



HAL
open science

Impact du microbiote sur les fonctions immuno-régulatrices des cellules épithéliales intestinales humaines

Camille Martin-Gallausiaux

► **To cite this version:**

Camille Martin-Gallausiaux. Impact du microbiote sur les fonctions immuno-régulatrices des cellules épithéliales intestinales humaines. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS124 . tel-02926055

HAL Id: tel-02926055

<https://theses.hal.science/tel-02926055>

Submitted on 31 Aug 2020

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Equipe Fine – Micalis - INRA UMR1319

Camille Martin-Gallausiaux

Impact du microbiote sur les fonctions immuno- régulatrices des cellules épithéliales intestinales humaines

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Nicolas Lapaque

Présentée et soutenue publiquement le 15 Juin 2018

Jury

M. Philippe SEKSIK

Mme. Cécile ARRIEUMERLOU

M. Nicolas BARNICH

Mme Agnès RIBEIRO

M. Thierry PÉDRON

M. Nicolas LAPAQUE

Président

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Membre du jury invité

No man is an island entire of itself;
every man is a piece of the continent, a part of the main;
if a clod be washed away by the sea, Europe is the less,
as well as if a promontory were, as well as any manner of thy friends or of thine own were;
any man's death diminishes me, because I am involved in mankind.
And therefore never send to know for whom the bell tolls;
it tolls for thee.

John Donne, 1624

Table des matières

Introduction	11
I. L'épithélium intestinal, entre barrière et absorption.....	12
1. Structures et fonctions de l'épithélium intestinal	12
2. La barrière intestinale	15
II. L'épithélium intestinal : sentinelle de l'homéostasie	16
1. Les récepteurs Toll-like (TLR) et leur importance dans l'homéostasie intestinale	18
2. Les fonctions des récepteurs NLR et des RLR dans l'immunité innée intestinale	20
III. NFκB : clef de voûte de l'immunité innée.....	22
1. De l'activation des TLR à la régulation transcriptionnelle.....	22
2. La mécanique sophistiquée du complexe NFκB.....	23
3. Voie canonique, voie non-canonique : régulations croisées de NFκB	25
4. L'activation de NFκB par les récepteurs NOD.....	26
5. Le TIFAsome, nouvelle voie d'activation de NFκB.....	27
IV. Le contrôle de la réponse NFκB	29
V. Les molécules immuno-modulatrices sécrétées par les cellules épithéliales de l'intestin.....	33
1. Cytokines et métabolites.....	34
2. IDO1 et le tryptophane	37
3. Transforming growth factor B	43
VI. De la redécouverte de la flore intestinale au microbiote.....	46
1. Des animalcules au microbiote	46
2. Aperçu du microbiote en 2018	49
3. Les métabolites provenant du microbiote : un immense éventail de composés à découvrir et caractériser.....	52
4. Les Acides Gras à Chaînes Courtes (AGCC).....	57
VII. De l'ignorance immunologique au dialogue entre immunité et microbiote	62
Travail expérimental.....	66
Article I : Le butyrate produit par le microbiote intestinal, inhibe l'expression de l' <i>indolamine 2, 3-dioxygénase 1 (IDO1)</i> via deux mécanismes dans les cellules épithéliales de l'intestin humain.	67
Introduction à article.....	67
Butyrate produced by commensal bacteria down-regulates <i>indolamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO-1)</i> expression via a dual mechanism in human intestinal epithelial cells.....	69

Article II : Le butyrate sécrété par les bactéries du microbiote augmente l'expression du <i>Transforming growth factor beta 1 (TGFB1)</i> par le facteur de transcription SP1 dans les cellules épithéliales de l'intestin humain.....	99
Introduction à article.....	99
Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells.	100
Travaux non publiés : Importance de NFκB dans l'homéostasie intestinale.....	125
NFκB complex is a crucial player in the gut homeostasis.....	126
Discussion générale et perspectives	147
I. Résumé du travail expérimental	148
II. Limites techniques et forces de la stratégie choisie.....	149
III. Mécanismes de régulation de la transcription de gènes immuno-régulateurs par le microbiote dans les cellules épithéliales intestinales ?.....	151
IV. NFκB, gardien ambivalent de l'homéostasie intestinale	163
V. De la bactérie à l'écosystème intestinal.....	181
Conclusion.....	185
Liste de figures	186
Liste des tableaux	190
Bibliographie.....	191
Annexes des articles	216
Supplementary 1 A.....	216
Supplementary 1 B des publications 1 et 2.....	217

Résumé

La relation de symbiose, entre notre organisme et le microbiote intestinal, est un défi permanent pour notre système immunitaire. Le microbiote est indispensable au développement du système immunitaire et à sa maturation, ainsi qu'à l'homéostasie intestinale. Il contribue activement à la stabilité de sa niche écologique, en produisant de nombreuses molécules qui sont perçues par les cellules épithéliales de l'intestin, à l'interface entre le microbiote et le système immunitaire. En réponse aux signaux microbiens, les cellules épithéliales de l'intestin sécrètent un ensemble de molécules qui régulent l'activation du système immunitaire et participent ainsi à l'homéostasie intestinale. Cependant, les mécanismes qui permettent à l'organisme de tolérer les microbes commensaux tout en se défendant contre les organismes pathogènes, ne sont pas bien connus.

Les objectifs de cette thèse étaient d'une part, de mettre en évidence les espèces de bactéries intestinales capables de moduler la réponse immunitaire dans les cellules épithéliales de l'intestin humain. Au-delà de l'aspect descriptif, le but était également de déterminer les molécules bactériennes ainsi que les mécanismes cellulaires capables de modifier l'activité transcriptionnelle dans l'épithélium. Nous avons choisi de nous intéresser à la régulation des gènes *TGFB1* et *IDO1* dans les cellules épithéliales, qui en facilitant la différenciation des lymphocytes T naïfs en T régulateurs, sont impliqués dans la réponse anti-inflammatoire et en conséquence dans la tolérance intestinale. Nous avons également étudié les bactéries intestinales qui activent un facteur de transcription central dans l'homéostasie intestinale, NFκB, et les mécanismes moléculaires en jeu. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux voies de stimulation indépendantes des TLR et de MYD88, de par leur rôle protecteur dans l'intestin.

La première étape de ce travail a été de constituer une banque de surnageants d'une large sélection de bactéries présentes dans le microbiote humain puis de les tester sur des systèmes rapporteurs de *TGFb1*, *IDO1* et NFκB, dans une lignée modèle de cellules épithéliales intestinales (HT29). A l'issue de ce crible, nous avons démontré que les acides à chaînes courtes, en particulier le butyrate présent dans les surnageants bactériens des *Clostridiales* et des *Fusobacterium*, est un puissant modulateur de *TGFB1* et d'*IDO1*. Par différentes techniques, nous avons mis en évidence, l'activation par le butyrate de la transcription de *TGFB1*, via ses propriétés inhibitrices des déacétylases d'histone (iHDAC) et via le facteur de transcription SP1. Nous avons d'autre part, montré que le butyrate inhibe la transcription d'*IDO1* par deux mécanismes distincts via ses propriétés iHDAC, en ciblant la voie STAT1/IFNγ et par une seconde voie indépendamment de l'IFNγ. Enfin, nos travaux révèlent, que certaines bactéries intestinales libèrent des molécules qui activent NFκB, indépendamment des acides gras à chaînes courtes, des TLR et de MYD88, par NOD1 et, pour la première fois, via la voie ALPK1-TIFA-TRAF6. Dans son ensemble, ce travail met en valeur le rôle des cellules épithéliales intestinales, dans la réponse immunitaire induite par les bactéries commensales et dans la régulation de la symbiose hôte-microbiote.

Remerciements

C'est avec grand plaisir que j'écris ces remerciements, qui sont l'aboutissement d'un long travail commencé il y a bientôt 10 ans. Je suis très reconnaissante au centre de formation à distance de l'université d'Aix Marseille I de m'avoir donné l'opportunité d'entammer des études de sciences dites « dures », après ma première formation universitaire en sciences humaines. J'espère que l'université saura à l'avenir continuer de donner la possibilité d'étudier à ceux qui le souhaitent, y compris s'ils n'ont pas suivi le chemin attendu et s'ils ne disposent pas, à priori, des « compétences ». Je suis enfin reconnaissante à l'UPMC, d'avoir financé ma thèse.

Je souhaite remercier Philippe Seksik d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, Cécile Arrieumerlou et Nicolas Barnich pour la lecture et l'analyse de mes travaux de recherche en qualité de rapporteurs ainsi que Thierry Perdon et Agnès Ribeiro pour avoir eu la gentillesse de participer à ce jury en qualité d'examineurs.

Toute ma gratitude à Hervé Blottière, pour m'avoir fait rencontrer Nicolas Lapaque pendant mon Master et pour m'avoir accepté dans son équipe. Merci aussi de nous donner les conditions matérielles pour bien travailler.

Un très grand merci à Nicolas Lapaque, grand passionné de sciences, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci Nicolas de m'avoir pris en stage et de m'avoir aidé à obtenir une bourse de thèse. Merci de m'avoir fait découvrir le domaine fascinant des interactions entre humain et bactéries. Je mesure la chance d'avoir pu bénéficier de ton accompagnement scientifique, au quotidien, à la fois près de la « paillasse » et avec le recul qui m'a fait défaut lorsque j'étais dans le travail expérimental. Je te remercie aussi pour tes qualités humaines, ta patience, ta bienveillance, ton optimisme et ta gentillesse.

Merci bien sûr à Fabienne, notre Faby, toi qui m'a introduite à la culture anaérobie, qui m'a formé et qui m'a accompagné pendant ces années. Merci pour tout le travail que tu as fourni pour cette thèse, pour tes remarques scientifiques pertinentes, ton investissement et ton amour du travail bien fait.

Je tiens à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué à ce travail de thèse, de près ou de loin, travailler à vos côtés a été une expérience très enrichissante:

Pierre, mon deuxième mentor, pour tous tes conseils, les discussions scientifiques, ta patience, tes remarques toujours pertinentes.

Ludovica, avec qui j'ai partagé des milliers d'heures sous les hottes, en western ou au microscope. Merci pour ta gentillesse, ton aide et les Panettone.

Orlane, pour ta bonne humeur, ton rire et tes coups de gueules. Je te souhaite de t'épanouir dans ta nouvelle vie dans le grand Nord.

Thaïs de m'avoir aidé dans les affres de la biologie moléculaire, pour ton rire et ton entrain quotidien. Bienvenue au petit Tiago !

Thimothée, pour t'être investi dans la création et la sélection des lignées CRISPR. Merci pour ton aide de manière générale et pour le café sans lequel je n'aurais pas tenu.

Merci aussi à Alex, pour tous tes conseils et tes connaissances sur la biologie moléculaire et la microbiologie « classique ».

Il me faut aussi te dire merci Julie, qui fait partie du cœur de l'équipe, tu as toujours un petit mot d'encouragement et tu es toujours prête à donner un coup de main. Ton optimisme est précieux.

