fluor 700	MAB11	BioLegend	502928
IL-22	APC	2G12A41	BioLegend	366706
IL-17A	PE/Cy7 anti-human	BL168	BioLegend	512315
Fixable Viability Dye	EF506	/	eBioscience	65-0866-18

Tableau X : Panel numéro 1 : LT, LB et cytokines

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
CD3	PE-EF610	UCHT1	eBioscience	61-0038-42
HLA-DR	Super bright 645	LN3	eBioscience	65-9956-42
CD14	PercP/Cy5.5	63D3	Biolegend	367110
CD16	Alexa Fluor® 647	3G8	BioLegend	302020
TNFA	Alexa Fluor 700	MAB11	BioLegend	502928
IL-10	PE	JES3-19F1	BioLegend	506804
IFN-γ	APC/Fire™ 750	4S.B3	BioLegend	502548
Fixable Viability Dye	EF506	/	eBioscience	65-0866-18

Tableau XI : Panel numéro 2 : monocytes et cytokines

Les 2 panels ont été déterminés, le panel lymphocyte et le panel monocyte. Grâce à ces panels, la réponse inflammatoire de différents groupes cellulaires face à nos bactéries d'intérêt a pu être observée.

(3) Stratégie de stimulation

Les PBMC sont stimulés avec la même concentration bactérienne que lors des stimulations précédentes. Deux durées de stimulation sont effectuées : 6h et 18h afin d'observer les cytokines relarguées sur courte et longue durée. Dans les deux cas, la PMA, la ionomycine et la BFA sont mis dans les 4 dernières heures. Dans chaque cas un puits non stimulé est conservé comme témoin négatif. Les conditions sont donc les suivantes :

- +/- culots ou surnageants bactérien
- +/- PMA (50ng/mL) ionomycine (1µg/mL)
- 6h ou 18h de stimulation bactérienne

Dans tous les cas il y a de le BFA (5µg/mL) pour observer les cytokines non excrétées par la cellule.

(4) Stratégie d'identification des populations

Systématiquement les cellules sont d'abords observées sur leurs « taille-structure », puis les doublets sont exclus. Ensuite le marqueur de viabilité Fixable viability Dye permet d'exclure les cellules mortes.

Le panel lymphocyte permet d'identifier les LT, LB et LTreg, la stratégie de sélection de ces cellules est présentée dans la Figure 16.

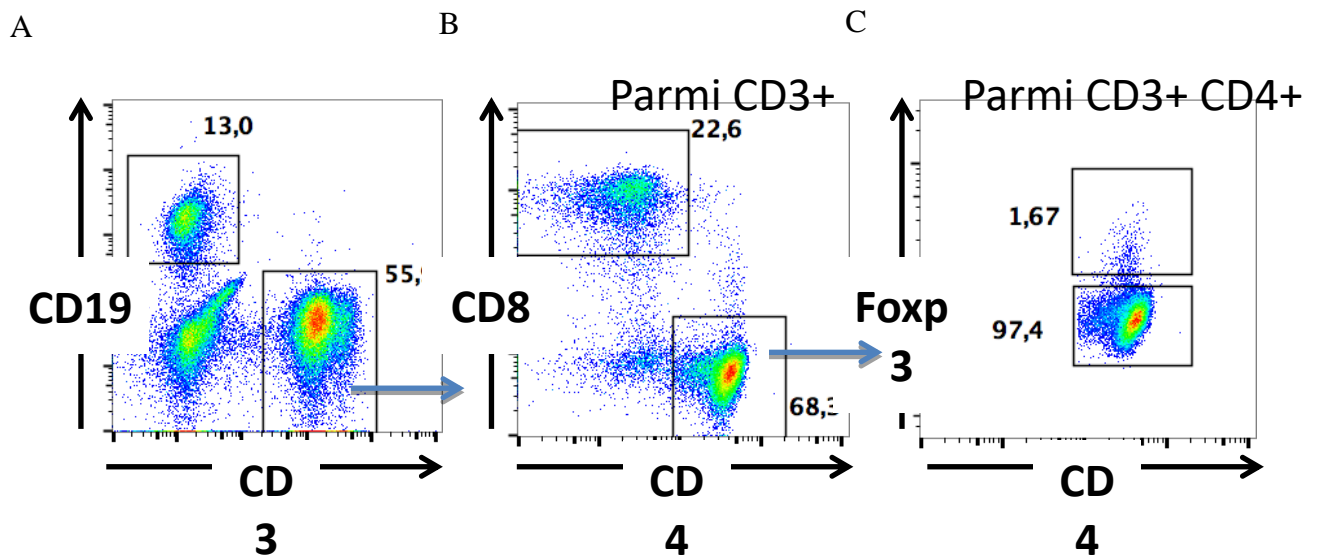


Figure 16 : Stratégie de sélection des cellules lymphocytaires dans les PBMC

Les cellules sont marquées (A) CD19+ pour les LB et CD3+ pour les LT, (B) Parmi les CD3+, les CD8+ sont les LT cytotoxiques et les CD4+ les LT auxiliaires, (C) Parmi les CD3+CD4+, les FoxP3+ sont les LTreg

Le panel monocyte permet d'identifier les groupes monocytes/macrophages et cellules dendritiques (Figure 17)

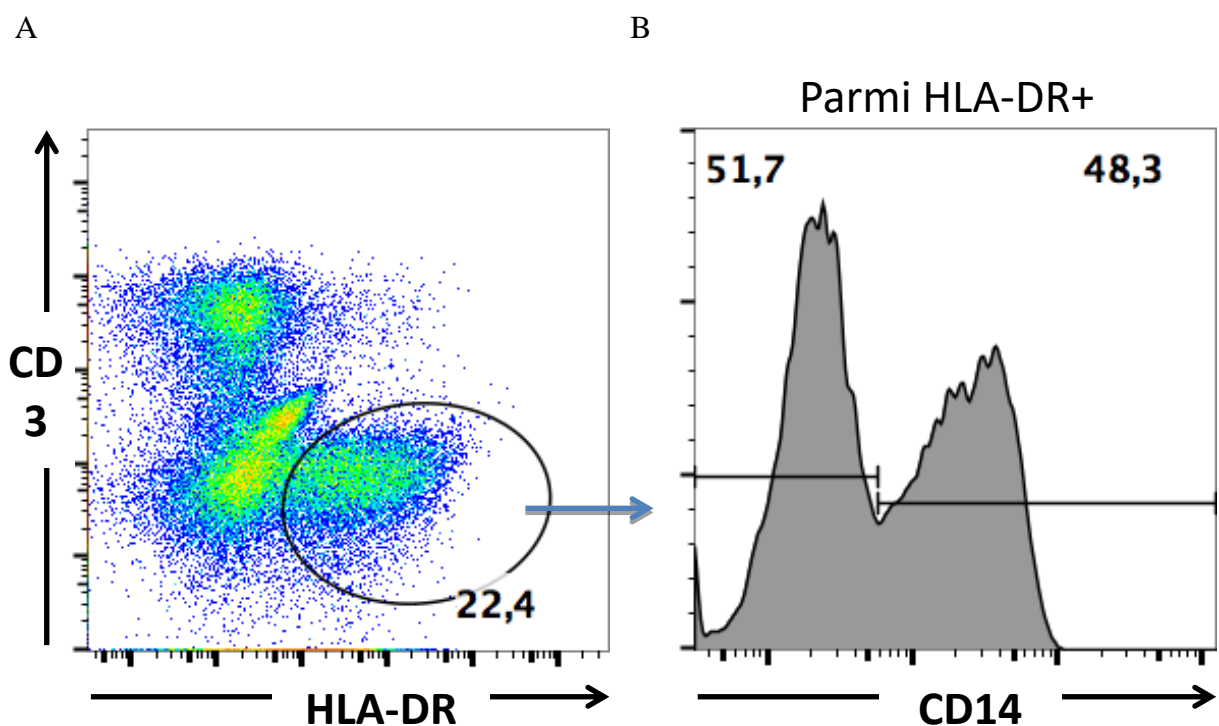


Figure 17 : Stratégie d'identification des populations de monocytes, macrophages et cellules dendritiques

(A) Les cellules sont sélectionnées en étant CD3-/HLA-DR+ puis (B) parmi les HLA-DR+ sélection des CD14- pour les cellules dendritiques des CD14+ pour cibler les monocytes macrophages

Partie IV - Résultats

Chapitre 1 : Etude des composants bactériens sur la production cytokinique des PBMC

En compilant des bactéries de librairies et les bactéries isolées d'un microbiote intestinal humain sain par Chantal Bridonneau à Micalis, un arbre phylogénétique a été construit. Celui-ci a permis de sélectionner 65 bactéries représentatives des grands groupes bactériens parmi les 121 à disponibilité. Ensuite la réponse des PBMC face à la stimulation bactérienne est étudiée. Pour ce faire, un test fonctionnel *in vitro* est mis en place, celui-ci va nous permettre d'observer l'activité des composants bactériens. Le test ELISA permet de faire un premier descriptif brut en observant une cytokine pro inflammatoire (TNF α) et une cytokine anti inflammatoire (IL10). Chaque bactérie, culot et surnageant, est testée sur 5 donneurs pour amoindrir la variabilité d'expression entre les donneurs et en duplicata. Ce ne sont pas les 5 mêmes donneurs pour toutes les bactéries car le volume de sang est limité par l'EFS et il n'y a donc pas assez de cellules pour tous tester.

1.1) Optimisation de la stimulation des PBMC par les culots et surnageants bactériens

Il faut normaliser l'étude afin que les résultats soient comparables, nous fixons la quantité de cellules à 180 000 cellules par puits, cette quantité sera la même pour tous les tests.

Afin d'obtenir les conditions optimales de stimulation, 3 concentrations différentes de surnageants bactériens et de culots bactériens ont été testées, en effet une trop forte concentration peut tuer les cellules et une trop faible concentration ne va pas induire de production :

- Pour les surnageants nous avons testé 2, 5 et 10% dans le milieu de culture.
- Pour les culots nous avons testé 10^5 , 10^6 et 10^7 équivalent CFU/mL. Le dénombrement a été effectué au préalable sur colonies vivantes, nous savons donc la quantité de bactéries congelées et nous effectuons les dilutions pour ajuster à la concentration voulue au PBS 1X.

Les mesures d'IL10 et de TNF α ont ensuite été faites par ELISA, les concentrations de stimulation qui induisaient une production de cytokine suffisante ont été sélectionnées, en effet les plus basses concentrations de stimulation n'induisent pas ou très peu de cytokines. Les valeurs : 10% pour les surnageants et 10⁷ CFU/mL pour les culots ont été choisies car ce sont celles qui donnent des résultats plus interprétables à l'analyse. Les tests sont réalisés avec les mêmes pourcentages de milieux contrôles.

1.2) Réponse à la stimulation

Nous choisissons deux cytokines représentatives pour une première description brute, le TNF α comme cytokine pro inflammatoire et l'IL10 comme cytokine anti inflammatoire. Les résultats représentent le dosage de chacune d'elle pour culots puis surnageants, une autre représentation montre le ratio IL10/TNF α qui est un ratio employé dans la littérature afin de montrer un potentiel pro-inflammatoire ou régulateur. Plus le ratio est élevé, plus la bactérie détient un potentiel régulateur.

Chaque graphique concerne d'une part le TNF α puis d'autre part l'IL10 avec une mise en comparaison des culots et surnageants bactériens. Cette première approche permet d'effectuer un premier descriptif et de sélectionner les bactéries dont l'effet a été évalué par la technique du Multiplex et par cytométrie en flux.

a) *Etude de la production de TNF α*

La stimulation par les culots bactériens va montrer la réponse des PBMC face aux composants de surface bactériens. Les bactéries sont mortes et congelées donc la réponse face aux composés intracellulaires peut aussi être observée car la congélation lyse les bactéries. Les culots bactériens sont re suspendus dans du PBS et incubés sur les PBMC a une concentration de 10⁷équivalent CFU/mL. Le PBS est utilisé comme contrôle.

Les surnageants bactériens contiennent ce que les bactéries ont produits et secrétés pendant le temps de la culture. Ils ont été filtrés avant utilisation, ils sont ainsi dépourvus de bactérie. Ces surnageants sont utilisés à une concentration de 10% dans le milieu de culture

des PBMC. Les contrôles utilisés sont les milieux de cultures bactériens correspondant utilisés eux aussi à 10%.

La Figure 18 montre la production de TNF α lors de la stimulation par les culots bactériens. Cette expérience est faite sur 5 donneurs sains ainsi qu'en duplicata. Le graphique représente la médiane ainsi que le minimum et le maximum des valeurs mesurées. L'identification des phyla est effectuées par un code couleur l'orange représente les Actinobacteria, le vert les Bacteroidetes, le violet les Firmicutes et le rouge les Proteobacteria. Tous les autres graphiques sont basés sur le même code couleur et sur les mêmes conditions expérimentales.

Les culots bactériens induisent une très forte production de TNF α allant jusque 6000pg/mL. Les Bacteroidetes semblent en produire moins que les autres phyla. Les Firmicutes semblent produire majoritairement plus de TNF α mais nous observons beaucoup plus de spécimen que les Actinobacteria et les Proteobacteria.

La Figure 19 représente la stimulation des PBMC par les surnageants de culture bactérienne. En comparaison à la stimulation par les culots bactériens, la production de TNF α est très nettement inférieure. Elle va jusque 600 pg/mL, dix fois inférieur aux culots. Il n'y a pas de différence notable entre les phyla ou les bactéries.



Figure 18 : Production de TNF α (pg/mL) par les PBMC suite à une stimulation par les culots

Les stimulations par les culots bactériens sont effectuées en duplicata sur PBMC totaux de donneurs sains issus de l'EFS (n=5) pendant 24h. Nous pouvons voir sur l'axe des ordonnées le nom des culots bactériens et en abscisse la concentration des cytokines en pg/mL. Les phyla sont identifiés par des couleurs différentes et indiqués par leurs noms (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria). La représentation indique la médiane, le minimum et le maximum des valeurs.