Merci à l'équipe, à ceux qui en sont partis, et ceux qui y sont toujours. Cette équipe a été une seconde famille, accueillante, chaleureuse et d'un grand soutien moral et nutritif. Une pensée particulière, à celles et ceux qui font vivre tous les jours cette équipe, qui sont investis dans le commun et sans qui cette famille perdrait beaucoup.

Un grand merci aux équipes sœurs, l'équipe Phylom et l'équipe ex America/NIM/Amipem, à Patricia, Marion, Céline et Xufei pour les discussions scientifiques, ou non, pour les conseils et les coups de main. Merci à Fabienne pour ton aide pour Western et ta persévérance et bienvenu en avance à tes petits. Merci Stan pour ta gentillesse et ta disponibilité à m'aider à sortir quelques choses des bases de données et tes conseils. Mes remerciements particuliers à Véronique pour les discussions scientifiques, ton aide, tes encouragements et ta gentillesse. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse.

Un merci plus général à tous ceux avec qui j'ai partagé de bons moments et que je n'ai pas cité directement.

A mes parents, merci de m'avoir donné le goût des sciences, de la recherche et une curiosité insatiable. Merci à ma famille, la petite, la grande, à mes amis, pour votre soutien sans faille et votre amour. Enfin, un remerciement très personnel à mon Nicolas T. Merci de partager tant d'aventures avec moi, la thèse et le reste... Merci de ton soutien indéfectible, ce travail de thèse te doit beaucoup. Promis, je ne me relancerai pas dans une thèse avant plusieurs années ! Merci à mon fils, ton sourire et ta joie sont des bouffées d'oxygène.

Introduction

I.L'épithélium intestinal, entre barrière et absorption.

1.Structures et fonctions de l'épithélium intestinal

Les muqueuses sont au cœur de la protection de l'organisme face à l'environnement. Elles sont formées d'une monocouche de cellules, l'épithélium, qui repose sur un tissu conjonctif, le chorion aussi appelée *lamina propria* (Figure I-1). Elles constituent une barrière physique et chimique qui maintient à distance les micro-organismes et les

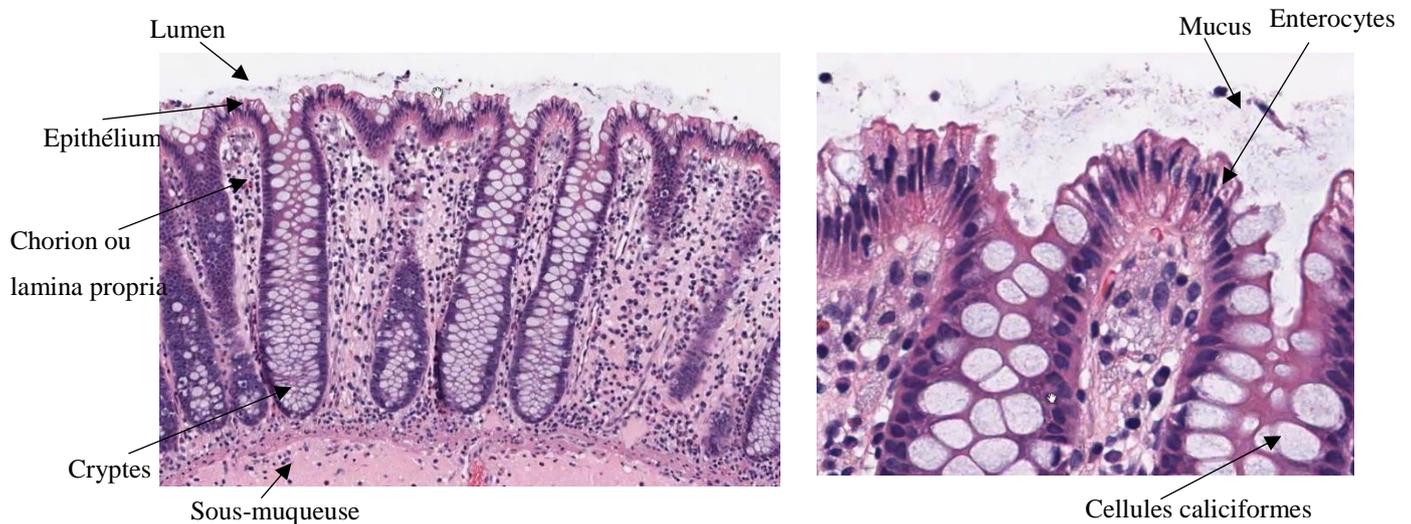


Figure I-1 : Structure du côlon humain. (A) Muqueuse intestinale avec des cryptes formées par les replis de l'épithélium (10X). (B) Zoom sur les cellules formant l'épithélium, cellules à mucus, entérocytes (40X). Adapté du cours de Dr A. Conolly Stanford Medical School.

sources d'agressions exogènes (UV, produits toxiques, pathogènes).

La muqueuse est organisée sur un axe vertical. À la base des cryptes de Lieberkühn se trouvent les cellules souches multipotentes, à l'abri de la lumière intestinale, puis en remontant vers le lumen, les cellules sont de plus en plus différenciées, jusqu'au sommet où les cellules sont éliminées par une forme d'apoptose particulière, l'anoïkis. Le processus de division asymétrique qui donne naissance aux nouvelles cellules intestinales au fond des cryptes, de différenciation et enfin d'exfoliation dans la lumière intestinale, est rapide. L'ensemble de l'épithélium intestinal est renouvelé en 3 à 5 jours, ce qui permet une réparation rapide en cas de lésions.

Dans l'intestin, l'épithélium, en plus de former une barrière protectrice, assure une autre fonction essentielle : l'absorption des nutriments et des liquides provenant de l'alimentation. Cette fonction se reflète dans sa structure formée de nombreux plis augmentant la surface d'échange, et dans le tissu musculaire sous-jacent qui assure le péristaltisme. Dans l'intestin grêle, la paroi est plissée en valvules conniventes, qui sont elles-mêmes repliées en villosités (villi). Les cryptes sont peu profondes. À l'inverse dans le côlon, où l'absorption des nutriments est moins importante, les villosités sont inexistantes et les cryptes plus profondes. L'épithélium forme le plateau strié apical (Figure I-2).

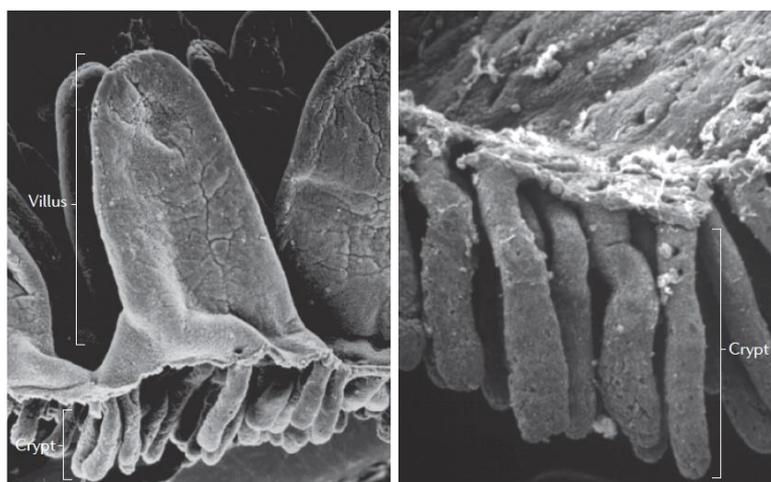


Figure I-2 : Structure de l'intestin grêle (A) et du côlon (B) humain pris en microscopie électronique à balayage (Baker, 2004)

La majorité des cellules épithéliales est formée d'entérocytes, nommés colonocytes dans le côlon. Les entérocytes permettent l'absorption des électrolytes, de l'eau et des nutriments. Ils sont coiffés de microvillosités qui sont des évaginations de la membrane plasmique. Si les colonocytes ne contribuent qu'à la marge à la digestion des aliments en eux-mêmes, ils ont un rôle central dans la réabsorption de l'eau, des électrolytes ainsi que des métabolites produits par le microbiote intestinal. En plus de cette population principale, d'autres types cellulaires assurent des fonctions spécialisées. Les cellules entéroendocrines, peu nombreuses (1 %), sécrètent des hormones. Les cellules à mucus, dites caliciformes synthétisent et sécrètent le mucus. Les cellules de Paneth sécrètent des molécules de défense et des facteurs de survie pour les cellules souches. Les cellules tuft libèrent des opioïdes et des cyclooxygénases. Enfin les cellules souches assurent le renouvellement cellulaire de l'épithélium. Une faible proportion de lymphocytes, dits intraépithéliaux (IEL) sont présents directement dans l'épithélium, entre les colonocytes. Dans la *lamina propria*, une plus grande variété de cellules immunitaires sont présentes, telles que des cellules dendritiques, des macrophages, des lymphocytes T et B. L'épithélium n'est pas séparé de la *lamina propria*, de nombreuses échanges ont lieu entre les colonocytes et les autres types cellulaires. De plus, certaines cellules dendritiques de la *lamina propria* sont capables d'échantillonner le contenu de la lumière intestinale directement, en étendant des dendrites entre les cellules épithéliales (Mowat and Agace, 2014; Sellers et al., 2014).

Les cellules de Paneth sont présentes uniquement dans les cryptes intestinales de l'intestin grêle. Elles assurent une fonction clef dans la défense de la barrière intestinale, en sécrétant des enzymes, des peptides antimicrobiens (AMP) comme les α/β défensines, l'angiogénine-4 ou encore RegIII γ (Regenerating islet-derived protein 3 gamma). Les défensines ont une activité antimicrobienne peu spécifique, à la fois contre les bactéries, les eucaryotes et certains virus grâce à leurs charges électrostatiques qui perturbent les membranes. Différents travaux ont montré que la production de ces AMP est stimulée par la présence des micro-organismes commensaux (Peterson and Artis, 2014). Dans le côlon les colonocytes sécrètent des peptides antimicrobiens comme la cathélicidine (LL37) ou la β -défensine.

Les cellules à mucus, encore appelées caliciformes, Goblet en anglais, sécrètent des mucines et des peptides régulateurs de la barrière intestinale (trefoil factor, resistin-like). Elles représentent jusqu'à 25 % des cellules épithéliales dans le côlon contre environ 10 %, plus haut dans le tractus intestinal (Figure I-3). Les mucines sont des glycoprotéines, aux modifications complexes, qui tapissent l'épithélium en une couche plus ou moins épaisse. La mucine 2 (MUC2) est la protéine la plus abondante du mucus. La couche de gel forme une zone dense qui bloque le passage des micro-organismes et des particules supérieures à 1000 nm. Le côlon est la zone du tractus où la quantité de micro-organismes est la plus importante, il est donc important de limiter les contacts de la flore et de l'épithélium (Gallo and Hooper, 2012). La couche atteint son épaisseur maximale dans le côlon où l'on distingue deux zones : l'une dense et exempte de microbes et l'autre plus lâche, qui permet la colonisation par des bactéries commensales. Les peptides antimicrobiens, les enzymes produits par les cellules épithéliales et les immunoglobulines A (IgA) produites par les plasmocytes, présents dans le gel de mucus renforcent cet effet de barrière. Le rôle fondamental du mucus dans l'homéostasie intestinale est démontré par le fait que les souris qui ne produisent pas de mucus développent des inflammations spontanées de l'intestin (Lu et al., 2011). Chez l'humain, certains patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) présentent des altérations des cellules à mucus et des cellules de Paneth (Heazlewood et al., 2008; Tytgat et al., 1996)

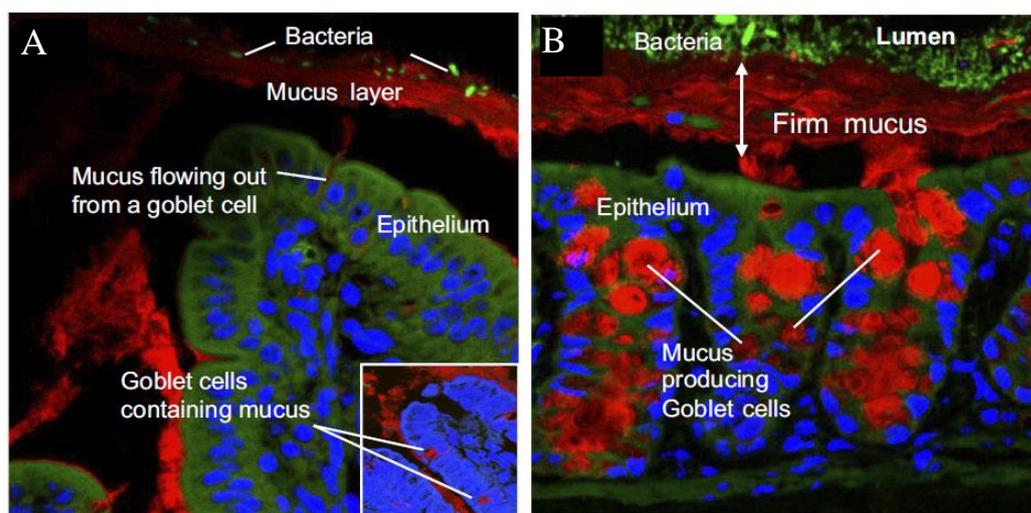


Figure I-3 : Microscopie à fluorescence sur des sections d'iléum (A) et de côlon (B) de souris, fixées au Carnoy. Mucine 2 (rouge), noyau (bleu), bactérie (vert), cellules épithéliales (vert). Adaptée de Wells (2016)

2. La barrière intestinale

En se différenciant les entérocytes se polarisent et établissent entre eux des jonctions, indispensables à la mise en place de la barrière intestinale. Elle limite l'accès du contenu de la lumière intestinale vers le milieu intérieur. Cette barrière physique et chimique repose sur une perméabilité intestinale régulée finement pour maintenir à distance le contenu de la lumière intestinale tout en facilitant l'entrée des nutriments. Plusieurs types de jonctions cellules-cellules existent avec des fonctions différentes : les jonctions serrées, adhérentes, communicantes et les desmosomes (Figure I-4). Elles forment des anneaux et des points d'ancrage autour de la cellule qui permettent l'adhésion entre les cellules et limitent le flux paracellulaire des ions et des molécules aux alentours de 10Å. Leurs rôles sont essentiels dans la stabilité de polarité apicale et basolatérale orientant ainsi le transport des molécules sécrétées vers la lumière ou vers l'hôte. Ces structures sont également des plateformes de signalisation qui font le lien avec le cytosquelette (Bischoff et al., 2014). Parmi la centaine de protéines impliquées dans les jonctions serrées, les protéines transmembranaires (claudine, occludine, zonuline, etc.) contrôlent le passage paracellulaire des petites molécules. Elles forment des pores qui contrôlent la diffusion paracellulaire, sélective, de molécules selon leur taille et leur charge. Par exemple, les claudines 2, laissent diffuser l'eau et les cations tandis que les claudines 17 permettent le passage des anions. Toutes les claudines n'ont pas le même rôle, certaines augmentent la perméabilité quand d'autres la diminuent (Krug et al., 2014; Wells et al., 2017).

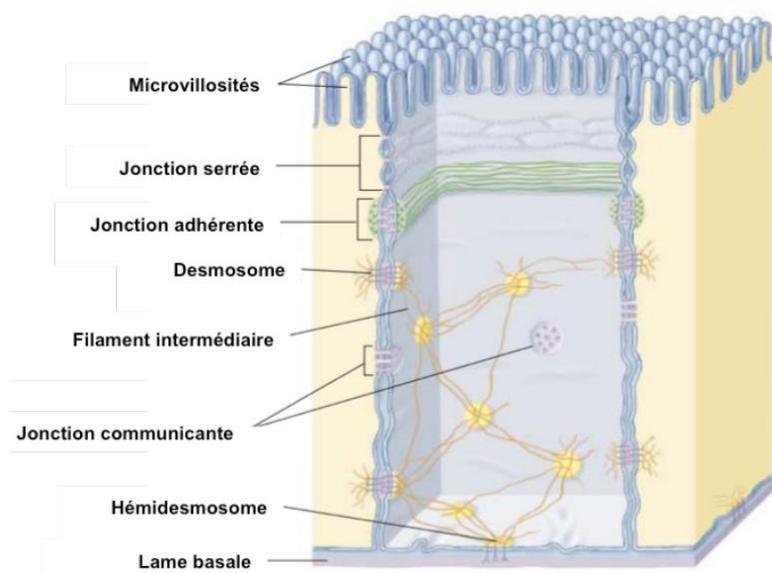


Figure I-4 : Schéma de la structure d'une jonction serrée (TJ) intestinale. Adapté de Charlotte Schmitt d'après Pearson 2012

L'augmentation de la perméabilité intestinale, en autorisant le passage de macromolécules (antigènes, toxines, etc.), voire de micro-organismes, normalement cantonnés à la lumière intestinale, semble impliquée dans de nombreuses maladies intestinales (MICI, ulcères, infections) ou non-intestinales (obésité, allergie, etc.). Certaines claudines, comme la claudine 2, qui augmentent la perméabilité sont plus abondantes chez les patients atteints de la maladie de Crohn, de rectocolite hémorragique ou encore dans la maladie cœliaque (Genser et al., 2016; Zeissig et al., 2007).

II.L'épithélium intestinal : sentinelle de l'homéostasie

La muqueuse intestinale est en permanence exposée à de nombreux signaux exogènes, de nature très variée. Ce flux est un véritable défi pour l'épithélium. Afin de préserver la santé de l'hôte, l'organisme doit lutter contre les microbes potentiellement pathogènes, tout en favorisant la coexistence avec les commensaux qui peuplent l'intestin. La difficulté réside en ce qu'il n'y a pas de différence de nature entre ces deux catégories de micro-organismes, dont certains peuvent passer, selon le contexte, de commensaux à pathogènes. Les échanges avec l'écosystème intestinal éduquent le système immunitaire par le développement de lymphocytes tolérogènes, spécifiques de peptides provenant des micro-organismes commensaux. Les cellules épithéliales ne forment pas seulement la barrière physique et chimique élaborée que nous avons décrit dans la partie précédente. Elles participent pleinement à l'immunité innée de l'hôte : elles détectent des motifs microbiens et sécrètent en réponse des molécules antimicrobiennes (défensines, lysozymes), de nombreuses cytokines (IL1 β , IL6, IL17a, IL22, IL23, etc.) et des chimiokines. Ces signaux contribuent à former un microenvironnement qui conditionne les cellules immunitaires innées présentes dans l'intestin : macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, etc. Les molécules produites par les entérocytes jouent aussi sur la différenciation et les fonctions des cellules immunitaires spécialisées, tels que les lymphocytes Th17, T régulateur et lymphocytes B. En créant ce microenvironnement, les cellules épithéliales participent à l'élaboration de l'immunité adaptative et permet au système immunitaire de répondre de manière adaptée à son environnement.

Les cellules reconnaissent les motifs microbiens par une grande diversité de récepteurs de l'immunité innée, connus sous le terme de PRR (Pattern-recognition receptor). Les PRR détectent de manière dynamique la présence de micro-organismes, donnent des informations sur leur quantité et leur nature en fonction du motif reconnu (virale, bactérienne, fongique, « protiste »). L'activation des PRR déclenche une cascade de signalisation activant des protéines cruciales, les « hub », telles que NF κ B, qui régulent des centaines de gènes différents. En fonction du contexte, la réponse cellulaire conduit tantôt à l'activation d'une réponse immunitaire à dominance pro-inflammatoire tantôt à une réponse à dominance anti-inflammatoire.

Il existe plusieurs familles de PRR, les récepteurs Toll-Like ou TLR, les Nod-like ou NLR (nucleotide-binding domain and leucin-rich repeats containing receptor), les RIG-Like ou RLR (retinoic acid-inducible gene I RIG-I-like receptor), les ALR (récepteurs de type AIM2) ou encore les récepteurs de léctines. À l'heure actuelle, les fonctions de certains de ces récepteurs sont encore mal connues. La spécificité des principaux ligands reconnus par les PRR majeurs ainsi que leur expression dans le côlon humain et murin sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Les PRR dans le côlon humain et murin. Spécificité des ligands reconnus, expression et localisation. NC : non connu, NE : Non exprimé, Texte* : résultats divergents. Mda- 5 (melanoma differentiation-associated protein 5), LPG2 (laboratory of physiology and genetics 2)