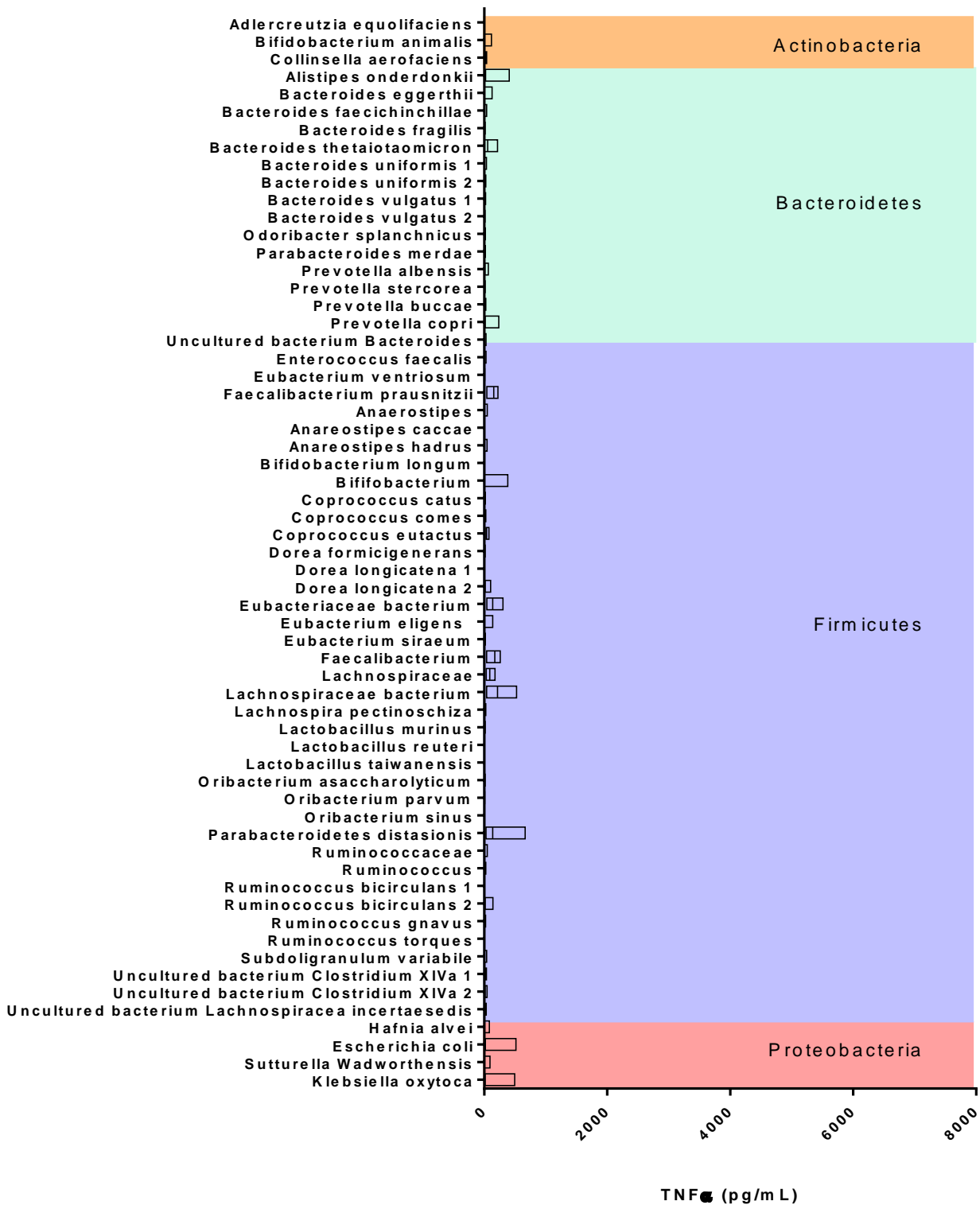


Figure 19 : Production de TNF α (pg/mL) par les PBMC suite à une stimulation par les surnageants

Les stimulations par les surnageants bactériens sont effectuées en duplicata sur PBMC totaux de donneurs sains issus de l'EFS (n=5) pendant 24h. Nous pouvons voir sur l'axe des ordonnées le nom des culots bactériens et en abscisse la concentration des cytokines en pg/mL. Les phyla sont identifiés par des couleurs différentes et indiqués par leurs noms (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria). La représentation indique la médiane, le minimum et le maximum des valeurs.

b) Etude de la production d'IL10

Chez les culots bactériens (Figure 20), la production d'IL10 est extrêmement variable au niveau des bactéries ainsi qu'à l'échelle des phyla. Une concentration plus faible est tout de même observée dans les phyla Actinobacteria et Firmicutes. Il semble que la production d'IL10 est plus forte chez les Bacteroidetes. La plupart des bactéries font produire environ 500 pg/mL et quelques-unes se démarquent avec une production de 1500pg/mL comme *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella copri*, *Ruminococcus gnavus* et *Suturella wadsworthensis*.

Les surnageants bactériens (Figure 21) montrent une production nettement inférieure d'IL10. Elle va de quelques dizaines de pg/mL jusque 500 pg/mL maximum, hormis *Suturella wadsworthensis* qui fait produire environ 1000 pg/mL.

Le faible taux de production des cytokines nous indique qu'il aurait fallu concentrer plus fortement les surnageants lors de la stimulation mais cela est impossible. En effet les surnageants sont composés du milieu de culture bactérien et au-delà de 10% cela devient toxique pour les PBMC. Nous décidons donc que les surnageants bactériens ne sont pas optimales pour poursuivre notre étude.

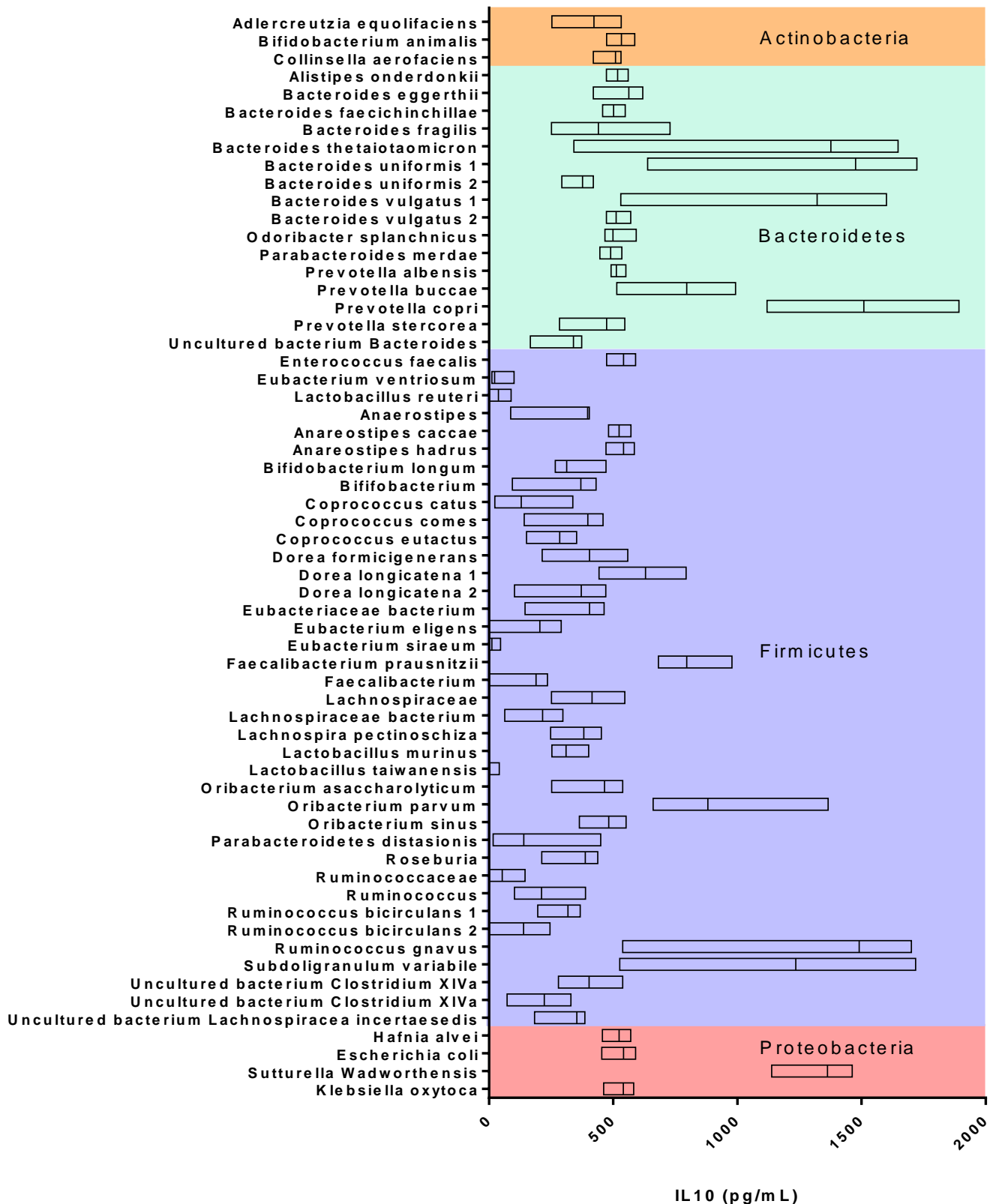


Figure 20 : Production d'IL10 (pg/mL) par les PBMC suite à une stimulation par les culots

Les stimulations par les culots bactériens sont effectuées en duplicata sur PBMC totaux de donneurs sains issus de l'EFS (n=5) pendant 24h. Nous pouvons voir sur l'axe des ordonnées le nom des culots bactériens et en abscisse la concentration des cytokines en pg/mL. Les phyla sont identifiés par des couleurs différentes et indiqués par leurs noms (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria). La représentation indique la médiane, le minimum et le maximum des valeurs.

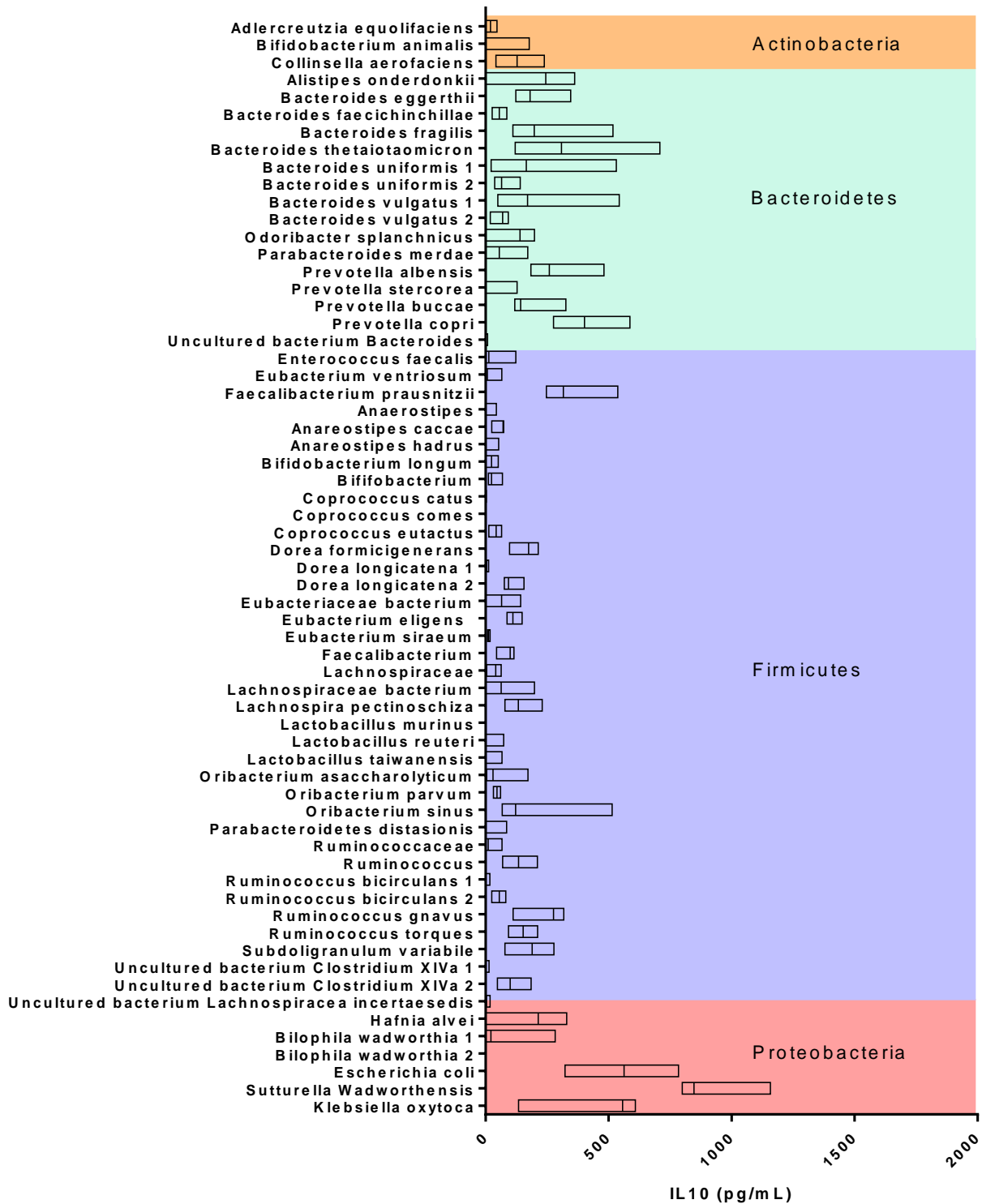


Figure 21 : Production d'IL10 (pg/mL) par les PBMC suite à une stimulation par les surnageants

Les stimulations par les culots bactériens sont effectuées en duplicata sur PBMC totaux de donneurs sains issus de l'EFS (n=5) pendant 24h. Nous pouvons voir sur l'axe des ordonnées le nom des culots bactériens et en abscisse la concentration des cytokines en pg/mL. Les phyla sont identifiés par des couleurs différentes et indiqués par leurs noms (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria). La représentation indique la médiane, le minimum et le maximum des valeurs.

c) *Ratio immunorégulateur*

Afin d'interpréter la capacité immunorégulatrice des bactéries, la Figure 22 nous montre le ratio de l'IL10/TNF α , ratio employé dans la littérature (Dopheide *et al.* 2015). Cette représentation indique le ratio des culots bactériens sélectionnés pour la suite de l'étude. Le choix des bactéries s'est porté sur les bactéries représentatives des différents types d'inflammations : pro inflammatoire, immunorégulatrices et où il semble y avoir un équilibre entre les deux cytokines. Aucune bactérie représentative des Actinobacteria n'a été choisie car elles ne produisent pas de TNF α ni d'IL10 en quantité importante. Les Bacteroidetes semblent avoir un potentiel plus immunorégulateur que les autres phyla. Nous en avons sélectionné 7 en choisissant ceux qui induisent une forte production d'IL10. Les Firmicutes sélectionnés sont représentatifs d'une forte expression des deux cytokines, ils semblent plutôt pro-inflammatoires. Pour finir un Proteobacteria a été sélectionné : *Sutturella wadsworthensis* qui semble montrer un profil immunorégulateur. Il y a une majorité de Bacteroidetes et de Firmicutes car ce sont les phyla majoritairement présent dans le microbiote.

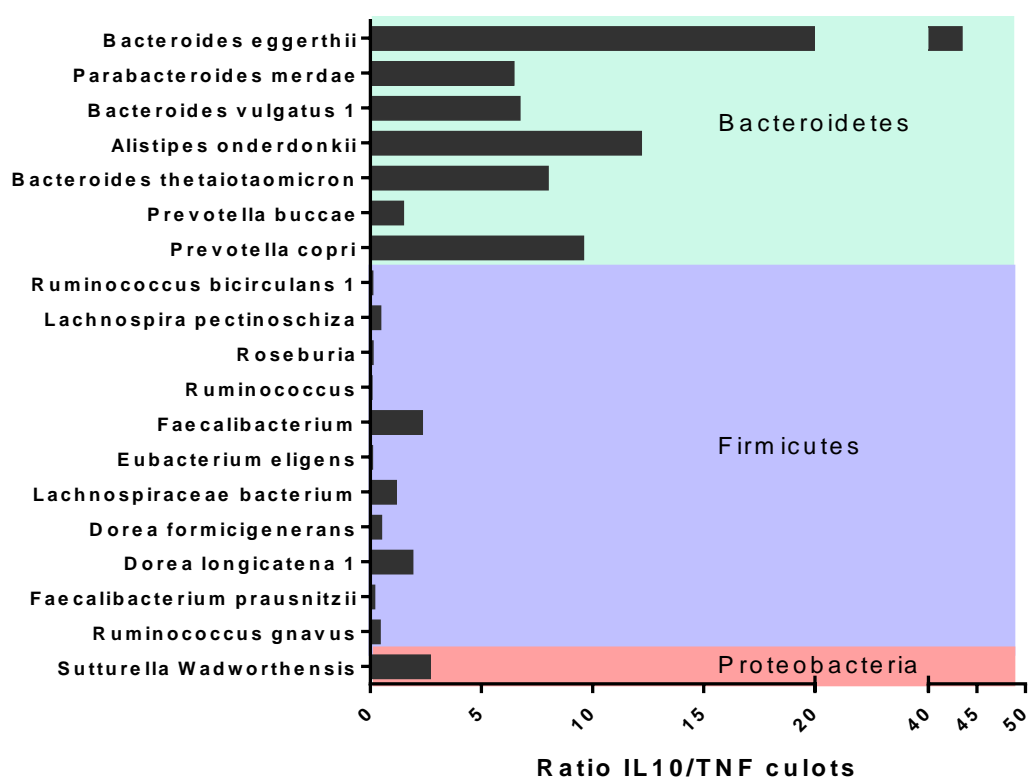


Figure 22 : Ratio IL10/TNF α induit par les culots bactériens sélectionnés pour la suite de l'étude

Chapitre 2 : Etude approfondie de la production de cytokines par Luminex

Des culots bactériens ont été choisis pour être étudiés de manière plus approfondie. Le choix s'est porté sur ceux qui induisent une très forte réponse des PBMC qu'elle soit pro-inflammatoire ou non, ceux qui induisent une réponse immunorégulatrice après l'observation du ratio IL10/TNF α et pour finir certains culots bactériens ayant une réponse moyenne. Nous avons exclu du suivie les bactéries n'induisant pas de réponse.

A présent, l'utilisation du Luminex va permettre d'étudier de manière plus approfondie la réponse des cellules face à la stimulation. Ainsi il pourra être déterminé de manière plus fine quel type de réponse est induit par les culots. Le Luminex sélectionné montre le niveau d'expression de 8 cytokines différentes : TNF α , IL6, IL12p70, IL1 β , IL10, IL22, IL17 et IL23. Le panel de cytokine étudié permet d'étudier plusieurs voies de l'inflammation. Dont les voies des Th1, Th17 et Treg. Il a été montré que l'IL17 et l'IL22 sont impliqués dans plusieurs maladies chroniques tel que la maladie de Crohn (Wolk *et al.* 2007), c'est pourquoi il est intéressant d'observer si cette voie est mobilisée lors de la stimulation par les culots bactériens isolés du microbiote intestinal.

2.1) Etude de la production des cytokines induite par les culots bactériens

Dans un premier temps, l'analyse de la sécrétion de TNF α et d'IL10 concorde avec les ELISA, ils ne sont pas montrés ici.

Ensuite, les niveaux d'IL17 et d'IL22 secrétés sont extrêmement bas, de l'ordre de 0 à 20 pg/mL, il a été montré que le taux d'IL17 physiologique était de 125 pg/mL pour un adulte sain (Kleiner *et al.* 2013), ces taux ne sont donc pas relevant. De plus il n'y a pas de différence qui se dessine entre les culots bactériens, ces deux cytokines ne sont donc pas montrées en graphique.

L'IL6 et l'IL1 β sont impliqués dans la phase aigüe de l'inflammation. Sur la Figure 23, certaines bactéries induisent la sécrétion de ces deux cytokines conjuguées comme *Dorea longicatena*, *Sutarella wadsworthensis*, *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii*. D'autres bactéries induisent uniquement l'IL6 comme *Alistipes onderdonkii*, *Prevotella buccae*, *Parabacteroides merdae* et *Ruminococcus gnavus*. L'IL6 en combinaison avec le TGF β (non observé) induit la différenciation des CD4 en Th17 et inhibe celle en Treg, ainsi l'IL6 est aussi responsable du déséquilibre Th17/Treg qui est considéré comme le facteur de développement des maladies inflammatoires chroniques (Tanaka, Narazaki, et Kishimoto 2014).

D'un autre côté l'IL12p70 est observée, elle n'est presque pas exprimée hormis de l'ordre de la centaine de pg/mL chez *Ruminococcus gnavus*, *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii*. C'est une cytokine qui induit les Th1.

Chez *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii*, l'IL23 est aussi très fortement exprimée, elle est retrouvée en plus faible concentration chez *Roseburia*. En association avec l'IL6 et le TGF β , l'IL23 induit la différenciation des CD4 en Th17. Ces trois cytokines sont retrouvées lors de la stimulation par *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii* ce qui pourrait indiquer une induction des Th17 mais ces bactéries font aussi exprimer très fortement le TNF α et l'IL10, peut être qu'elles sur activent simplement toutes les cellules qui relarguent toutes leurs cytokines.

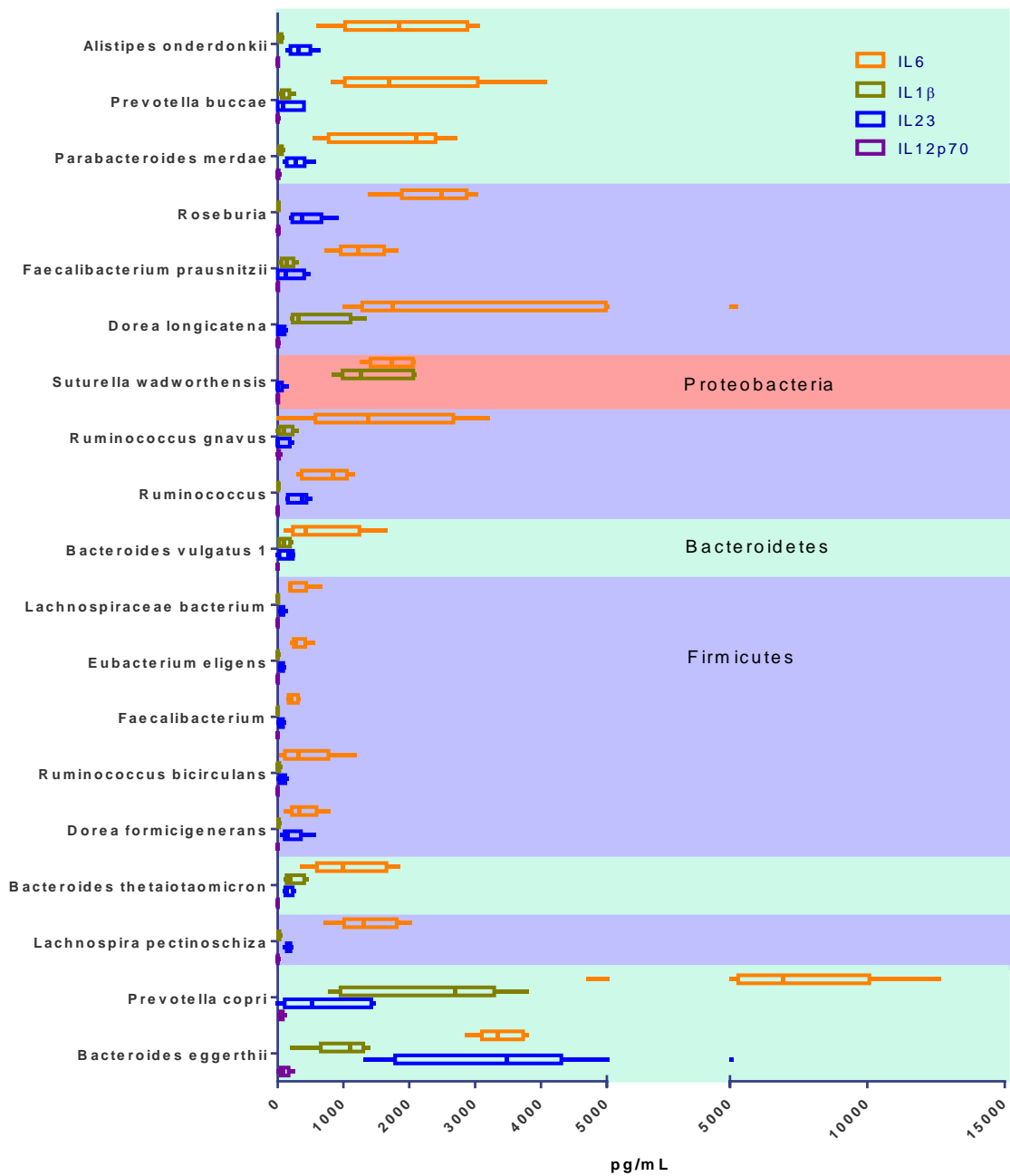


Figure 23 : Etude de la production des cytokines IL6, IL1β, IL23 et IL12p70 par les PBMC lors de la stimulation par les culots bactériens

Les stimulations par les culots bactériens sont effectuées en duplicata sur PBMC totaux de donneurs sains issus de l'EFS (n=5) pendant 24h. Nous pouvons voir sur l'axe des ordonnées le nom des culots bactériens et en abscisse la concentration des cytokines en pg/mL. Les phyla sont identifiés par des couleurs différentes et indiqués par leurs noms (Protéobactéries, Firmicutes, Bacteroidetes). La représentation indique la médiane, le minimum et le maximum des valeurs.

Le Luminex nous montre divers profils d'expression cytokinique face aux culots bactériens. Nous pouvons observer que *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii* sont très immunostimulantes. Ces culots font exprimer très fortement toutes les cytokines à part l'IL22 et l'IL17. On note que les bactéries choisies dans le phylum des Bacteroidetes et la

Protéobactérie *Sutarella wadsworthensis* semblent induire plus d'IL10 que de TNF α . Ils induisent aussi de l'IL6 en grande quantité qui est représentatif de la voie des Th17 s'il est associé à l'IL23 (comme *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii*), par ailleurs s'il est associé à la production d'IL1 β , il est plutôt représentatif de la phase aigüe de l'inflammation (comme *Sutarella wadsworthensis* et peut être *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii*). Il est difficile de statuer sur ces deux bactéries largement immunostimulantes. D'autres parts nous observons que *Ruminococcus gnavus* active fortement l'IL10 et le TNF α . La plupart des autres bactéries ne produisent pas d'inductions spécifiques.

2.2) Sélection des bactéries à étudier

Afin de décrire les bactéries induisant une forte production de cytokine, les résultats obtenus par Luminex sont représentés sous la forme de heatmap à partir du logiciel R. Ce type de représentation décrit de manière quantitative la concentration de cytokine produite par les PBMC suivant la stimulation de bactérie spécifique. L'ajout de dendrogrammes aux heatmap permet d'évaluer les relations entre les productions de cytokines d'une part et les bactéries d'autre part.

La heatmap présentée Figure 24 décrit la production de cytokine à la suite de la stimulation de PBMC issus de donneurs sains.