Nom	Ligands	Complexe	Méthode	Expression côlon humain	Localisation côlon humain	Côlon souris	Références
TLR1/TLR2	Lipopetides triacylés, a-synucléine	TLR2	Protéine et ARN	+	?	?	(Abreu, 2010)
TLR2/TLR6	Lipoprotéine dyacylée (lipoteichoïque)	TLR2	ARN	+	?	?	(Abreu, 2010)
TLR2	Lipopeptides, a.lipoteichoïque, Peptidoglycan zymosan, mannan Protéines virales Porine, PSA	TLR1 TLR6 CD14 Dectin-1	Protéine et ARN	+	Surtout dans les cryptes	Protéine et ARN	(Abreu, 2010; Ignacio et al., 2016)
TLR3	Polyinosinique-polycytidylique acide (PolyI :C) ARN double brin		Protéine et ARN	+++	Sommet des cryptes Basolatéral	ARN	(Abreu, 2010)
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS) Protéines virales mannane HSP70 eucaryote	MD2 CD14	Protéine et ARN	+	Basolatéral / apical dans les MICI.	Protéine et ARN	(Abreu, 2010; Mogensen, 2009)
TLR5	Flagelline	TLR5	Protéine et ARN*	±	Basolatéral et intracellulaire	?	(Abreu, 2010; Rhee et al., 2005a)
TLR7	ARN simple brin		ARN	±	?	?	(Abreu, 2010)
TLR8	ARN simple brin		Protéine et ARN	++	Sommet des cryptes Seulement dans les MICI*	NE	(Abreu, 2010)
TLR9	ADN non méthylé (CpG) ADN méthylé, hemozine		Protéine et ARN	+	Apical et basolatéral	Protéine et ARN	(Abreu, 2010; Coban et al., 2005)
TLR10	Listeria	TLR2 ? TLR1 ?	ARN	+	?	NE	(Brint et al., 2011)
TLR11	Profiline <i>T. gondii</i> Flagelline Uropathogène				Non fonctionnel	ANR	(Ignacio et al., 2016; O'Neill et al., 2013)
TLR12	Profiline				NE	+	(Ignacio et al., 2016)
TLR13	ARN 23S				NE	+	(Ignacio et al., 2016)
NOD1	Acide diaminopimelique (IE-DAP)		Protéine et ARN	+	Epithélium cytoplasme Surexpression dans les MICI	++	(Kim et al., 2004; Verma et al., 2013)
NOD2	Muramyl dipeptides (MDP)	Inflammasome	Protéine ARN	-	peu exprimé, sauf MICI dans des cellules de Paneth	?	(Lala et al., 2003; Ogura et al., 2003)
RLR (RIG-I, Mda-5, LPG2)	ARN viral, ADN viral	RIG-I Inflammasome	ARN	±	RIG-I	±	(Jamilloux and Henry, 2013; Lech et al., 2010)
NLRP3	Equilibre ionique, ATP, hemozine., motifs microbiens, ?	Inflammasome	ARN	±	?		(Jamilloux and Henry, 2013; Lech et al., 2010)
NLRC4	Flagelline Appareil de secretion III	Inflammasome		+	?	++	(Lei-Leston et al., 2017)
NLRP6	Motifs microbiens ?	Inflammasome	ARN	±	?	NLRP6 ++	(Jamilloux and Henry, 2013)
NLRP1,2,12	Toxines, Muramyl dipeptides, lipopeptides, Yersinia ?	Inflammasome	ARN	+	?	NLRP2-12 ++	(Jamilloux and Henry, 2013; Lech et al., 2010)
NLRP7	Motifs microbiens ? lipopetides	Inflammasome		?	?	NE	(Jamilloux and Henry, 2013)
NLRP10	?		ARN	++	?	++	(Jamilloux and Henry, 2013; Lech et al., 2010)

Le niveau d'expression des PRR contrôle la sensibilité des cellules aux motifs microbiens et ce faisant, le niveau de la réponse immunitaire. La localisation cellulaire des récepteurs détermine le compartiment échantillonné : lumière intestinale ou milieu intérieur. En effet, un récepteur localisé sur la surface apicale des cellules sera

potentiellement en contact avec le contenu intestinal. À l'inverse exprimé sur la face basolatérale, un récepteur pourra être activé par des signaux provenant du soi ou du non soi ou lors d'infection. Étonnamment, il existe peu de données sur le schéma d'expression des nombreux récepteurs le long du tractus intestinal et sur leur polarisation précise chez l'humain.

En augmentant les probabilités d'activation des réponses immunitaires, le nombre et la diversité des PRR semblent augmenter la difficulté pour l'organisme de maintenir l'homéostasie intestinale. En effet, malgré la barrière formée par le mucus, les cellules épithéliales sont en permanence en contact avec de petites molécules qui diffusent jusqu'à la muqueuse et avec certains micro-organismes. Or chez un humain en bonne santé, ce flux ne déclenche pas de réponse inflammatoire pathologique. Des mécanismes de régulation immunitaire sont donc à l'œuvre. Longtemps on a dépeint l'activation des PRR comme une cascade de signalisation induisant l'activation de facteurs de transcription comme NFκB, aboutissant à une réponse immunitaire inflammatoire. Les relations de symbiose reposaient sur la ségrégation spatiale permettant au système immunitaire d'ignorer la flore intestinale. Cependant de plus en plus de travaux indiquent que la réalité est probablement plus complexe. Le système immunitaire est constamment activé par les signaux de la lumière intestinale mais l'activation des PRR ne produit pas une réponse inflammatoire pathologique. Ces contacts sont physiologiques et nécessaires au développement de l'organisme hôte.

1. Les récepteurs Toll-like (TLR) et leur importance dans l'homéostasie intestinale

L'activité des TLR est régulée à plusieurs niveaux. Le premier niveau est celui de la détection des motifs microbiens (Figure II-1). Des publications ont mis en évidence une distribution non homogène des TLR dans l'intestin humain. Les microdissections laser de l'épithélium intestinal ont montré que les TLR2 et TLR4 sont faiblement exprimés dans les colonocytes humains sains. TLR3 qui détecte de l'ARN double brin, est abondant tout le long du tractus sur la face basolatérale des cellules. TLR5 est plus exprimé dans le côlon que dans l'intestin grêle. Selon les données disponibles, il semble que tous les TLR membranaires soient plutôt polarisés sur la face basolatérale des cellules chez l'humain à l'exception de TLR9 qui est également présent sur la face apicale (Tableau

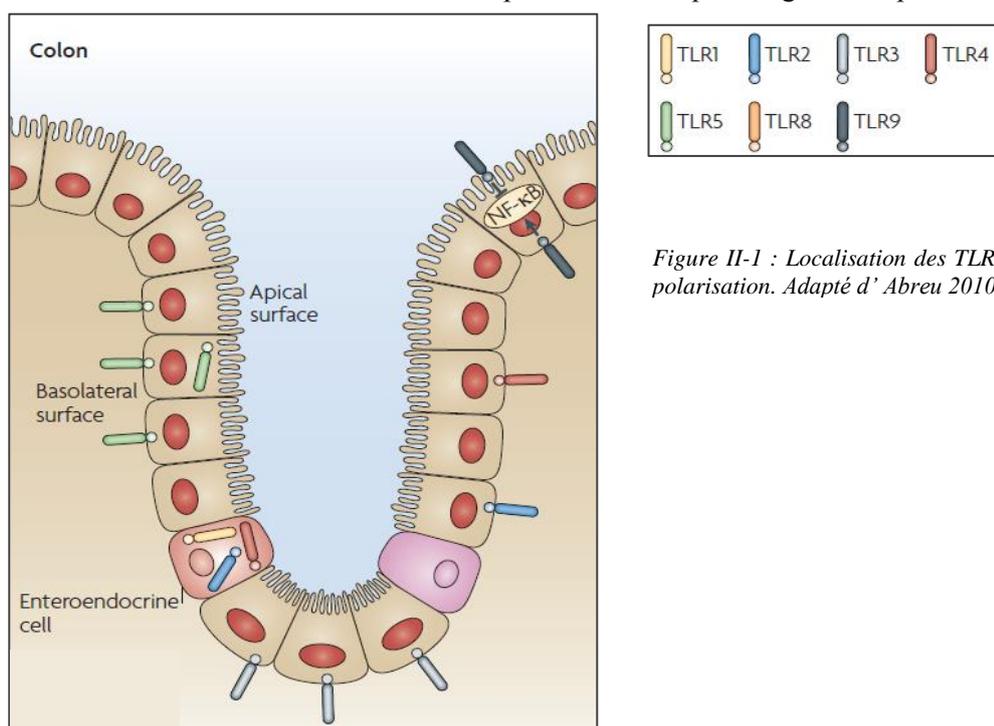


Figure II-1 : Localisation des TLR dans le côlon humain et polarisation. Adapté d' Abreu 2010

1). Chez le porc, et probablement chez l'humain, l'expression des TLR varie aussi selon l'axe crypte/sommet (Gourbeyre et al., 2015). Les études de localisation cellulaires chez l'humain sont à interpréter avec prudence du fait des potentiels biais techniques. Les TLR 7,10,11,12 et 13 ne semblent pas ou peu exprimés dans l'intestin sain, le niveau de variations selon les études (Abreu, 2010; Otte et al., 2004). Il existe des différences de localisation des TLR dans l'intestin, entre l'humain et la souris, qu'il est important de garder à l'esprit, dans les études sur la régulation du dialogue hôte-microbiote réalisées dans des modèles murins.

Sur le plan clinique, certains patients atteints de MICI présentent une surexpression de certains TLR (TLR4/5) et une diminution des TLR7/8. Ces différences sont corrélées à la sévérité de l'inflammation et la sécrétion de cytokines inflammatoires (Dlugosz et al., 2017; Sánchez-Muñoz et al., 2011). D'autre part, les études d'associations génomiques (GWAS) indiquent que la maladie cœliaque serait associée aux TLR7 et TLR8 (Netea et al., 2012). L'expression seule, des TLR, donne des informations limitées sur leur contribution à l'équilibre intestinal ou au contraire au développement de pathologies. En effet, l'activité de certains TLR dépend de la présence de cofacteur comme CD14 et MD2. Ainsi, TLR4 nécessite la présence de MD2 pour être fonctionnel. De même, de nombreux TLR doivent former des hétérodimères avec d'autres TLR pour être actifs, ce qui implique leur coexpression et leur colocalisation dans le même compartiment cellulaire (Trinchieri and Sher, 2007).

Au début des années 2000, différentes équipes ont montré que l'activation des TLR par les bactéries commensales contribue à l'homéostasie intestinale et favorise la réparation en cas de lésions (Rakoff-Nahoum et al., 2004). La détection des micro-organismes et la mise en place d'une réponse immunitaire endommage la muqueuse intestinale lorsqu'elle est longue ou inadaptée. L'équilibre entre l'activation des TLR, nécessaire à l'homéostasie intestinale et la réponse inflammatoire pathologique repose sur différentes régulations. L'exposition répétée de cellules épithéliales à des ligands inhibe l'expression des TLR à leur surface et diminue la signalisation intracellulaire liée à leur activation. D'autre part, plusieurs études indiquent que l'activation des TLR9, TLR5 et TLR2 inhibent la réponse inflammatoire. TLR2 a particulièrement été étudié, il est impliqué dans le maintien de l'équilibre symbiotique entre hôte et micro-organismes en favorisant une réponse tolérogène (Kashiwagi et al., 2015; Round et al., 2011a). Un autre élément qui permet à l'organisme de répondre différemment aux stimuli est, nous l'avons évoqué, la localisation cellulaire des récepteurs. La stimulation de TLR9 provoque des réponses cellulaires différentes, en fonction de sa localisation sur la face apicale ou basolatérale (Lee et al., 2006a). TLR5 est un autre exemple intéressant : les souris qui n'expriment pas TLR5 développent des colites spontanées et ont de profondes modifications du microbiote intestinal. Ces données laissent penser que TLR5 a un rôle dans le contrôle du dialogue hôte-microbiote (Vijaykumar et al., 2007). Cependant son implication n'est pas clairement établie puisque entre 10 et 23% de la population humaine est porteuse d'un variant non fonctionnel du récepteur sans que cela ne soit corrélé à des pathologies (Netea et al., 2012). La tolérance des cellules épithéliales vis-à-vis des signaux microbiens ne repose pas uniquement sur un défaut de réponse mais aussi sur des réponses actives aux changements de l'environnement. Dans un contexte non-pathologique, l'activation des TLR intestinaux par des microbes commensaux conduit à la production de molécules qui participent à l'équilibre entre les fonctions de tolérance et de défense. Ainsi l'activation de TLR2 par le polysaccharide A favorise la différenciation en lymphocytes T régulateurs producteurs d'IL10 et protège des infections par *H. hepaticus* (Mazmanian et al., 2008; Round and Mazmanian, 2010)

2. Les fonctions des récepteurs NLR et des RLR dans l'immunité innée intestinale

Les NLR partagent une même structure composée de trois domaines : un domaine N-terminal variable, un domaine central de liaison aux nucléotides NBD ou NACHT (NAIP, CIITA, HET-E, and TP1) et un domaine de 20 à 30 acides aminés riches en leucine en partie C-terminal (LRR).

Les récepteurs cytoplasmiques NOD1 et NOD2 sont les membres de la famille LNR les mieux décrits. Ils possèdent un ou deux domaines CARD (Caspase recruitment domain) dans la partie N-terminale qui reconnaissent des fragments de peptidoglycane provenant dans la membrane des bactéries. Chez l'humain, le récepteur NOD1 est fortement exprimé par les côlonocytes ainsi que dans la plupart des lignées cellulaires épithéliales (Kim et al., 2004; Verma et al., 2013). À l'inverse NOD2 est peu exprimé par les côlonocytes mais le récepteur est exprimé par les cellules de Paneth dans l'intestin grêle (Hisamatsu et al., 2003; Lala et al., 2003; Ogura et al., 2003). Chez certains patients atteints de MICI le récepteur NOD2 est surexprimé dans le côlon, notamment par les cellules infiltrées et par des cellules qui ont un profil proche des cellules de Paneth. Les variations génétiques de *NOD2* sont l'un des facteurs génétiques qui augmente chez l'humain, la susceptibilité à développer la maladie de Crohn (Berrebi et al., 2003; Ogura et al., 2003). Cependant les récepteurs NOD1 et NOD2 n'ont pas seulement une fonction pro-inflammatoire, ils sont également impliqués dans les effets bénéfiques la flore intestinale sur l'homéostasie intestinale.

D'autres membres des NLR, à savoir NLRP1 et NLRP3 (Nod-like receptor family pyrin containing) participent à l'homéostasie intestinale comme composants de structures appelées « inflammasomes » (Martinon et al., 2002). Il existe différents types d'inflammasomes qui détectent des signaux de dangers très variés parmi lesquels : des motifs microbiens (NLRP 1, 3, 4, 6, 7, 12), des toxines (NLRP1), le relargage d'ATP ou encore une concentration anormale d'ions (NLRP3). NLRP3 reconnaît de nombreux signaux de stress cellulaire: hyperglycémie, céramides, acides gras, agrégats protéiques, différents cristaux (cholestérol, amiante, alun), ATP extracellulaire, toxines bactériennes, acides nucléiques bactériens et viraux, ou encore hémozoïne (pigment de *Plasmodium*) pour ne citer que quelques exemples. Les motifs reconnus par les différents NLRP ne sont pas toujours connus. Il y a des relations de coopérations entre différents types de PRR. Ainsi l'activation des TLR augmente le niveau d'expression de NLRP3 et favorise l'activation de l'inflammasome (Gros Lambert et al., 2018; Jamilloux and Henry, 2013). L'inflammasome formé par NLRP3 est le mieux décrit. C'est une plateforme comprenant un adaptateur et la pro-caspase 1. La formation de l'inflammasome active la caspase 1 ce qui permet la formation des cytokines pro-inflammatoires, IL1 β et IL18 sous leur forme active, qui contrôlent la mort cellulaire par pyroptose. Cet assemblage est illustré dans la Figure II-2.

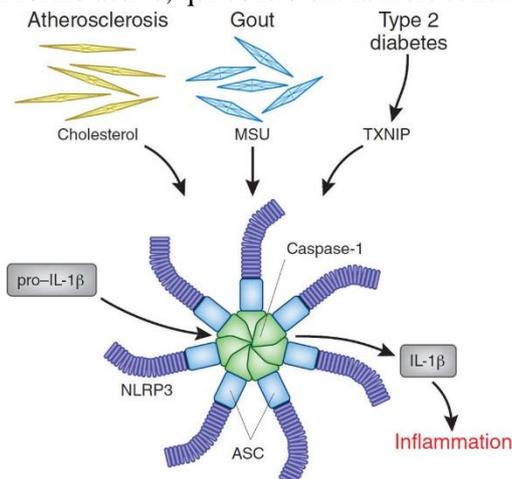


Figure II-2 : Inflammasome NLRP3 formé d'un heptamère de NLRP3, des protéines adaptatrices ASC et des pro-caspases 1 en son centre. La formation de l'inflammasome conduit l'activation de la caspase 1 et au clivage de l'IL1 β . ASC (Apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD). Tiré d'Hansson 2011.

De nombreuses pathologies sont liées à des défauts de régulation de l'inflammasome induisant des inflammations délétères. Les patients atteints de mutations de NLRP3 développent des maladies auto-inflammatoires précoces, des cryopyrinopathies, des syndromes Muckle-Wells. Nous n'aborderons pas plus en détails le rôle de l'inflammasome, ni celui des ARL et des lectines dans le maintien de la tolérance intestinale puisqu'ils n'ont pas été directement abordés lors du travail présenté ici.

Une vue d'ensemble, des principaux types de PRR et leurs voies de signalisation, est proposée dans la Figure II-3. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux TLR et aux récepteurs NOD, présents dans la partie supérieure du schéma.

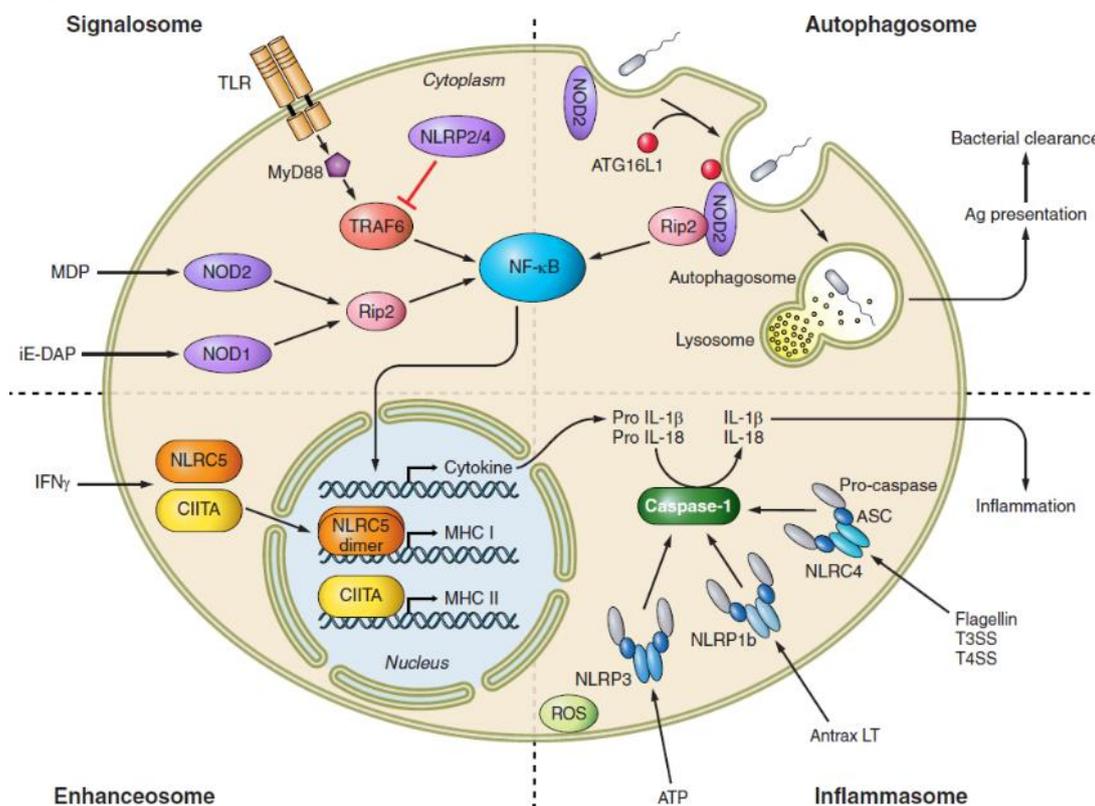


Figure II-3 : Représentation schématique des différentes voies de reconnaissance de signaux exogènes. Les récepteurs TLR, NOD et certains NLRP ont principalement une activité liée à NFκB (en haute). Certains récepteurs NLR agissent sur la transcription des voies de présentations antigéniques (en bas à gauche) tandis que d'autres sont nécessaires à la formation de l'inflammasome (en bas à droite). Tiré de Motta., 2015

III.NFκB : clef de voûte de l'immunité innée

1. De l'activation des TLR à la régulation transcriptionnelle

La liaison d'un ligand microbien à un récepteur déclenche une cascade de signalisation dans la cellule, spécifique à chaque type de PRR. Les TLR sont localisés à la membrane plasmique et dans les endosomes. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire LRR (Leucine rich repeat) et un domaine intracellulaire qui contient un domaine TIR (Toll/IL1 receptor) (Figure III-1). Lorsqu'un ligand est reconnu par un TLR, le récepteur subit un changement de conformation qui rend le domaine TIR accessible aux protéines adaptatrices qui vont-elles-mêmes recruter différentes kinases (Figure III-2).