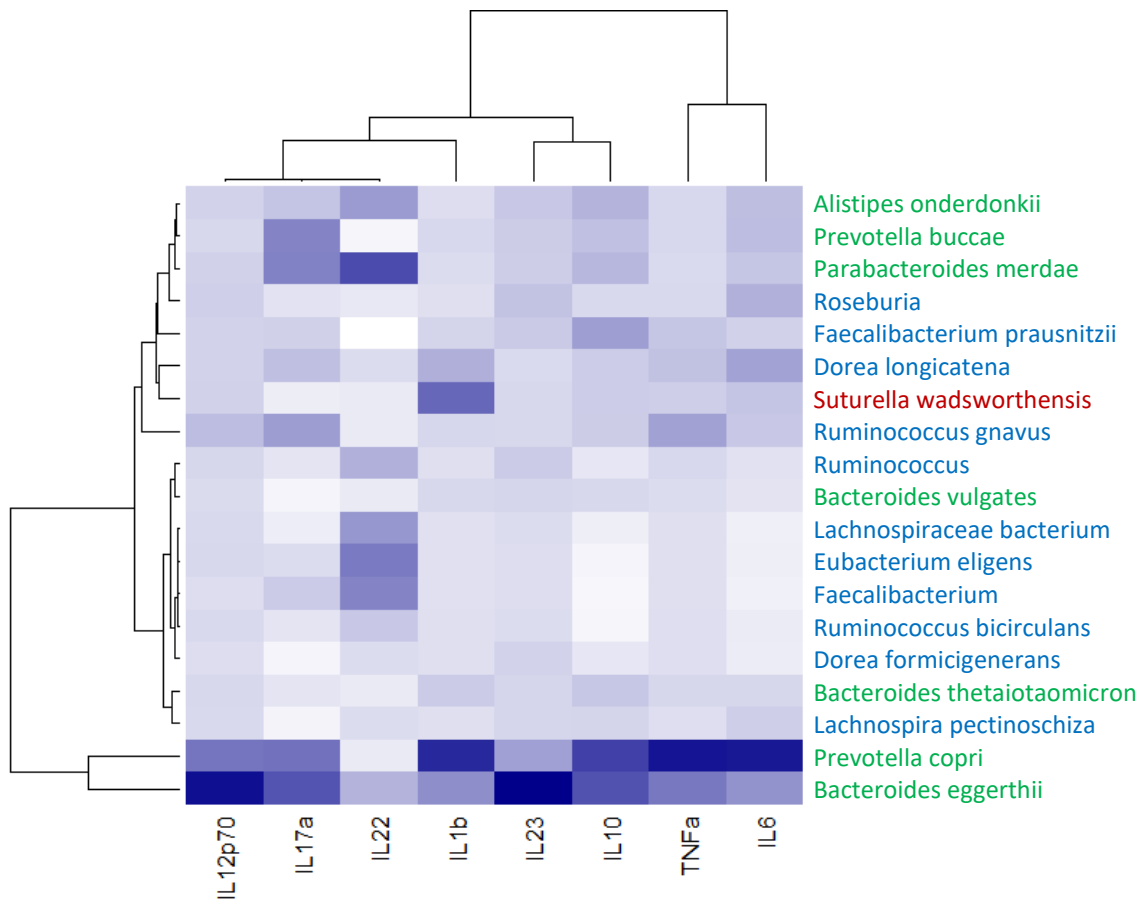


Figure 24 : Représentation Heatmap de la production de cytokine induite par les culots bactériens

Les cytokines ont été analysées par Luminex suite à la stimulation par les culots bactériens de PBMC issus de donneurs sains (n=5) pendant 24h. A droite de la carte se trouvent les noms des bactéries, en bas les cytokines analysées. Le bleu va du clair au foncé, le clair pour une faible expression et le foncé pour une forte expression. Le code couleur du nom des bactéries est : vert pour le phylum des Bacteroidetes, bleu pour le phylum des Firmicutes et rouge pour le phylum des Proteobacteria.

Dans un premier temps les bactéries *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii* sont sélectionnées pour l'étude en cytométrie car elles stimulent très fortement la production de toutes les cytokines hormis l'IL22 et l'IL17. De plus *Ruminococcus gnavus* est choisie car elle semble avoir un profil pro-inflammatoire avec sa forte activation de l'IL12p70 et du TNFa. Ensuite *Lachnospira pectinoschiza* est sélectionnée car elle semble activer la plupart des cytokines en moyenne intensité et représente une bactérie type. *Roseburia*, elle, va activer l'IL6 et l'IL23 et pour finir *Parabacteroides merdae* induit beaucoup d'IL10 et pourrait avoir un profil immunorégulateur. Ces résultats nous ont donc mené à tester les culots bactériens *Prevotella copri*, *Bacteroides eggerthii*, *Lachnospira pectinoschiza*, *Ruminococcus gnavus*,

Roseburia et *Parabacteroides merdae* afin d'effectuer une stimulation de PBMC et d'observer quelles cellules sont impliquées dans la réponse.

Le Luminex nous a permis de faire un descriptif plus approfondi de la réaction des PBMC totaux face aux culots bactériens, ils concordent avec les résultats ELISA. De manière globale les bactéries sont plus immunostimulantes qu'immun régulatrices. Dans le cas de *Prevotella copri* et *Bacteroides eggerthii* l'activation doit être tellement forte que toutes les cellules relarguent leurs cytokines, on ne peut donc pas dissocier la réponse, c'est pourquoi il est intéressant d'observer celle-ci en cytométrie en flux.

Chapitre 3 : Etude des populations cellulaires stimulées par cytométrie en flux

Seuls les culots bactériens sont exploités, en effet les expressions cytokiniques suite à la stimulation par les surnageants bactériens sont basses et n'indiquent pas de différences remarquables. La stimulation bactérienne a été effectuée sur PBMC totaux pendant 6h et 18h. Ce sont les culots de *R gnavus*, *B eggerthii*, *P merdae*, *L pectinoschiza*, *Roseburia* et *P copri* qui sont testés. Dans un premier temps les populations de monocytes/macrophages identifiées par les marqueurs HLA-DR et CD14 sont observées. La lecture se fait sur un CytoFlex. 6 donneurs de sang issus de l'EFS ont été testés, ce sont des donneurs différents à 6h et 18h.

3.1) Population monocytaire

Dans un premier temps, on observe sur la Figure 25 une diminution de la population HLA-DR+/CD14+ lors d'une stimulation avec *Ruminococcus gnavus* et *Prevotella copri*. Il a déjà été constaté qu'une diminution de cette population se produisait suite à une inflammation systémique (O. Y. Kim *et al.* 2010). Afin de confirmer ces résultats il faudrait refaire cette étude en effectuant un dénombrement des cellules avant et après marquage. En effet cette diminution de population peut être due à une perte de cellules lors de la technique de marquage.

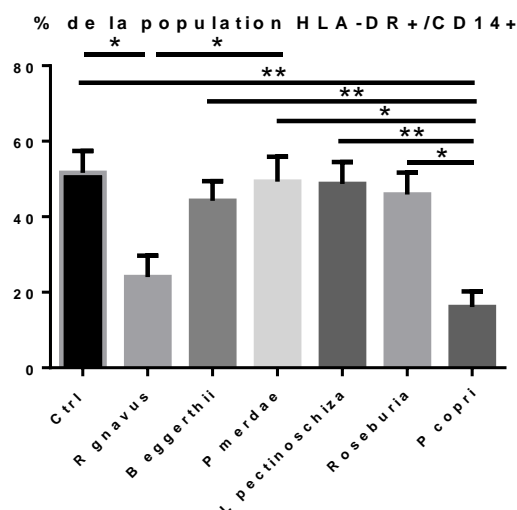


Figure 25 : Diminution de la population HLA-DR+/CD14+ lors de la stimulation par les culots bactériens *R gnavus* et *P copri*.

La mesure est effectuée au CytoFlex sur n=6, analyse sur Kaluza et FlowJo. Test statistique ANOVA une voie (* P<0.05 ; ** P<0.01 ; *** P<0.001 ; **** P<0.0001)

3.2) Production de cytokines par les monocytes

Il est intéressant d'étudier l'expression de TNF α par les cellules. En effet les culots bactériens vont activer la voie NF- κ B en activant les TLR par leur LPS. Cette voie va induire du TNF α qui est une cytokine pro-inflammatoire. On note que tous les culots bactériens testés vont induire très fortement le TNF α chez les HLA-DR+/CD14+ à 6h de stimulation, on observe même une expression légèrement plus prononcée lors de la stimulation avec *R gnavus*. *B. eggerthii* et *P. merdae* ont une production moins forte de TNF α (Figure 26 A). A 18h d'incubation *R gnavus* fait produire encore du TNF α , il y a aussi une très légère production par les cellules stimulées par *P. copri* (Figure 26 B).

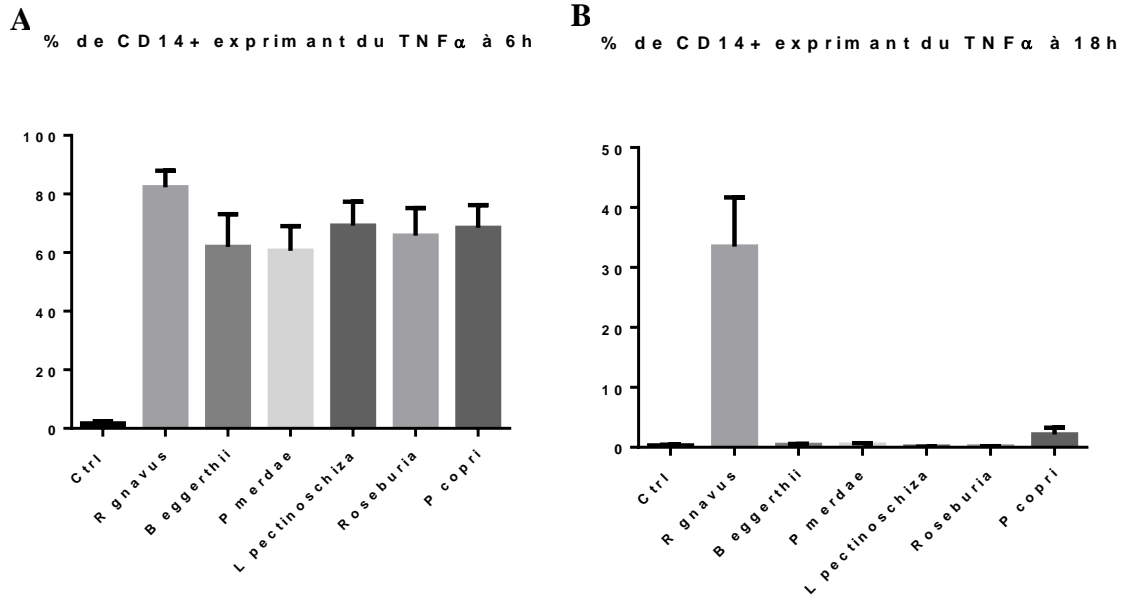


Figure 26 : Production de TNFα par les populations CD3-/HLA-DR+/CD14+

Les PBMC totaux (n=6) ont été stimulés par les culots bactériens pendant 6h et 18h. La mesure du pourcentage de cellule exprimant le TNFα a été effectuée au CytoFlex. En (A) TNFα chez monocytes/macrophages CD14+ à 6h. En (B) TNFα chez les monocytes/macrophages CD14+ à 18h. Mesure effectuée sur le CytoFlex, analyse sur Kaluza et FlowJo.

Dans le panel de couleur de cytométrie nous observons aussi l'IL10 qui est une cytokine immunorégulatrice possédant plusieurs effets dont celui de réguler les cytokines pro-inflammatoires. L'IL10 n'est pas ou très peu observée lors de la stimulation.

L'étude sur les lymphocytes n'a montrée aucune information relevante. En effet les LT doivent être activés par les cellules présentatrices d'antigènes, cette réaction n'a sans doute pas le temps de se faire dans les conditions expérimentales.

Partie V - Discussion et perspectives

L'objectif de l'étude était d'évaluer l'effet des différents membres du microbiote intestinal humain sur le système immunitaire et particulièrement d'identifier les bactéries induisant un profil pro-inflammatoire ou immunorégulateur. Pour ce faire nous avons exploré 120 bactéries issues d'une part des bibliothèques ATCC et DSMZ et d'autre part d'un microbiote humain sain. Ces bactéries ont été prélevées, isolées et identifiées par le laboratoire Micalis. Pour des raisons de praticabilité et de coût nous avons pris le parti de faire une sélection en entonnoir des micro-organismes pour lesquels l'exploration des profils inflammatoires sera effectuée. D'autre part nous avons choisi un système simplifié qui consiste en la mise en contact des culots et surnageants bactériens avec des PBMC de donneurs sains. Ces cellules sont choisies pour observer la réponse immunitaire dans sa globalité avec les interactions qu'il peut y avoir entre les différents groupes cellulaires.

Nous avons ainsi observé que la plupart des culots bactériens induisent une forte production de TNF α , surtout chez les Firmicutes. Cette production est moins importante chez les Bacteroidetes. Les culots induisent aussi une forte production d'IL10, celle-ci est plus importante chez les Bacteroidetes et plus faible chez les Firmicutes. On observe très peu d'induction par les surnageants bactériens.

La production d'IL17 et d'IL22 n'est pas observée, le temps de stimulation est peut-être trop court pour permettre aux Th17 de se différencier et/ou de s'exprimer. *D longicatena*, *S wadsworthensis*, *P copri* et *B eggerthii* font produire des cytokines de l'inflammation aiguë comme l'IL6 et l'IL1 β . De plus *P copri* et *B eggerthii* font aussi produire beaucoup d'IL23, associée à l'IL6 ceci peut théoriquement induire la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th17. Ces deux bactéries ainsi que *R gnavus* induisent de l'IL12p70 qui est classiquement une cytokine Th1. *P copri* et *B eggerthii* font produire beaucoup de cytokines de façon très forte, la production n'est peut-être pas spécifique.

En cytométrie nous observons une diminution de la population des monocytes lors de la stimulation pendant 6h avec *R gnavus* et *P copri*, ceci est signe d'une inflammation systémique (O. Y. Kim *et al.* 2010). Nous observons aussi que toutes les bactéries font exprimer du TNF α par les monocytes à 6h et que *R gnavus* est la seule à poursuivre cette induction à 18h de stimulation. *R gnavus* semble apparaître comme étant une bactérie particulièrement pro-inflammatoire.

Chapitre 1 : Les surnageants induisent peu la production de cytokines

Nous avons observé que les surnageants bactériens induisent une très faible production de cytokines par rapport à l'effet des culots. Cela pourrait s'expliquer par une abondance plus faible en PAMPs dans les surnageants par rapport aux culots bactériens ; ces molécules stimulant les TLR, NOD et autres récepteurs de l'immunité innées présents sur les cellules immunitaires des PBMC et ainsi activant les voies de l'inflammation dont NF- κ B, aboutissant à la production de cytokines.

L'induction de l'IL10, bien que plus faible qu'en cas de stimulation avec les culots bactériens était tout de même présente après stimulation avec certains surnageants de Bacteroidetes et de Proteobacteria. Ces résultats nous apprennent aussi que les métabolites microbiens, produits lors de la croissance bactérienne et présents dans le surnageant, ne sont probablement pas impliqués seuls dans l'activation des cellules immunes. Cela n'exclut pas la possibilité que ces métabolites modulent la réponse immune, ce qui pourrait être exploré en co-traitant des cellules immunitaires avec des stimulants chimiques définis (comme des agonistes de TLR par exemple) en présence ou absence de surnageant bactérien. D'autre part, une stimulation à concentration plus élevée ou sur une durée plus longue pourraient aussi être envisagée. Les surnageants bactériens sont constitués du milieu de culture bactérienne qui ne possède pas les mêmes apports que le milieu de culture cellulaire, au-delà de 10% cela devient néfaste pour la culture des PBMC et la réponse pourrait être due à la toxicité du milieu. Une solution pourrait être de purifier différents composants du surnageant par des méthodes biochimiques avant de tester leurs effets.

Ces pistes n'ont pu être poursuivies dans le cadre de la présente étude et la suite des travaux se sont concentrés sur les culots bactériens.

Dans la littérature, le surnageant de certaines bactéries ont pourtant montré des effets sur des cellules immunitaires. C'est le cas du surnageant de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (Bermudez-Brito *et al.* 2013a). Cependant les effets de celui-ci ont été testés sur des cellules dendritiques apparentées aux cellules dendritiques intestinales. En effet celles-ci n'ont pas les mêmes propriétés face aux bactéries que les cellules circulantes. Dans cette étude, les auteurs ont testé le surnageant de culture bactérienne en co-culture avec une bactérie

immunostimulante : *Salmonella enterica* serovar *Typhi* CECT 725. Cette bactérie seule induit la production de cytokines pro-inflammatoires (IL12p70, IL12p40, IL6, IL1 β et IL8). La co-culture de *S typhi* et du surnageant de *B breve* induit une production beaucoup moins importante de ces cytokines. D'autre part, cette co-culture augmente la production d'IL10. Ces effets sont médiés uniquement par le surnageant, en effet, lorsque les auteurs co-incubent *S Typhi* et *B breve*, il y a une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires (Bermudez-Brito *et al.* 2013b). Dans une autre étude, le groupe de Tsilingiri a utilisé des explants de muqueuse afin d'améliorer les conditions d'analyse des probiotiques et postbiotiques (molécules produites par les probiotiques se retrouvant dans les surnageants de culture). Ici aussi l'effet des surnageants bactériens est évalué en présence de *S typhi* afin de rechercher la diminution de la réponse inflammatoire (Tsilingiri *et al.* 2012). Lorsque les auteurs mettent seulement *S typhi* en culture avec ce système, ils observent une augmentation de la production de TNF α . Cette production est diminuée lors de la co-culture avec le surnageant de *L paracasei*. De plus il est constaté que le surnageant ne fait pas diminuer la production d'IL10 que *S typhi* induit seule. Le surnageant de culture de *L paracasei* possède donc des propriétés immunorégulatrices.

Il serait intéressant de tester une approche similaire dans notre projet et d'évaluer l'effet des surnageant en présence d'un autre stimulus (comme une bactérie pro inflammatoire).

Chapitre 2 : Les culots bactériens étudiés possèdent des profils variés

2.1) Les Bacteroidetes

Le phylum des Bacteroidetes est composé de bactéries Gram négatives. Il a été montré que ce phylum était diminué dans le microbiote des personnes obèses alors que celui des Firmicutes était augmenté (Ley *et al.* 2006). Avec une induction forte d'IL10 et faible de TNF α , les bactéries composant ce phylum possèdent un profil immunorégulateur. Dans notre étude nous avons étudié trois membres de ce phylum : *B eggerthii*, *P merdae* et *P copri*.

B eggerthii et *P copri* ont un profil particulièrement pro-inflammatoire, elles activent la production de toutes les cytokines étudiées ou presque. Leur activation fait produire des cytokines de la phase aigüe de l'inflammation et semblent indiquer l'activation des Th17.

Le rôle de *B eggerthii* a été abordé dans le cadre d'une étude sur la protéine PGRPs (Peptido Glycan Recognition Proteins) qui est une famille de protéines parmi celles de l'immunité innée régulant le microbiote de l'hôte. Cette protéine participe au maintien de la flore intestinale et protège l'hôte d'une colite induite par Dextran-Sodium-Sulfate (DSS). Les souris mutées pour ce gène possèdent une flore intestinale avec une activité pro-inflammatoire qui induit fortement la production d'IFN γ . La protéine PGRP contribue au maintien de la tolérance intestinale face à une inflammation excessive (Saha *et al.* 2010). Les souris mutées pour ce gène ont une augmentation de l'abondance de *B eggerthii* dans leurs microbiotes. Cette bactérie augmente la susceptibilité à la colite induite par le DSS (Dziarski *et al.* 2016). Nos données confirment donc le caractère pro-inflammatoire de *B eggerthii*.

P copri est une bactérie anaérobie. Dans le cas la polyarthrite rhumatoïde, maladie auto immune chronique, une augmentation de l'abondance de *P copri* a été observée au détriment du genre *Bacteroides*. Il a été montré que des souris gavées par *P copri* avaient une sensibilité augmentée à la colite au DSS. L'hypothèse avancée par Scher *et al* est que cette bactérie tire parti d'un environnement pro-inflammatoire et va exacerber l'inflammation (Scher *et al.* 2013). Nos résultats ELISA et Luminex confirment le profil pro-inflammatoire de cette bactérie.

P merdae est une bactérie anaérobie. Elle est plus présente dans le microbiote des patients ayant une hypertension artérielle (Yan *et al.* 2017). C'est un pathogène opportuniste. Cette bactérie semble plutôt posséder un profil immunorégulateur dans notre étude avec l'induction d'une production importante d'IL10 qui semble contredire la littérature.

Haller *et al* ont montrés que les bactéries non pathogènes Gram négatives induisaient préférentiellement la production d'IL10 par les cellules de l'immunité (Haller *et al.* 2000). Ceci a été majoritairement observé dans nos résultats. Par ailleurs, les bactéries les plus immunogènes de notre étude font partie de ce phylum et induisent la production de toutes les cytokines étudiées.

2.2) Les Firmicutes

Les Firmicutes sont des bactéries Gram positives. C'est le phylum le plus abondant dans le microbiote intestinal (Qin *et al.* 2010), il est majoritairement composé de bactéries appartenant aux Clostridia du groupe XIVa et du groupe IV tel que *Ruminococcus* et *Faecalibacterium*. Ici nous étudions de manière plus approfondie les trois bactéries suivantes : *R. gnavus*, *L. pectinoschiza* et *Roseburia*.

R. gnavus est une bactérie anaérobie. L'abondance de cette bactérie est fortement augmentée dans les cas de Spa (spondylarthrite) associées aux MICI. Lors de cette étude il a été mis en évidence que *R. gnavus* pouvait être impliqué dans l'activité de la maladie, de plus elle contribue au lien entre la Spa et la MICI (Breban *et al.* 2017). *R. gnavus* possède un profil pro-inflammatoire, elle induit une forte production de TNF α par les HLA-DR+/CD14+ à 6h et c'est la seule qui exerce encore une activation à 18h, suggérant un maintien de l'inflammation plus fort que les autres bactéries dans le temps.

Satokari a observé une augmentation de *L. pectinoschiza* en séquençant le microbiote de patient ayant reçu une transplantation fécale. D'après cette étude, *L. pectinoschiza* aurait un rôle immunorégulateur (Satokari *et al.* 2014). Nous avons montré précédemment que cette bactérie induit une plus forte production d'IL10 que les autres bactéries. Cette observation est en accord avec les résultats de Satokari.

Nous avons testé une bactérie identifiée comme appartenant au genre *Roseburia*. Ce genre bactérien de la classe *Clostridium XIVa* semble jouer un rôle important dans l'homéostasie intestinale (Neyrinck *et al.* 2012). Lors de l'administration de chitin-glucan (CG) à des souris obèses ayant un régime fort en graisse, Neyrinck a montré une régulation du microbiote et du métabolisme du glucose et des lipides. Lors de notre étude, la séquence qui a été amplifiée est commune à plusieurs bactéries et ne nous a pas permis de déterminer l'espèce avec précision. Les résultats obtenus permettent d'observer que cette bactérie n'influence que très peu la production de cytokine. Cette bactérie productrice de butyrate est donc non immunogène. Ce paramètre peut la rendre intéressante dans le cadre de l'administration de probiotique.

Haller *et al* ont montrés que les bactéries non pathogènes Gram positives induisaient préférentiellement de l'IFN γ et de l'IL12 sur les PBMC. Nous avons obtenu des résultats

identiques pour *R. gnavus*. Ceci n'est toutefois pas observé avec *L. pectinoschiza* et *Roseburia spp.* Ces bactéries induisent la production d'IL10 mais pas la production d'IL12. Elles induisent également moins d'IFN γ que les autres. Les résultats obtenus pour *L. pectinoschiza* et *Roseburia spp.* suggèrent donc des profils immunorégulateur.

Chapitre 3 : Questions et perspectives

3.1) Nouvelles pistes d'analyse

Nous avons choisi comme contrôle positif de stimuler les PBMC avec de la PMA ionomycine. Cependant, ce couple active très fortement les cellules et de façon non spécifique. Un choix plus judicieux pourrait être d'utiliser une bactérie connue comme étant pro-inflammatoire comme *Escherichia coli* (Hedges, Svensson, et Svanborg 1992).

Au cours de l'étude en cytométrie, la production d'IL10 par les Lymphocyte T FoxP3+ n'est pas observée comme lors de l'induction des lymphocytes par *B. fragilis* via les PSA (Round et Mazmanian 2010). On peut également remarquer que l'IL22 et l'IL17 ne sont pas observées. La durée de stimulation peut être allongée. En effet, il a été testé une durée de 6h de stimulation, durée usuelle dans la littérature. L'équipe de Roock a stimulé les PBMC pendant 6 jours pour observer la différenciation des LTreg. À la fin de cette stimulation, les auteurs ont observés différents pourcentages de cette population selon les bactéries utilisées pour l'induction (Roock *et al.* 2011). Nous aurions également pu inclure dans l'étude une costimulation avec un anti-CD28. En effet, les LT $\alpha\beta$ et les cellules issues de leurs différenciations (90-95% des LT) nécessitent deux signaux pour produire des cytokines ou devenir des cellules effectrices. Le premier signal consiste en l'activation du TCR avec une reconnaissance de l'antigène associé. Le deuxième signal correspond à la costimulation par l'intermédiaire du CD28 (Laird *et al.* 2013). Ainsi en incluant un anti-CD28 lors de notre stimulation, celle-ci sera tout de même spécifique des antigènes testés mais sera induite de manière plus forte.

En complément de l'analyse par cytométrie avec les PBMC totaux, un autre type de démarche pourrait être développé pour analyser les populations répondants aux bactéries. En effet, les réponses individuelles de chaque population cellulaire permettraient d'obtenir une description plus fine. Cependant, ne considérer que les réponses individuelles n'est pas

suffisant. Suite à une stimulation bactérienne de CD4+, CD8+ et CD19+ purifiés, Haller n'a pas observé de production de cytokine mais a tout de même rapporté une activité de prolifération. Haller a également précisé que les NK ont besoin de l'activation médiée par les macrophages pour répondre aux bactéries (Haller *et al.* 2000). Cette étude souligne le besoin de l'interaction entre les différentes cellules constituant l'immunité pour observer une réponse.

Comme vu précédemment, la stimulation des cellules dendritiques (DC) seules pourraient être un moyen d'analyse envisageable. L'interaction entre les bactéries commensales et les DC est très importante pour comprendre comment le système immunitaire intestinal est capable de distinguer les bactéries commensales des bactéries pathogènes et d'induire une réponse tolérogène. La réponse face à ces bactéries est induite dans un premier temps par les PRR qui vont lier les PAMP. Cette liaison va activer les CPA, initier le relargage de cytokines et induire la réponse immunitaire adaptative. Les DC mucosales n'ont pas les mêmes propriétés que les DC circulantes (Kelsall et Rescigno 2004) (Iliev *et al.* 2009), c'est pourquoi il faut un modèle particulier. Bermudez-Brito *et al.* utilisent un modèle cellulaire à partir de CD34+ issues de sang de cordon ombilical. Les DC utilisées en test *in vitro* sont soit des DC dérivées de monocytes, soit des DC issues de cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+. D'après l'équipe de Bermudez-Brito, ces DC sont similaires aux DC de la *lamina propria* intestinale qui capturent les antigènes présents (Bermudez-Brito *et al.* 2013b). Cependant, l'étude menée par Syme indique que les DC issues de monocytes et celles issues de CSH ont les mêmes propriétés (Syme *et al.* 2005). Les PBMC utilisés ici proviennent du sang circulant. À l'instar des DC, leurs propriétés peuvent différer des PBMC de la *lamina propria* intestinale.

Dans notre étude, l'interaction des bactéries composant le microbiote intestinal avec le système immunitaire est analysé en les mettant directement en contact. Ce n'est pas représentatif de ce qui se passe *in vivo*. En effet, la barrière de mucus de l'intestin empêche le contact direct entre le microbiote et les cellules de l'immunité se trouvant dans la *lamina propria*. Idéalement, les cellules utilisées dans ce genre de test devraient provenir de cellules intestinales de sujets sains. Le modèle d'explant de muqueuse pourrait être une piste intéressante pour mimer les conditions intestinales. Dans l'étude de Tsilingiri *et al.* , un explant est obtenu à partir de la découpe d'un morceau d'une couche de muqueuse intestinale saine. L'explant est ensuite collé dans un cylindre en métal (Figure 27). Le système est mis en culture dans un insert puis stimulé avec des bactéries seules ou des bactéries additionnées de

surnageants bactériens. Afin d'imiter les conditions naturelles, les auteurs ont trouvé un moyen de maintenir la polarité du côté apical vers le côté basolatérale du tissu au cours de la stimulation.

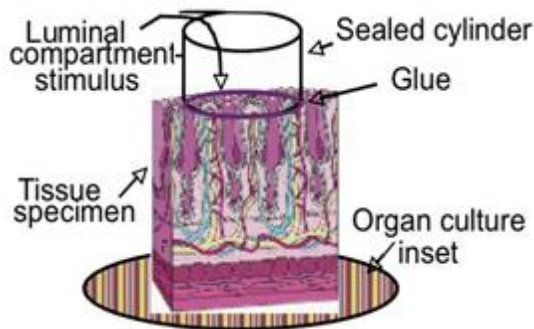


Figure 27 : Schéma de la mise en place du système de l'équipe de Tsilingiri.(Tsilingiri *et al.* 2012)

D'une manière plus accessible, il est possible de mimer la barrière intestinale sans dépendre de prélèvement de sujets sains. Pour ce faire Monteiro-Sepulveda *et al.* ont construit un modèle dans le but d'observer la sensibilité des LT issus de la *lamina propria* de patients obèses face à l'insuline. Ce modèle consiste en le fait d'avoir mis en culture des entérocytes Caco-2/TC7 sur des filtres Transwell et dans le fond du puits, ils ont placé les CD3+ issus des patients. Ensuite ils ont pu lancer une stimulation avec de l'insuline puis ils ont observés le relargage de cytokine dans le milieu par multiplex (Monteiro-Sepulveda *et al.* 2015). Ce modèle pourrait être adapté à notre situation afin de mimer la barrière épithéliale intestinale : nous pourrions mettre les Caco-2/TC7 en apicale et les PBMC en basolatérale, puis lancer la stimulation avec les bactéries en apicale. Nous pourrions récupérer les surnageants en basolatérale et observer la production de cytokines (Figure 28).