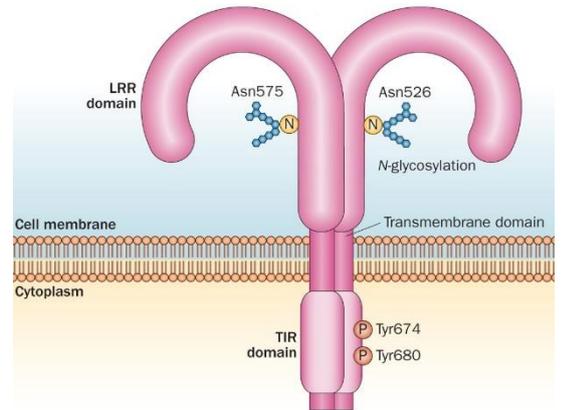


Figure III-1 : Structure d'un TLR, ici TLR4 avec un domaine extracellulaire LRR et un domaine cytoplasmique TIR. Tiré de Gomez 2014

La protéine MYD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88) est un adaptateur qui se lie au domaine TIR des TLR. Elle est nécessaire à l'activité de tous les TLR sauf de TLR3. Une fois les domaines TIR engagés avec

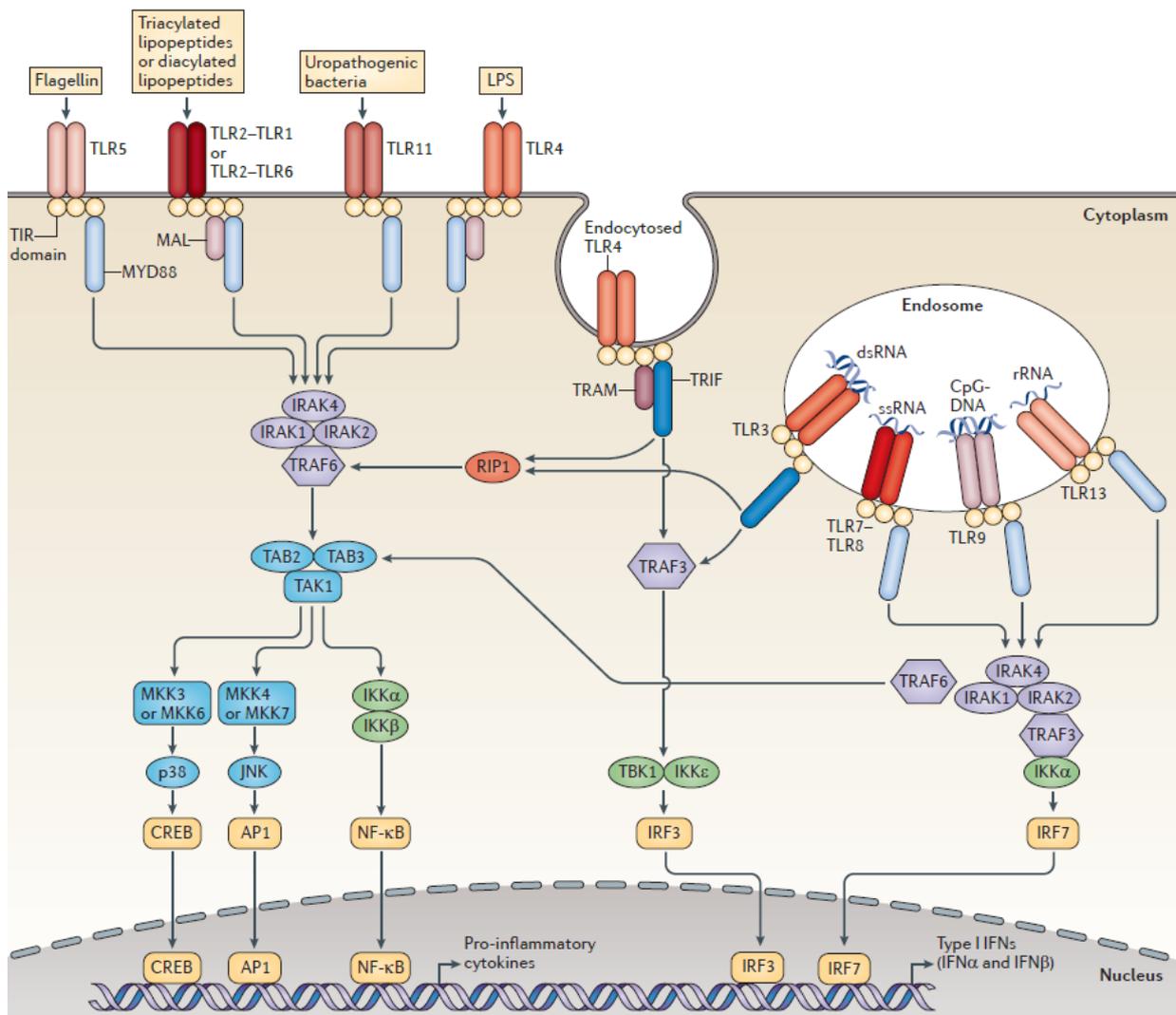


Figure III-2 : Illustration des différentes voies de signalisation mises en jeu par l'activation des TLR et de leur interconnexions. Tiré d'O'Neill 2013.

MYD88, des kinases de la famille IRAK (IL1R associated kinases) et TRAF (TNF receptor-associated factors) phosphorylent un premier niveau de kinases qui phosphorylent elles-mêmes d'autres protéines cibles. La cascade de phosphorylation provoque plusieurs réponses cellulaires possibles : les MAP kinases (Mitogen-activated protein kinase) activent les facteurs de transcription CREB (Cyclic AMP-responsive element-binding protein) et AP-1 (Activator protein 1), tandis que la phosphorylation des kinases inhibitrices de NFκB (IKK) induit l'activation du complexe de transcription NFκB (Nuclear factor κB).

D'autres protéines adaptatrices ont un rôle dans la signalisation des TLR : MAL (MyD88 adapter-like/TIRAP), TRAM (TRIF-related adapter molecule/TICAM2) et TRIF (TIR domain-containing adapter-inducing IFNβ /TICAM). TLR4 est un cas particulier, sa voie de signalisation fait intervenir deux adaptateurs : MYD88 dans un premier temps est recruté sur les domaines TIR, il est endocyté, puis TRAM et TRIF prennent la place de MYD88. TLR3 est lui uniquement associé à TRIF. Enfin, la protéine MAL est nécessaire dans certains cas, à l'activité de TLR2 et de TLR4. Le type d'adaptateur engagé lors de l'activation du récepteur détermine la nature de la réponse cellulaire. Par exemple TRIF stimule la voie de l'interféron de type I (IFN) via TBK (Tank-binding kinase 1) et le facteur de transcription IRF3 (IFN-regulatory factor 3). Plusieurs voies de signalisation ont été décrites correspondant à MYD88, TRIF et TRAM. Elles ne sont pas indépendantes les unes des autres. Des protéines passerelles comme TRAF et RIP1 (receptor-interacting protein 1) font le lien entre les voies MYD88 et les voies et permettent un certain couplage entre ces voies (O'Neill and Bowie, 2007; Rahman and McFadden, 2011).

2. La mécanique sophistiquée du complexe NFκB

La voie d'activation du complexe NFκB comprend plusieurs étapes illustrées dans la Figure III-3. L'activation des adaptateurs et des premières kinases entraînent la phosphorylation des kinases inhibitrices de NFκB : IKKα, IKKβ ou NEMO puis la dégradation de l'unité IκB qui séquestre les sous-unités formant le complexe NFκB. La

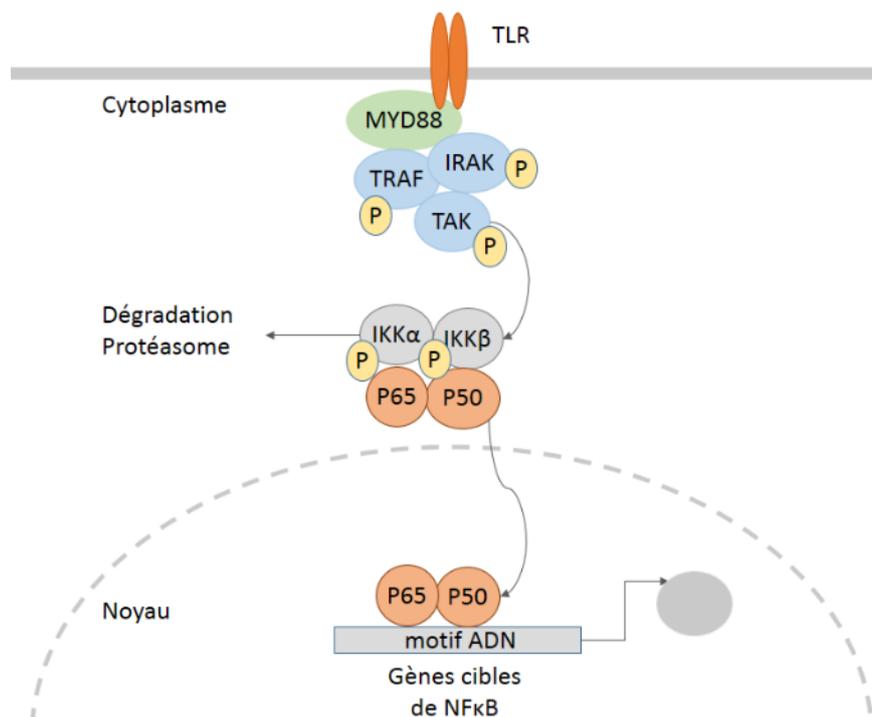


Figure III-3 : Schéma illustrant le mécanisme d'activation de la voie classique de NFκB suite à l'activation d'un TLR

dégradation d'I κ B rend accessible le domaine de localisation nucléaire du complexe NF κ B (Pasparakis, 2012). Celui-ci transloque ainsi dans le noyau et y joue le rôle de facteur de transcription en se liant à des motifs ADN spécifiques.

Chez les mammifères la famille NF κ B il comporte 5 membres : RelA (p65), RelB, c-Rel et p50/p105 (NF κ B1) et p52/100. Les protéines p50/p105 (NF κ B1) et p52/100 sont synthétisés sous forme de précurseurs qui sont ensuite clivés. Différents homodimères ou hétérodimères peuvent se former entre ces membres conduisant à la constitution de complexes spécifiques ayant des voies de signalisation et des effets transcriptionnels distincts (Figure III-4). Cette diversité explique que NF κ B peut à la fois être impliqué dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-infectieuse et dans l'homéostasie intestinale. Dans la voie dite classique ou canonique de NF κ B, l'activation de TLR4 par du LPS, du TNF α ou de l'IL1, par exemple entraîne la phosphorylation d'I κ B α par le complexe IKK, son adressage au protéasome puis la translocation de l'hétérodimère p50-RelA dans le noyau. La cinétique de cette signalisation est rapide : en une dizaine de minutes le facteur de transcription est actif dans le noyau. La dégradation d'I κ B β ou d'I κ B ϵ conduit à une activation plus lente du complexe NF κ B. Une fois dans le noyau, NF κ B subit différentes modifications, phosphorylation et acétylation, qui déterminent la spécificité de liaison aux promoteurs cibles (Afonina et al., 2017; Perkins, 2007). En fonction des voies activées, NF κ B a un effet d'activateur transcriptionnel ou de répresseur sur des centaines de gènes, tels que des cytokines (IL1, 6,8, 10, 12, 17, TNF, etc.) des récepteurs immuns (CD3, CD86, IgG, CMHI, TLR2, TLR9, etc.), des protéines d'adhésion (DC-SIGN, ICAM, etc.), de réponse au stress (CYP, HSP, SOD, NADP, etc.), de régulation PKA, PKC, l'apoptose (BCL2, ASC, FAS, TRAF, etc.), des enzymes (Glucose-6-phosphatase, Gramzyme B, Catherpsin, MMP, etc.), des facteurs de transcriptions (E2F3, HIF, GATA3, IRF, P53, etc.). (<http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>). De plus, le recrutement des cofacteurs sur le complexe NF κ B associé au promoteur modifie lui aussi le type de réponse cellulaire induite. Ainsi l'association du complexe p65/p50 avec les histones acétyltransférases CBP/P300 (CREB-binding protein) favorise la transcription de certains gènes (Hayden and Ghosh, 2008; Zhang et al., 2017a). A l'inverse, les interactions entre NF κ B et des récepteurs nucléaires provoquent la transrépression de gènes. Par exemple, l'interaction entre p65 et le récepteur de glucocorticoïdes, l'empêche de s'associer avec IRF3 ce qui inhibe la transcription des gènes en réponse à l'activation de TLR4 (Pascual and Glass, 2006; Perkins, 2007).