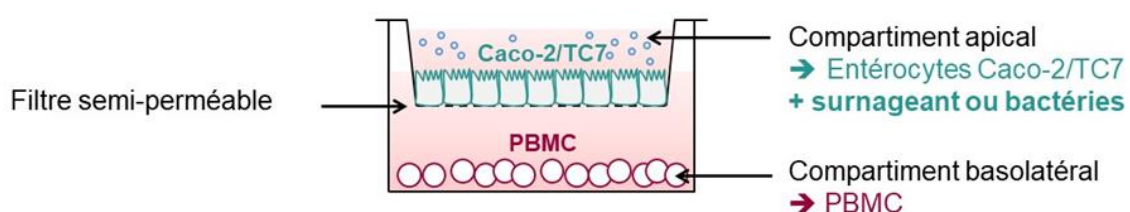


Figure 28 : Illustration du modèle de costimulation Caco-2/TC7 et PBMC

3.2) Perspectives de nos résultats

Dans cette étude nous avons montré que *L. pectinoschiza* possédait un profil immunorégulateur, cette bactérie pourrait potentiellement être utilisée comme probiotique en prévention des maladies inflammatoires comme les MICI. Une prochaine étape pourrait être de tester cette bactérie en modèle murins de colite.

D'autre part il est intéressant de souligner que la bactérie du genre *Roseburia* que nous avons testé ne semble pas avoir d'effet pro-inflammatoire. En effet ce genre étant connu pour sa production de butyrate, elle est très intéressante pour les cellules épithéliales intestinales. La production de butyrate étant bénéfique pour l'intestin (Figure 29).

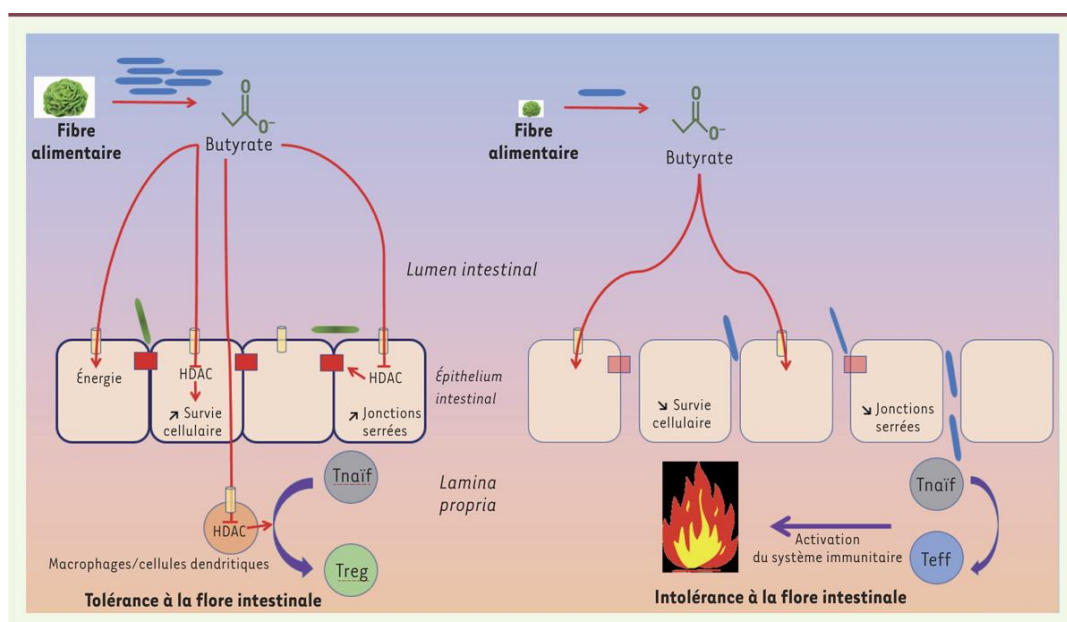


Figure 29 : Impact du butyrate sur l'épithélium intestinal et le système immunitaire

Le butyrate agit en tant qu'inhibiteur des histones désacétylase (HDAC), ce qui permet l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire et la cohésion intercellulaire. Le butyrate permet également la génération et le maintien de lymphocytes T régulateurs (Treg) au niveau de l'intestin. Les Treg vont sécréter des cytokines suppressives garantant le maintien de la tolérance vis-à-vis de la flore intestinale. Si l'apport de butyrate décroît, l'intégrité de l'épithélium est affectée, du fait de l'augmentation de la mort cellulaire, de la perte des jonctions serrées et de celle des lymphocytes Treg. Ainsi, la diminution du butyrate augmentera la perméabilité intestinale et favorisera donc la translocation des bactéries dans la lamina propria. Les lymphocytes pourront alors s'activer et se différencier en cellules effectrices pathogéniques (Teff), conduisant à l'établissement d'une inflammation qui peut mener à la rupture de la tolérance vis-à-vis du microbiote et à une inflammation chronique. (https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2017/08/medsci20173310p862/F1.html)

R. gnavus et *B. eggerthii* sont des bactéries pro-inflammatoires. *R. gnavus* est déjà reliée à des pathologies inflammatoires comme la SpA et la maladie de Crohn. Il serait intéressant

de voir s'il y a une corrélation avec la présence de *B eggerthii* et le déclenchement de certaines maladies.

Connaître l'identité des bactéries immunorégulatrices permet de trouver de nouvelles pistes pour les probiotiques mais aussi cela permet d'identifier la ou les molécules produites par la bactérie qui joue un rôle dans la régulation de l'inflammation. Par exemple il a été observé qu'une diminution de *F prausnitzii* semble être un facteur prédictif de la récurrence de la maladie de Crohn et des poussées de la rectocolite hémorragique. En étudiant la voie d'activation des cellules de l'immunité induite par cette bactérie Quévrain *et al.* ont pu identifier la protéine MAM (Microbial Anti-inflammatory Molecule) qui est sécrétée par *F prausnitzii* et qui porte une partie de l'activité immunorégulatrice (Quévrain *et al.* 2016).

Identifier les bactéries pro-inflammatoires présentes dans certaines maladies permet d'identifier des mécanismes déclencheurs mais aussi cela peut permettre d'imaginer des thérapies antibactériennes ciblées. De plus nous savons que l'homéostasie intestinale est due à l'équilibre du microbiote, il est donc possible de rééquilibrer la balance en administrant des bactéries bénéfiques.

En conclusion, nous avons analysé les effets d'un grand nombre de culots et surnageants bactériens. Les bactéries testées ont des effets différents sur la réponse immune telle que nous l'avons analysé. Les résultats obtenus ont pour la plupart une portée immédiate limitée, mais ils permettent d'ouvrir de nouvelles voies d'explorations.

Partie VI - Bibliographie

- Antonopoulos, Dionysios A., Susan M. Huse, Hilary G. Morrison, Thomas M. Schmidt, Mitchell L. Sogin, et Vincent B. Young. 2009. « Reproducible Community Dynamics of the Gastrointestinal Microbiota Following Antibiotic Perturbation ». *Infection and Immunity* 77 (6): 2367-75. <https://doi.org/10.1128/IAI.01520-08>.
- Arumugam, Manimozhiyan, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Gabriel R. Fernandes, et al. 2011. « Enterotypes of the human gut microbiome ». *Nature* 473 (7346): 174-80. <https://doi.org/10.1038/nature09944>.
- Bach, Jean-Francois. 2002. « The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases ». *The New England Journal of Medicine* 347 (12): 911-20. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020100>.
- Barnard, J. A., et G. Warwick. 1993. « Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells ». *Cell Growth & Differentiation* 4 (6): 495.
- Bauer, H., R. E. Horowitz, S. M. Levenson, et H. Popper. 1963. « The Response of the Lymphatic Tissue to the Microbial Flora. Studies on Germfree Mice ». *The American Journal of Pathology* 42 (avril): 471-83.
- Baumgart, Martin, Belgin Dogan, Mark Rishniw, Gil Weitzman, Brian Bosworth, Rhonda Yantiss, Renato H. Orsi, et al. 2007. « Culture Independent Analysis of Ileal Mucosa Reveals a Selective Increase in Invasive Escherichia Coli of Novel Phylogeny Relative to Depletion of Clostridiales in Crohn's Disease Involving the Ileum ». *The ISME Journal* 1 (5): 403-18. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.52>.
- Begley, Máire, Colin Hill, et Cormac G. M. Gahan. 2006. « Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (3): 1729-38. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006>.
- Berg, Adam M., Ciarán P. Kelly, et Francis A. Farraye. 2013. « Clostridium Difficile Infection in the Inflammatory Bowel Disease Patient ». *Inflammatory Bowel Diseases* 19 (1): 194-204. <https://doi.org/10.1002/ibd.22964>.
- Bermudez-Brito, Miriam, Sergio Muñoz-Quezada, Carolina Gomez-Llorente, Esther Matencio, Maria J. Bernal, Fernando Romero, et Angel Gil. 2013a. « Cell-Free Culture Supernatant of Bifidobacterium breve CNCM I-4035 Decreases Pro-Inflammatory Cytokines in Human Dendritic Cells Challenged with Salmonella typhi through TLR Activation ». *PLoS ONE* 8 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059370>.
- . 2013b. « Cell-Free Culture Supernatant of Bifidobacterium Breve CNCM I-4035 Decreases Pro-Inflammatory Cytokines in Human Dendritic Cells Challenged with Salmonella Typhi through TLR Activation ». *PLOS ONE* 8 (3): e59370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059370>.
- Bernalier-Donadille, A. 2010. « [Fermentative metabolism by the human gut microbiota] ». *Gastroenterologie Clinique Et Biologique* 34 Suppl 1 (septembre): S16-22. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70016-6](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70016-6).
- Biasucci, Giacomo, Monica Rubini, Sara Riboni, Lorenzo Morelli, Elena Bessi, et Cristiana Retetangos. 2010. « Mode of Delivery Affects the Bacterial Community in the Newborn Gut ». *Early Human Development* 86 Suppl 1 (juillet): 13-15. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>.
- Breban, Maxime, Julien Tap, Ariane Leboime, Roula Said-Nahal, Philippe Langella, Gilles Chiocchia, Jean-Pierre Furet, et Harry Sokol. 2017. « Faecal Microbiota Study

- Reveals Specific Dysbiosis in Spondyloarthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76 (9): 1614-22. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-211064>.
- Brennan, Patrick J., Manfred Brigl, et Michael B. Brenner. 2013. « Invariant Natural Killer T Cells: An Innate Activation Scheme Linked to Diverse Effector Functions ». *Nature Reviews Immunology* 13 (2): 101-17. <https://doi.org/10.1038/nri3369>.
- Brown, Kevin, Kim Valenta, David Fisman, Andrew Simor, et Nick Daneman. 2015. « Hospital Ward Antibiotic Prescribing and the Risks of Clostridium Difficile Infection ». *JAMA Internal Medicine* 175 (4): 626-33. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.8273>.
- Brown, Kirsty, Daniella DeCoffe, Erin Molcan, et Deanna L. Gibson. 2012. « Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease ». *Nutrients* 4 (8): 1095-1119. <https://doi.org/10.3390/nu4081095>.
- Canani, Roberto Berni, Margherita Di Costanzo, Ludovica Leone, Monica Pedata, Rosaria Meli, et Antonio Calignano. 2011. « Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases ». *World Journal of Gastroenterology: WJG* 17 (12): 1519-28. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1519>.
- Cao, A. T., S. Yao, B. Gong, R. I. Nurieva, C. O. Elson, et Y. Cong. 2015. « Interleukin (IL)-21 Promotes Intestinal IgA Response to Microbiota ». *Mucosal Immunology* 8 (5): 1072-82. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.134>.
- Cosnes, Jacques, Corinne Gower-Rousseau, Philippe Seksik, et Antoine Cortot. 2011. « Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases ». *Gastroenterology* 140 (6): 1785-1794.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055>.
- Couturier-Maillard, Aurélie, Thomas Secher, Ateequr Rehman, Sylvain Normand, Adèle De Arcangelis, Robert Haesler, Ludovic Huot, et al. 2013. « NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (2): 700-711. <https://doi.org/10.1172/JCI62236>.
- De Filippo, Carlotta, Duccio Cavalieri, Monica Di Paola, Matteo Ramazzotti, Jean Baptiste Poullet, Sebastien Massart, Silvia Collini, Giuseppe Pieraccini, et Paolo Lionetti. 2010. « Impact of Diet in Shaping Gut Microbiota Revealed by a Comparative Study in Children from Europe and Rural Africa ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (33): 14691-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>.
- Devkota, Suzanne, Yunwei Wang, Mark W. Musch, Vanessa Leone, Hannah Fehlner-Peach, Anuradha Nadimpalli, Dionysios A. Antonopoulos, Bana Jabri, et Eugene B. Chang. 2012. « Dietary-Fat-Induced Taurocholic Acid Promotes Pathobiont Expansion and Colitis in IL10^{-/-} Mice ». *Nature* 487 (7405): 104-8. <https://doi.org/10.1038/nature11225>.
- Dopheide, Jörn F., Pascal Knopf, Geraldine C. Zeller, Markus Vosseler, Nico Abegunewardene, Thomas Münzel, et Christine Espinola-Klein. 2015. « Low IL-10/TNF α Ratio in Patients with Coronary Artery Disease and Reduced Left Ventricular Ejection Fraction with a Poor Prognosis After 10 Years ». *Inflammation* 38 (2): 911-22. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0053-5>.
- Dusko Ehrlich, S., et MetaHIT consortium. 2010. « [Metagenomics of the intestinal microbiota: potential applications] ». *Gastroenterologie Clinique Et Biologique* 34 Suppl 1 (septembre): S23-28. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70017-8](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70017-8).

- Dziarski, Roman, Shin Yong Park, Des Raj Kashyap, Scot E. Dowd, et Dipika Gupta. 2016. « Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* Enhance and *Alistipes finegoldii* Attenuates Colitis in Mice ». *PLoS ONE* 11 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146162>.
- Erwin G. Zoetendal, Willem M. de Vos, Antoon D. L. Akkermans, Wilma M. Akkermans-van Vliet, J. Arjan G. M. de Visser. 2001. « The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract ». *Microbial Ecology in Health and Disease* 13 (3): 129-34. <https://doi.org/10.1080/089106001750462669>.
- Fallani, Matteo, David Young, Jane Scott, Elisabeth Norin, Sergio Amarri, Rüdiger Adam, Marga Aguilera, et al. 2010. « Intestinal Microbiota of 6-Week-Old Infants across Europe: Geographic Influence beyond Delivery Mode, Breast-Feeding, and Antibiotics ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 51 (1): 77-84. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e>.
- Farkas, Klaudia, Sunil Yeruva, Zoltán Rakonczay, Lisa Ludolph, Tamás Molnár, Ferenc Nagy, Zoltán Szepes, et al. 2011. « New Therapeutic Targets in Ulcerative Colitis: The Importance of Ion Transporters in the Human Colon ». *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (4): 884-98. <https://doi.org/10.1002/ibd.21432>.
- Fujimura, Kei E., et Susan V. Lynch. 2015. « Microbiota in Allergy and Asthma and the Emerging Relationship with the Gut Microbiome ». *Cell host & microbe* 17 (5): 592-602. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.007>.
- Furrie, Elizabeth, Sandra Macfarlane, George Thomson, George T. Macfarlane, Microbiology & Gut Biology Group, et Tayside Tissue & Tumour Bank. 2005. « Toll-like Receptors-2, -3 and -4 Expression Patterns on Human Colon and Their Regulation by Mucosal-Associated Bacteria ». *Immunology* 115 (4): 565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02200.x>.
- Gerbe, François, Emmanuelle Sidot, Danielle J. Smyth, Makoto Ohmoto, Ichiro Matsumoto, Valérie Dardalhon, Pierre Cesses, et al. 2016. « Intestinal Epithelial Tuft Cells Initiate Type 2 Mucosal Immunity to Helminth Parasites ». *Nature* 529 (7585): 226-30. <https://doi.org/10.1038/nature16527>.
- Haller, D., S. Blum, C. Bode, W. P. Hammes, et E. J. Schiffrin. 2000. « Activation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by Nonpathogenic Bacteria In Vitro: Evidence of NK Cells as Primary Targets ». *Infection and Immunity* 68 (2): 752-59.
- Hamai, Ahmed, Jane Muret, Andrea Cavalcanti, Sylvie Bonvalot, et Salem Chouaïb. 2009. « Le facteur de nécrose tumorale: de la biologie à la thérapie oncologique ». *Hématologie*, n° 4(juillet): 291-304. <https://doi.org/10.1684/hma.2009.0366>.
- Hawrelak, Jason A. 2004. « The Causes of Intestinal Dysbiosis: A Review » 9 (2): 18.
- Hedges, Spencer, Majlis Svensson, et Catharina Svanborg. 1992. « Interleukin-6 Response of Epithelial Cell Lines to Bacterial Stimulation In Vitro » 60: 7.
- Hildebrandt, Marie A., Christian Hoffmann, Scott A. Sherrill-Mix, Sue A. Keilbaugh, Micah Hamady, Ying-Yu Chen, Rob Knight, Rexford S. Ahima, Frederic Bushman, et Gary D. Wu. 2009. « High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity ». *Gastroenterology* 137 (5): 1716-1724-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.042>.
- Hughes, R., E. A. Magee, et S. Bingham. 2000. « Protein Degradation in the Large Intestine: Relevance to Colorectal Cancer ». *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1 (2): 51-58.

- Ichinohe, Takeshi, Iris K. Pang, Yosuke Kumamoto, David R. Peaper, John H. Ho, Thomas S. Murray, et Akiko Iwasaki. 2011. « Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (13): 5354-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019378108>.
- Ismail, Anisa S., Cassie L. Behrendt, et Lora V. Hooper. 2009. « Reciprocal Interactions between Commensal Bacteria and Gamma Delta Intraepithelial Lymphocytes during Mucosal Injury ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (5): 3047-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802705>.
- Iyer, Shankar Subramanian, et Genhong Cheng. 2012. « Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease ». *Critical reviews in immunology* 32 (1): 23-63.
- Jernberg, Cecilia, Sonja Löfmark, Charlotta Edlund, et Janet K. Jansson. 2007. « Long-Term Ecological Impacts of Antibiotic Administration on the Human Intestinal Microbiota ». *The ISME Journal* 1 (1): 56-66. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.3>.
- Johansson, Malin E V, Jenny K Gustafsson, Jessica Holmén-Larsson, Karolina S Jabbar, Lijun Xia, Hua Xu, Fayez K Ghishan, et al. 2014. « Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis ». *Gut* 63 (2): 281-91. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303207>.
- Kandori, H., K. Hirayama, M. Takeda, et K. Doi. 1996. « Histochemical, Lectin-Histochemical and Morphometrical Characteristics of Intestinal Goblet Cells of Germfree and Conventional Mice ». *Experimental Animals* 45 (2): 155-60.
- Kato Lucia M., Kawamoto Shimpei, Maruya Mikako, et Fagarasan Sidonia. 2014. « The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota ». *Immunological Reviews* 260 (1): 67-75. <https://doi.org/10.1111/imr.12185>.
- Kelsall, Brian L., et Maria Rescigno. 2004. « Mucosal Dendritic Cells in Immunity and Inflammation ». *News. Nature Immunology*. 1 novembre 2004. <http://www-nature-com/articles/ni1104-1091>.
- Kim, Oh Yoen, Antoine Monsel, Michèle Bertrand, Pierre Coriat, Jean-Marc Cavaillon, et Minou Adib-Conquy. 2010. « Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation ». *Critical Care* 14 (2): R61. <https://doi.org/10.1186/cc8959>.
- Kim, Young S., et Samuel B. Ho. 2010. « Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress ». *Current Gastroenterology Reports* 12 (5): 319-30. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>.
- Klaasen, H. L., P. J. Van der Heijden, W. Stok, F. G. Poelma, J. P. Koopman, M. E. Van den Brink, M. H. Bakker, W. M. Eling, et A. C. Beynen. 1993. « Apathogenic, Intestinal, Segmented, Filamentous Bacteria Stimulate the Mucosal Immune System of Mice ». *Infection and Immunity* 61 (1): 303-6.
- Kleiner, Giulio, Annalisa Marcuzzi, Valentina Zanin, Lorenzo Monasta, et Giorgio Zauli. 2013. « Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects ». *Research article. Mediators of Inflammation*. 2013. <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/434010/>.
- La Serre, Claire Barbier de, Collin L. Ellis, Jennifer Lee, Amber L. Hartman, John C. Rutledge, et Helen E. Raybould. 2010. « Propensity to High-Fat Diet-Induced Obesity in Rats Is Associated with Changes in the Gut Microbiota and Gut Inflammation ».

- American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 299 (2): G440-448. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00098.2010>.
- Laird, Renee M., Benjamin J. Wolf, Michael F. Princiotta, et Sandra M. Hayes. 2013. « $\gamma\delta$ T Cells Acquire Effector Fates in the Thymus and Differentiate into Cytokine-Producing Effectors in a *Listeria* Model of Infection Independently of CD28 Costimulation ». *PLoS ONE* 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063178>.
- Lamas, Bruno, Mathias L Richard, Valentin Leducq, Hang-Phuong Pham, Marie-Laure Michel, Gregory Da Costa, Chantal Bridonneau, et al. 2016. « CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands ». *Nature medicine* 22 (6): 598-605. <https://doi.org/10.1038/nm.4102>.
- Larsson, Erik, Valentina Tremaroli, Ying Shiuang Lee, Omry Koren, Intawat Nookaew, Ashwana Fricker, Jens Nielsen, Ruth E Ley, et Fredrik Bäckhed. 2012. « Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88 ». *Gut* 61 (8): 1124-31. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301104>.
- Lee, S. Melanie, Gregory P. Donaldson, Zbigniew Mikulski, Silva Boyajian, Klaus Ley, et Sarkis K. Mazmanian. 2013. « Bacterial Colonization Factors Control Specificity and Stability of the Gut Microbiota ». *Nature* 501 (7467): 426-29. <https://doi.org/10.1038/nature12447>.
- Levy, Maayan, Aleksandra A. Kolodziejczyk, Christoph A. Thaiss, et Eran Elinav. 2017a. « Dysbiosis and the Immune System ». *Nature Reviews Immunology* 17 (4): 219-32. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>.
- . 2017b. « Dysbiosis and the Immune System ». *Nature Reviews Immunology* 17 (4): 219-32. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>.
- Ley, Ruth E., Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein, et Jeffrey I. Gordon. 2006. « Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity ». *Nature* 444 (7122): 1022-23. <https://doi.org/10.1038/4441022a>.
- Lin, Zhonghua, Nancy Y. Chiang, Ning Chai, Dhaya Seshasayee, Wyne P. Lee, Mercedesz Balazs, Gerald Nakamura, et Lee R. Swem. 2014. « In Vivo Antigen-Driven Plasmablast Enrichment in Combination with Antigen-Specific Cell Sorting to Facilitate the Isolation of Rare Monoclonal Antibodies from Human B Cells ». *Nature Protocols* 9 (7): 1563-77. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.104>.
- Macpherson, Andrew J., Yasmin Köller, et Kathy D. McCoy. 2015. « The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA ». *Trends in Immunology* 36 (8): 460-70. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.06.006>.
- Manichanh, C, L Rigottier-Gois, E Bonnaud, K Gloux, E Pelletier, L Frangeul, R Nalin, et al. 2006. « Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach ». *Gut* 55 (2): 205-11. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>.
- Marcobal, Angela, Audrey M. Southwick, Kristen A. Earle, et Justin L. Sonnenburg. 2013. « A Refined Palate: Bacterial Consumption of Host Glycans in the Gut ». *Glycobiology* 23 (9): 1038-46. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt040>.
- Martín, Rocío, Esther Jiménez, Hans Heilig, Leonides Fernández, María L. Marín, Erwin G. Zoetendal, et Juan M. Rodríguez. 2009. « Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel

- Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (4): 965-69. <https://doi.org/10.1128/AEM.02063-08>.
- Mazmanian, Sarkis K., Cui Hua Liu, Arthur O. Tzianabos, et Dennis L. Kasper. 2005. « An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System ». *Cell* 122 (1): 107-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>.
- McDole, Jeremiah R., Leroy W. Wheeler, Keely G. McDonald, Baomei Wang, Vjollca Konjufca, Kathryn A. Knoop, Rodney D. Newberry, et Mark J. Miller. 2012. « Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ DCs in the small intestine ». *Nature* 483 (7389): 345-49. <https://doi.org/10.1038/nature10863>.
- McIntyre, A., P. R. Gibson, et G. P. Young. 1993. « Butyrate Production from Dietary Fibre and Protection against Large Bowel Cancer in a Rat Model. » *Gut* 34 (3): 386.
- Monteiro-Sepulveda, Milena, Sothea Touch, Carla Mendes-Sá, Sébastien André, Christine Poitou, Omran Allatif, Aurélie Cotillard, et al. 2015. « Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling ». *Cell Metabolism* 22 (1): 113-24. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.020>.
- Moreira, Lilian O., et Dario S. Zamboni. 2012. « NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 3 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00328>.
- Mowat, Allan M., et William W. Agace. 2014. « Regional Specialization within the Intestinal Immune System ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (10): 667-85. <https://doi.org/10.1038/nri3738>.
- Mulligan, M. E., D. Citron, E. Gabay, B. D. Kirby, W. L. George, et S. M. Finegold. 1984. « Alterations in Human Fecal Flora, Including Ingrowth of Clostridium Difficile, Related to Cefoxitin Therapy. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26 (3): 343.
- Neyrinck, Audrey M., Sam Possemiers, Willy Verstraete, Fabienne De Backer, Patrice D. Cani, et Nathalie M. Delzenne. 2012. « Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin–glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23 (1): 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.10.008>.
- Nood, Els van, Anne Vrieze, Max Nieuwdorp, Susana Fuentes, Erwin G. Zoetendal, Willem M. de Vos, Caroline E. Visser, et al. 2013. « Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent Clostridium Difficile ». Research-article. <http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1056/NEJMoa1205037>. 30 janvier 2013. <https://www-nejm-org.gate2.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa1205037>.
- Pigneur, B., et H. Sokol. 2016. « Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: The Quest for the Holy Grail ». *Mucosal Immunology* 9 (6): 1360-65. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.67>.
- Pokusaeva, Karina, Gerald F. Fitzgerald, et Douwe van Sinderen. 2011. « Carbohydrate Metabolism in Bifidobacteria ». *Genes & Nutrition* 6 (3): 285-306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>.
- Pryde, Susan E., Sylvia H. Duncan, Georgina L. Hold, Colin S. Stewart, et Harry J. Flint. 2002. « The Microbiology of Butyrate Formation in the Human Colon ». *FEMS Microbiology Letters* 217 (2): 133-39.
- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, et al. 2010. « A human gut

- microbial gene catalog established by metagenomic sequencing ». *Nature* 464 (7285): 59-65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
- Quévrain, E., M. A. Maubert, C. Michon, F. Chain, R. Marquant, J. Tailhades, S. Miquel, et al. 2016. « Identification of an Anti-Inflammatory Protein from *Faecalibacterium Prausnitzii*, a Commensal Bacterium Deficient in Crohn's Disease ». *Gut* 65 (3): 415-25. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>.
- Rautava, Samuli, Raakel Luoto, Seppo Salminen, et Erika Isolauri. 2012. « Microbial Contact during Pregnancy, Intestinal Colonization and Human Disease ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9 (10): 565-76. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.144>.
- Rehman, Ateequr, Christian Sina, Olga Gavrilova, Robert Häsler, Stephan Ott, John F. Baines, Stefan Schreiber, et Philip Rosenstiel. 2011. « Nod2 Is Essential for Temporal Development of Intestinal Microbial Communities ». *Gut* 60 (10): 1354-62. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.216259>.
- Reikvam, Dag Henrik, Alexander Erofeev, Anders Sandvik, Vedrana Grcic, Frode Lars Jahnsen, Peter Gaustad, Kathy D. McCoy, Andrew J. Macpherson, Leonardo A. Meza-Zepeda, et Finn-Eirik Johansen. 2011. « Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression ». *PloS One* 6 (3): e17996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017996>.
- Rescigno, Maria. 2014. « Intestinal Microbiota and Its Effects on the Immune System ». *Cellular Microbiology* 16 (7): 1004-13. <https://doi.org/10.1111/cmi.12301>.
- « Review on Nod-Like Receptors (NLR) or CATERPILLER - InvivoGen ». s. d. Consulté le 8 août 2017. <http://www.invivogen.com/review-nlr>.
- Roock, Sytze de, Merel van Elk, Maarten O. Hoekstra, Berent J. Prakken, Ger T. Rijkers, et Ismé M. de Kleer. 2011. « Gut Derived Lactic Acid Bacteria Induce Strain Specific CD4+ T Cell Responses in Human PBMC ». *Clinical Nutrition* 30 (6): 845-51. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.05.005>.
- Round, June L., et Sarkis K. Mazmanian. 2010. « Inducible Foxp3+ Regulatory T-Cell Development by a Commensal Bacterium of the Intestinal Microbiota ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (27): 12204-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>.
- Rutz, Sascha, Céline Eidenschenk, et Wenjun Ouyang. 2013. « IL-22, Not Simply a Th17 Cytokine ». *Immunological Reviews* 252 (1): 116-32. <https://doi.org/10.1111/imr.12027>.
- Saha, Sukumar, Xuefang Jing, Shin Yong Park, Shiyong Wang, Xinna Li, Dipika Gupta, et Roman Dziarski. 2010. « Peptidoglycan Recognition Proteins Protect Mice from Experimental Colitis by Promoting Normal Gut Flora and Preventing Induction of Interferon- γ ». *Cell host & microbe* 8 (2): 147-62. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.07.005>.
- Santacruz, Arlette, Ascensión Marcos, Julia Wärnberg, Amelia Martí, Miguel Martín-Matillas, Cristina Campoy, Luis A. Moreno, et al. 2009. « Interplay between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 17 (10): 1906-15. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.112>.
- Satokari, Reetta, Susana Fuentes, Eero Mattila, Jonna Jalanka, Willem M. de Vos, et Perttu Arkkila. 2014. « Fecal Transplantation Treatment of Antibiotic-Induced,