3. Voie canonique, voie non-canonique : régulations croisées de NFκB

À côté de la voie classique et de toutes ces variantes, il existe une voie qui met en jeu d'autres protéines du complexe NFκB : p100 qui une fois activées devient p52 et RelB. Ce complexe dit « non-canonique » reconnaît des motifs ADN distincts et génère des réponses cellulaires différentes de la voie classique. Cependant, l'activation de cette voie est mal connue. La voie non-canonique ne semble pas être activée via les TLR mais plutôt par des ligands ayant une forte affinité pour les récepteurs de la famille du TNF (Tumour necrosis factor) comme la lymphotoxine α1β2 ou RANK (Receptor activator for NFκB). Cette voie est également ciblée par des virus et des bactéries pathogènes (Bista et al., 2010). La stimulation de la voie non-canonique entraîne la phosphorylation d'IKKα ce qui inhibe la voie classique. IKKα augmente la vitesse de recyclage de RelA, provoque son détachement des promoteurs et diminue ainsi la transcription des gènes cibles. Les souris dépourvues de la kinase IKKα fonctionnelle présentent un niveau d'inflammation important (Lawrence et al., 2005). La protéine NIK (NFκB-inducing kinase), adaptateur de la voie non-canonique, est également capable de limiter l'activation de la voie classique de NFκB en bloquant la translocation de RelA (Mao et al., 2016).

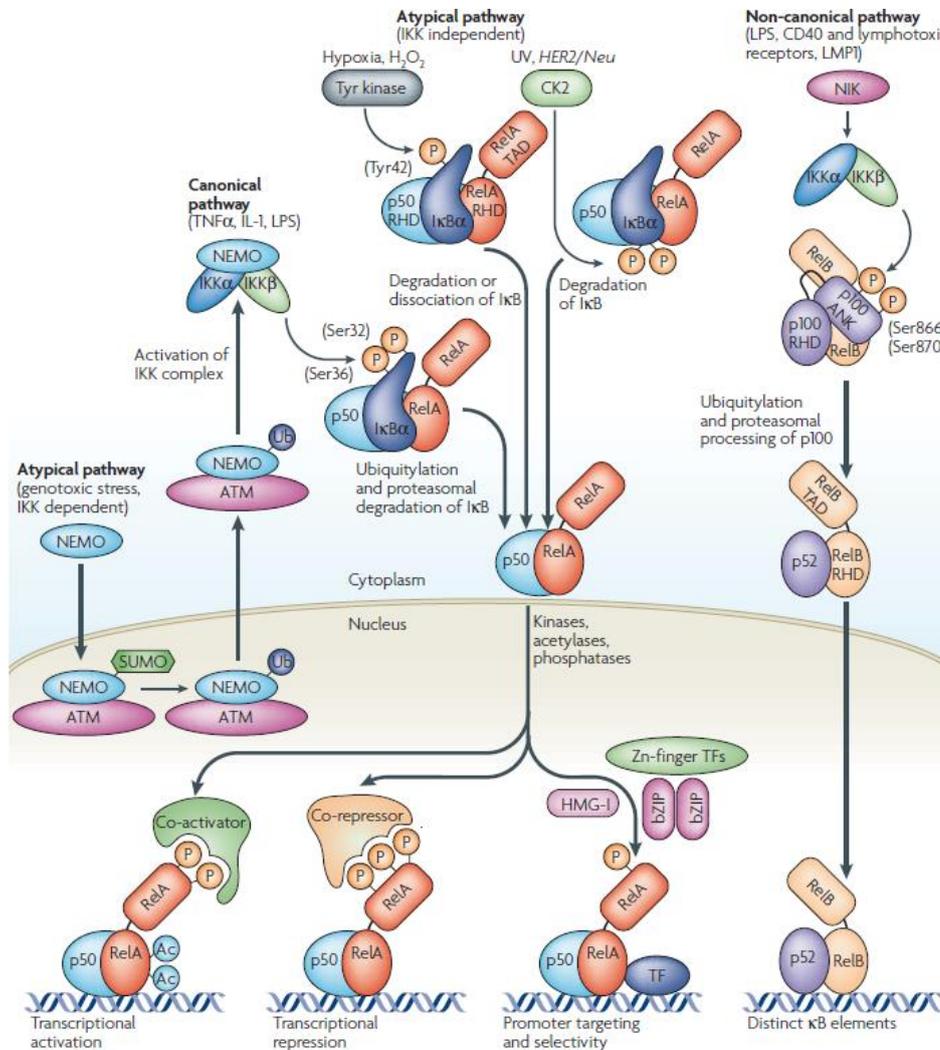


Figure III-4 : Des stimuli différents activent des voies NFκB distinctes. Chacune est caractérisée par des sous-unités qui constituent le complexe NFκB, un mécanisme d'activation et des cibles transcriptionnelles qui leurs sont propres. Tiré de Perkins 2007

Les différentes kinases qui contrôlent la libération du complexe NFκB sont particulièrement importantes au niveau des cellules épithéliales pour maintenir l'homéostasie intestinale. Toute altération de leur fonctionnement induit des

dysfonctionnements profonds: inflammation locale et systémique ainsi qu'un défaut de contrôle du microbiote intestinal (Bonnegarde-Bernard et al., 2014; Eckmann et al., 2008; Giacomini et al., 2015; Nenci et al., 2007; Takahashi et al., 2014; Zaph et al., 2007). La voie non-canonique est encore peu étudiée bien qu'elle pourrait intervenir dans la régulation de la réponse immunitaire intestinale.

Les cibles transcriptionnelles des voies NFκB dépendent de la nature du stimulus, du type de complexe NFκB ainsi que du contexte cellulaire. De nombreux gènes régulés par NFκB interviennent dans la barrière intestinale, notamment des cytokines, des chimiokines et des peptides antimicrobiens (Pasparakis, 2012). NFκB contrôle la transcription de protéines pro-inflammatoires comme les IL1, IL6, IL8, le TNFα, l'IFN, également de récepteurs à cytokines, chimiokines, immunoglobulines, des TLR ou encore des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) (Hoffmann and Baltimore, 2006). Tous ces signaux sont importants pour la lutte contre les infections, les agressions physiques ou chimiques. Les effets inflammatoires de NFκB sont contrôlés par l'IL10, l'IL13, l'IL4, l'IFNα ou encore le TGFβ, eux-mêmes induits par NFκB, dans des boucles de rétrocontrôle. Les cytokines anti-inflammatoires ont donc des rôles clés dans la restauration et le maintien de l'homéostasie intestinale.

4.L'activation de NFκB par les récepteurs NOD

Les récepteurs NOD1 et NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain) reconnaissent des motifs de la paroi bactérienne provenant du peptidoglycane grâce à une région riche en leucine (LRR) comme illustré dans la Figure III-5. Les fragments de peptidoglycane sont modifiés par des enzymes dans les endosomes avant que les peptides puissent être reconnus. Les premières études sur ces récepteurs ont décrit une localisation dans le cytoplasme et les vésicules, ce qui a pu laisser penser que les récepteurs NOD étaient des détecteurs de pathogènes intracellulaires. Or, suite à l'activation du récepteur NOD2 par le muramyle dipeptide, celui-ci s'associe grâce au domaine COOH terminal à la membrane plasmique des entérocytes polarisés, ce qui est nécessaire à la détection des signaux bactériens (Barnich et al., 2005). Les mécanismes par lesquels les ligands extracellulaires parviennent jusqu'aux récepteurs ne sont pas entièrement connus. Les fragments peuvent entrer dans la cellule par la phagocytose de bactéries, de fragments ou encore par des transporteurs. Les cellules épithéliales expriment les transporteurs de peptides PepT1 et PepT2 (Peptide transporter) impliqués dans l'activation de NOD (Dalmaso et al., 2010; Nguyen et al., 2009).

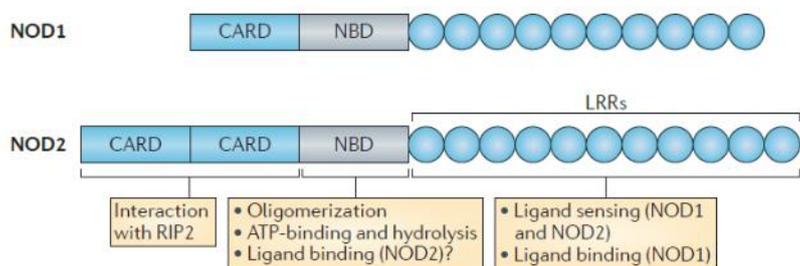


Figure III-5 : Schéma des différents domaines des récepteurs NOD. CARD: caspase recruitment domain, NBD Nucleotide-binding domain =NATCH, LRR: leucine-rich repeats. Adapté de Phipott, 2014.

La liaison du ligand sur les récepteurs NOD entraîne la formation d'un dimère via leur domaine NATCH. Ce dimère est une plateforme de signalisation sur laquelle la kinase RIP2 (receptor interacting protein 2) est recrutée ainsi que la kinase TAK1 (TGF-β-associated kinase 1). Ce complexe active Nemo (IKKγ) qui phosphoryle IκB et conduit à sa dégradation par le protéasome ce qui libère NFκB, rejoignant ainsi la cascade de signalisation décrite pour les TLR dans le paragraphe précédent. Les récepteurs NOD et certains TLR peuvent agir en synergie ce qui

conduit à une activation très soutenue de la voie NFκB ou au contraire participer à sa régulation (Van Heel et al., 2005; Strober et al., 2006).

5. Le TIFAsome, nouvelle voie d'activation de NFκB

En dépit de tous les travaux déjà publiés sur la voie NFκB, l'équipe de Scott Gray-Owen a montré en 2015 que de nouvelles voies de détection des micro-organismes peuvent encore être découvertes. Un sous-produit de la synthèse du LPS, l'heptose biphosphate (HBP) est reconnu par les cellules ce qui provoque l'activation de NFκB (Gaudet et al., 2015). L'HBP est un précurseur de structure membranaires, communes à toutes les bactéries (couche S, capsule, flagelle) et de structures spécifiques aux Gram⁻ comme le LPS (Figure III-6).