- Noninfectious Colitis and Long-Term Microbiota Follow-Up ». *Case Reports in Medicine* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/913867>.
- Scher, Jose U., Andrew Sczesnak, Randy S. Longman, Nicola Segata, Carles Ubeda, Craig Bielski, Tim Rostron, et al. 2013. « Expansion of Intestinal *Prevotella Copri* Correlates with Enhanced Susceptibility to Arthritis ». *eLife* 2 (novembre): e01202. <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>.
- Schnupf, Pamela, Valérie Gaboriau-Routhiau, et Nadine Cerf-Bensussan. 2013. « Host interactions with Segmented Filamentous Bacteria: An unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system ». *Seminars in Immunology, Microbiota and the immune system, an amazing mutualism forged by co-evolution*, 25 (5): 342-51. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.001>.
- Sekirov, Inna, Nicola M. Tam, Maria Jogova, Marilyn L. Robertson, Yuling Li, Claudia Lupp, et B. Brett Finlay. 2008. « Antibiotic-Induced Perturbations of the Intestinal Microbiota Alter Host Susceptibility to Enteric Infection ». *Infection and Immunity* 76 (10): 4726-36. <https://doi.org/10.1128/IAI.00319-08>.
- Seksik, P., L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian, et J. Doré. 2003. « Alterations of the Dominant Faecal Bacterial Groups in Patients with Crohn's Disease of the Colon ». *Gut* 52 (2): 237-42.
- Seth, A., Fang Yan, D. Brent Polk, et R. K. Rao. 2008. « Probiotics Ameliorate the Hydrogen Peroxide-Induced Epithelial Barrier Disruption by a PKC- and MAP Kinase-Dependent Mechanism ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 294 (4): G1060-1069. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00202.2007>.
- Shulzhenko, Natalia, Andrey Morgun, William Hsiao, Michele Battle, Michael Yao, Oksana Gavrilova, Marlene Orandle, et al. 2011. « Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut ». *Nature medicine* 17 (12): 1585-93. <https://doi.org/10.1038/nm.2505>.
- Sokol, Harry, Bénédicte Pigneur, Laurie Watterlot, Omar Lakhdari, Luis G. Bermúdez-Humarán, Jean-Jacques Gratadoux, Sébastien Blugeon, et al. 2008. « Faecalibacterium *Prausnitzii* Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium Identified by Gut Microbiota Analysis of Crohn Disease Patients ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (43): 16731-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>.
- Sommer, Felix, et Fredrik Bäckhed. 2013. « The Gut Microbiota--Masters of Host Development and Physiology ». *Nature Reviews. Microbiology* 11 (4): 227-38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>.
- Sorg, Joseph A., et Abraham L. Sonenshein. 2008. « Bile Salts and Glycine as Cogerminants for *Clostridium Difficile* Spores ». *Journal of Bacteriology* 190 (7): 2505-12. <https://doi.org/10.1128/JB.01765-07>.
- Stearns, Jennifer C., Michael A. Zulyniak, Russell J. de Souza, Natalie C. Campbell, Michelle Fontes, Mateen Shaikh, Malcolm R. Sears, et al. 2017. « Ethnic and diet-related differences in the healthy infant microbiome ». *Genome Medicine* 9 (mars). <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0421-5>.
- Stecher, Bärbel, Lisa Maier, et Wolf-Dietrich Hardt. 2013. « "Blooming" in the Gut: How Dysbiosis Might Contribute to Pathogen Evolution ». *Nature Reviews Microbiology* 11 (4): 277-84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2989>.

- Stewart, Jessica A., Vinton S. Chadwick, et Alan Murray. 2005. « Investigations into the Influence of Host Genetics on the Predominant Eubacteria in the Faecal Microflora of Children ». *Journal of Medical Microbiology* 54 (Pt 12): 1239-42. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46189-0>.
- Strober, Warren, Naoki Asano, Ivan Fuss, Atsushi Kitani, et Tomohiro Watanabe. 2014. « Cellular and Molecular Mechanisms Underlying NOD2 Risk-Associated Polymorphisms in Crohn's Disease ». *Immunological Reviews* 260 (1): 249-60. <https://doi.org/10.1111/imr.12193>.
- Suau, Antonia, Régis Bonnet, Malène Sutren, Jean-Jacques Godon, Glenn R. Gibson, Matthew D. Collins, et Joel Doré. 1999. « Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut ». *Applied and Environmental Microbiology* 65 (11): 4799-4807.
- Surana, Neeraj K., et Dennis L. Kasper. 2012. « The yin yang of bacterial polysaccharides: Lessons learned from *B. fragilis* PSA ». *Immunological reviews* 245 (1): 13-26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01075.x>.
- Syme, Rachel, Rubinder Bajwa, Laurie Robertson, Doug Stewart, et Stefan Glück. 2005. « Comparison of CD34 and Monocyte-Derived Dendritic Cells from Mobilized Peripheral Blood from Cancer Patients ». *STEM CELLS* 23 (1): 74-81. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0070>.
- Takahashi, Kyoko, Yutaka Sugi, Kou Nakano, Masato Tsuda, Kenta Kurihara, Akira Hosono, et Shuichi Kaminogawa. 2011. « Epigenetic Control of the Host Gene by Commensal Bacteria in Large Intestinal Epithelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (41): 35755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271007>.
- Tanaka, Toshio, Masashi Narazaki, et Tadimitsu Kishimoto. 2014. « IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.
- Tap, Julien, Stanislas Mondot, Florence Levenez, Eric Pelletier, Christophe Caron, Jean-Pierre Furet, Edgardo Ugarte, et al. 2009. « Towards the Human Intestinal Microbiota Phylogenetic Core ». *Environmental Microbiology* 11 (10): 2574-84. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x>.
- Toivanen, Paavo, Jussi Vahtovuori, et Erkki Eerola. 2001. « Influence of Major Histocompatibility Complex on Bacterial Composition of Fecal Flora ». *Infection and Immunity* 69 (4): 2372-77. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2372-2377.2001>.
- Tomas, Julie, Laura Wrzosek, Nassim Bouznad, Stephan Bouet, Camille Mayeur, Marie-Louise Noordine, Edith Honvo-Houeto, Philippe Langella, Muriel Thomas, et Claire Cherbuy. 2013. « Primocolonization Is Associated with Colonic Epithelial Maturation during Conventionalization ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (2): 645-55. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216861>.
- Tsilingiri, Katerina, Theolis Barbosa, Giuseppe Penna, Flavio Caprioli, Angelica Sonzogni, Giuseppe Viale, et Maria Rescigno. 2012. « Probiotic and Postbiotic Activity in Health and Disease: Comparison on a Novel Polarised Ex-Vivo Organ Culture Model ». *Gut* 61 (7): 1007-15. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300971>.
- Turnbaugh, Peter J., Fredrik Bäckhed, Lucinda Fulton, et Jeffrey I. Gordon. 2008. « Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal

- Gut Microbiome ». *Cell Host & Microbe* 3 (4): 213-23. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>.
- Turnbaugh, Peter J., Micah Hamady, Tanya Yatsunenko, Brandi L. Cantarel, Alexis Duncan, Ruth E. Ley, Mitchell L. Sogin, et al. 2009. « A core gut microbiome in obese and lean twins ». *Nature* 457 (7228): 480-84. <https://doi.org/10.1038/nature07540>.
- Turnbaugh, Peter J., Vanessa K. Ridaura, Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey, Rob Knight, et Jeffrey I. Gordon. 2009. « The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice ». *Science Translational Medicine* 1 (6): 6ra14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>.
- Ubeda, Carles, et Eric G. Pamer. 2012. « Antibiotics, microbiota, and immune defense ». *Trends in immunology* 33 (9): 459-66. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.05.003>.
- Walker, Alan W., Jeremy D. Sanderson, Carol Churcher, Gareth C. Parkes, Barry N. Hudspith, Neil Rayment, Jonathan Brostoff, Julian Parkhill, Gordon Dougan, et Liljana Petrovska. 2011. « High-Throughput Clone Library Analysis of the Mucosa-Associated Microbiota Reveals Dysbiosis and Differences between Inflamed and Non-Inflamed Regions of the Intestine in Inflammatory Bowel Disease ». *BMC Microbiology* 11 (janvier): 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-7>.
- Walton, Kristen L. W., Jianping He, Brian L. Kelsall, R. Balfour Sartor, et Nancy C. Fisher. 2006. « Dendritic Cells in Germ-Free and Specific Pathogen-Free Mice Have Similar Phenotypes and in Vitro Antigen Presenting Function ». *Immunology Letters* 102 (1): 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.07.001>.
- Wlodarska, M., B. Willing, K. M. Keeney, A. Menendez, K. S. Bergstrom, N. Gill, S. L. Russell, B. A. Vallance, et B. B. Finlay. 2011. « Antibiotic Treatment Alters the Colonic Mucus Layer and Predisposes the Host to Exacerbated Citrobacter rodentium-Induced Colitis ». *Infection and Immunity* 79 (4): 1536-45. <https://doi.org/10.1128/IAI.01104-10>.
- Wolk, Kerstin, Ellen Witte, Ute Hoffmann, Wolf-Dietrich Doecke, Stefanie Endesfelder, Khusru Asadullah, Wolfram Sterry, Hans-Dieter Volk, Bianca Maria Wittig, et Robert Sabat. 2007. « IL-22 Induces Lipopolysaccharide-Binding Protein in Hepatocytes: A Potential Systemic Role of IL-22 in Crohn's Disease ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (9): 5973-81.
- Yan, Qiulong, Yifang Gu, Xiangchun Li, Wei Yang, Liqiu Jia, Changming Chen, Xiuyan Han, et al. 2017. « Alterations of the Gut Microbiome in Hypertension ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00381>.
- Yatsunenko, Tanya, Federico E. Rey, Mark J. Manary, Indi Trehan, Maria Gloria Dominguez-Bello, Monica Contreras, Magda Magris, et al. 2012. « Human gut microbiome viewed across age and geography ». *Nature* 486 (7402): 222-27. <https://doi.org/10.1038/nature11053>.
- Zhang, Chenhong, Menghui Zhang, Shengyue Wang, Ruijun Han, Youfang Cao, Weiyang Hua, Yuejian Mao, et al. 2010. « Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Relevant to Development of Metabolic Syndromes in Mice ». *The ISME Journal* 4 (2): 232-41. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112>.
- Zimmer, J., B. Lange, J.-S. Frick, H. Sauer, K. Zimmermann, A. Schwiertz, K. Rusch, S. Klosterhalfen, et P. Enck. 2012. « A Vegan or Vegetarian Diet Substantially Alters the Human Colonic Faecal Microbiota ». *European Journal of Clinical Nutrition* 66 (1): 53-60. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.141>.

Identification et caractérisation des micro-organismes de la flore intestinale possédant des fonctions immunomodulatrices chez l'hôte

Sarah JEGOU
06/12/2018

RÉSUMÉ

Le microbiote intestinal est considéré comme un nouvel organe, le nombre de gène du microbiote représente 150 fois le génome humain. Cette vaste communauté possède des implications sur l'hôte, que ce soit biologique ou métabolique. Il a été montré que le microbiote intestinal se développe principalement durant les trois premières années de la vie, et que ce développement est lié à celui du système immunitaire. Les effets du microbiote sont, en cas de normobiose, avantageux pour l'hôte. Toutefois il arrive que certains perturbateurs environnementaux ou génétiques entraînent un déséquilibre entre les populations, ce que l'on appelle une dysbiose. Ce déséquilibre a été observé dans plusieurs pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ainsi qu'au cours de syndromes métaboliques. Différentes techniques sont utilisées afin d'améliorer le microbiote comme l'usage de prébiotiques, de probiotiques ou encore la transplantation du microbiote fécale (TMF). Cependant chaque bactérie peut posséder des compétences propres à elle-même, bénéfiques ou négatives pour l'hôte. Il est donc intéressant d'effectuer un descriptif des bactéries du microbiote afin d'identifier des bactéries immunomodulatrices.

Ici nous partons d'une communauté de 120 bactéries à partir desquels nous effectuons un échantillonnage d'abord génétique, puis par des tests immunologiques. Ainsi nous sélectionnons quelques bactéries qui seront utilisées afin de stimuler des cellules sanguines et d'observer par cytométrie en flux leurs capacités immunomodulatrices.

En conclusion il y a un nombre important de bactéries du microbiote qui n'induisent pas de profil immunologique particulier. Les bactéries choisies font partie du microbiote humain sain, *R. gnavus* induit une réponse inflammatoire importante alors que d'autres comme *Roseburia* semble induire aucune réponse, pour finir *L. pectinoschiza* semble induire une réponse régulatrice.

MOTS-CLÉS : Microbiote, échantillonnage, immunologie, modulateur, pro-inflammatoire, immunorégulateur