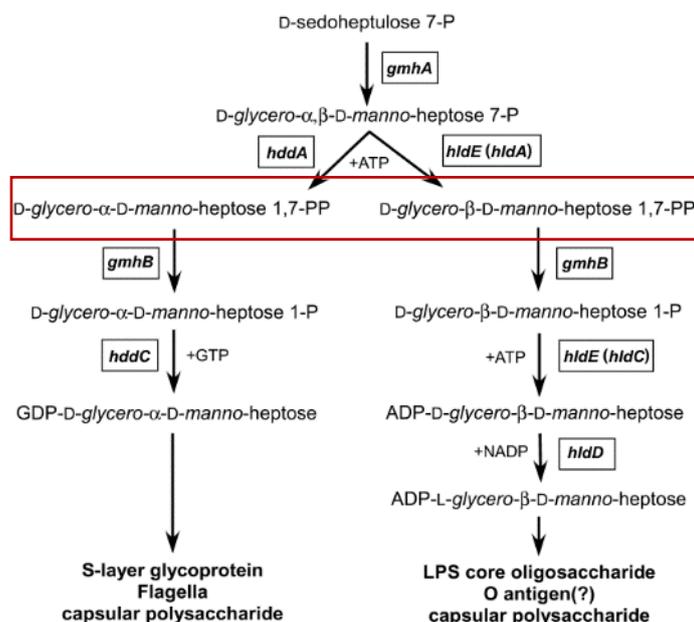


Figure III-6 : Synthèse de l'heptose biphosphate chez les bactéries. L'HBP est encadré en rouge. Tiré de Valvano 2002

La forme D-glycero-β-D-manno-heptose-7-biphosphate semble spécifique aux bactéries à Gram⁻ tandis que la forme D-glycero-α-D-manno-heptose-7-biphosphate peut être présente dans la paroi de toutes les bactéries (Mcarthur et al., 2005; Valvano et al., 2002). Dans la partie centrale du LPS, l'heptose se trouve sous la forme monophosphate. Or lorsqu'il est lié à un seul phosphate, il n'a pas d'activité sur NFκB. Seul l'heptose biphosphate active la voie NFκB. L'HBP est libéré dans le milieu extracellulaire par certaines bactéries comme *Neisseria gonorrhoeae*. Il entre dans la cellule eucaryote probablement par un mécanisme d'endocytose qui reste à caractériser. L'HBP semble plus couramment relargué dans le cytosol des cellules infectées par des bactéries intracellulaires ou via un appareil de sécrétion comme cela a été montré pour *Salmonella*, *Shigella* ou encore *Helicobacter* (Gaudet et al., 2017; Milivojevic et al., 2017; Zimmermann et al., 2017). Une hypothèse est que TIFA assure une fonction de rhéostat, qui stimule NFκB en fonction de la répllication des bactéries à l'intérieur de la cellule infectée. Ce rôle serait complémentaire de l'activation rapide et transitoire de NFκB par NOD1, à la suite de la rupture initiale de la vacuole d'infection par *Shigella* (Gaudet et al., 2017).

Dans le cytosol l'HBP active la kinase ALPK1 (Alpha kinase 1) qui phosphoryle directement ou non, TIFA (TNF- α receptor-associated factor-interacting protein with forkhead-associated domain). TIFA à l'état inactif est sous forme de dimère. Lorsqu'il est phosphorylé, il change conformation pour constituer via son domaine FHA (forkhead-associated domain) un complexe plus large avec TRAF6, le TIFAsome. Ce nouveau complexe entraîne l'oligomérisation et l'ubiquitination de TRAF6 qui provoque ensuite l'activation de NF κ B, de manière similaire à ce qui est décrit pour les TLR. D'autres protéines, comme TRAF2, peuvent également participer à la formation TIFAsome, illustrée dans la Figure III-7. C'est une voie d'activation rapide de NF κ B, de l'ordre de quelques dizaines de minutes lorsque l'HBP est dans le cytosol. Pour le moment, il n'y a pas de données montrant si l'HBP se lie directement à ALPK1 ou s'il existe d'autres intermédiaires. De même, la question de savoir si ALPK1 phosphoryle directement TIFA ou si d'autres facteurs entre en compte, n'est pas tranchée. L'HBP n'est pas le seul signal reconnu par le TIFAsome, une équipe a démontré dans un modèle de cellules endothéliales que les stress oxydatifs et inflammatoires provoquent la formation du TIFAsome et active NF κ B, qui à son tour induit à la structuration de NLRP3 en inflammasome (Lin et al., 2016).

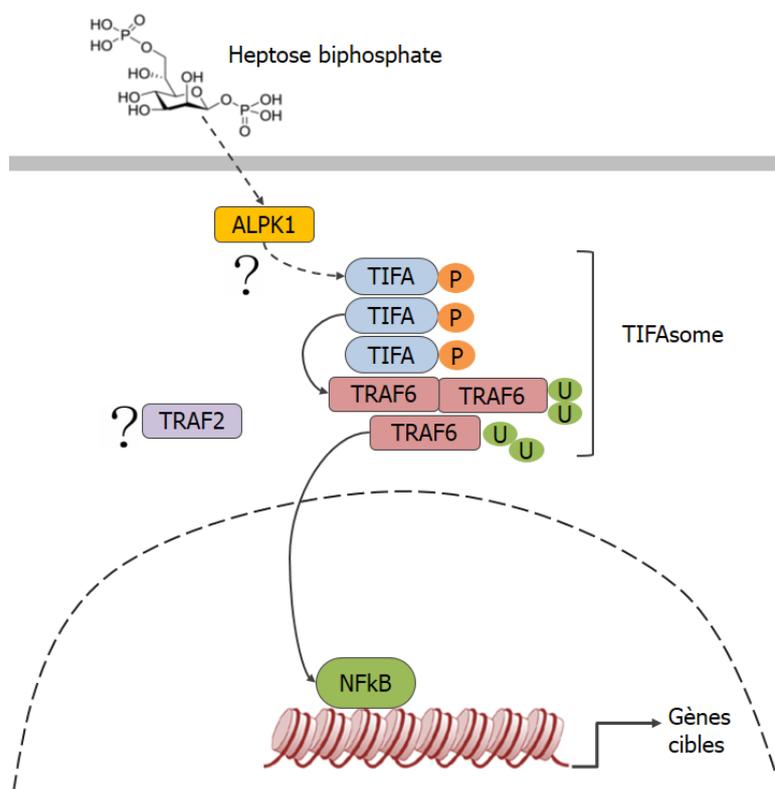


Figure III-7 : Mécanisme de formation du TIFAsome et d'induction de NF κ B. Les points d'interrogation illustrent les points qui restent en débat.

La voie de TIFA est fonctionnelle dans les cellules épithéliales intestinales. La question se pose de savoir si elle participe à la régulation des micro-organismes commensaux et à dans l'homéostasie locale. Des travaux ont montré que l'expression de TRAF6 dans les cellules épithéliales permet de limiter la réponse immunitaire contre le microbiote, lors de colites induites chez la souris. Cet effet est indépendant des TLR. Cependant l'étude étant antérieure à la publication démontrant que TIFA est un nouveau récepteur de l'immunité innée, l'implication de cette voie dans l'effet protecteur de TRAF6 n'a pas été étudiée (Vlantis et al., 2015). De même, les souris ayant des cellules dendritiques déficientes en TRAF6 ne sont plus capables de tolérer leur microbiote intestinal. Le mécanisme en jeu, indépendant de MYD88, n'avait pas pu être déterminé et pourrait également impliquer TIFA (Han et al., 2013)

IV. Le contrôle de la réponse NFκB

Les cellules épithéliales étant constamment en contact avec des micro-organismes qui peuvent activer la voie NFκB, la régulation de cette voie de signalisation est cruciale dans le maintien de la tolérance intestinale. La réponse induite par NFκB doit être limitée dans son ampleur et dans sa durée. Tous les mécanismes de cette régulation ne sont pas encore compris mais différents travaux ont montré que cette régulation a lieu à plusieurs niveaux (Liew et al., 2005; Shibolet and Podolsky, 2007).

- Le premier niveau est celui de l'activité du complexe NFκB lui-même que nous venons de décrire. Il s'agit de maintenir un équilibre entre la transcription de molécules inflammatoires et anti-inflammatoires en fonction des kinases et des membres formant le complexe NFκB.
- Un second niveau de contrôle est assuré par différentes protéines régulatrices cytoplasmiques qui interviennent en général sur les kinases dans les voies de signalisation. Cette régulation est essentielle afin de limiter les effets délétères dus à l'activation des PRR dans les cellules épithéliales et dans leur environnement.
- Enfin, un troisième niveau limite l'activation de NFκB en jouant sur le contact et l'affinité des ligands avec leurs récepteurs. Des facteurs physiques, comme le mucus, ou des molécules, comme le facteur Trefoil, limitent ces interactions.

Il est difficile de faire une description complète des molécules jouant un rôle de régulateur négatif dans les voies de signalisation aboutissant à l'activation de NFκB. Comme nous l'avons montré dans le paragraphe précédent, ces voies sont nombreuses et font intervenir beaucoup de molécules, offrant ainsi de nombreuses cibles à de potentiels inhibiteurs. Un schéma récapitulatif est proposé dans la Figure IV-1.

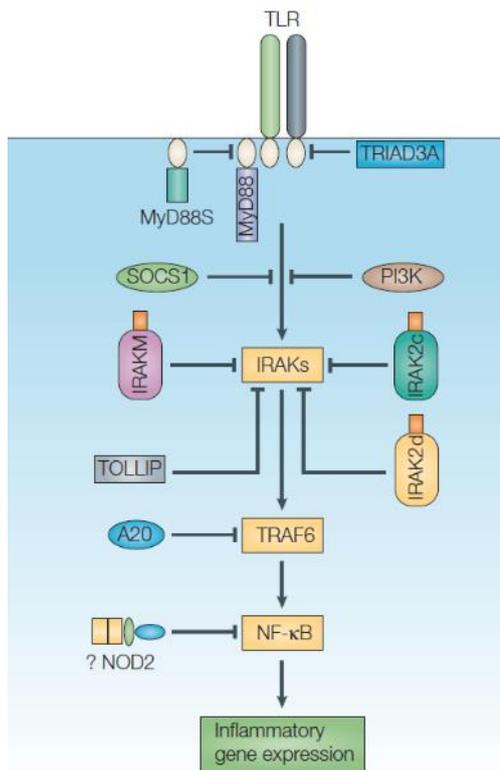


Figure IV-1 : Schéma illustrant l'action de certains régulateurs négatifs de la voie NFκB. La molécule IRAK-m n'est pas exprimée dans les cellules épithéliales. La molécule PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibe l'activation des TLR par différents mécanismes (p38, JNK, NFκB). TRAF3A ubiquitine les TLR. Illustration tirée de Liew 2005.

TOLLIP

Dès 2004, des expériences sur des lignées de cellules épithéliales montrent que l'exposition au LPS ou à l'acide lipotéichoïque induit la production d'IL8 via TLR2 et TLR4. Or si ces mêmes cellules sont réexposées aux mêmes stimuli, le niveau d'expression de ces TLR diminue et les cellules ne sécrètent plus de l'IL8. Ce phénomène a été baptisé « hypo-réponse » (Otte et al., 2004). Plusieurs équipes ont identifié le rôle de la protéine TOLLIP (Toll-interacting protein) dans ce processus. Chez l'humain, son expression suit un gradient de l'estomac, où le niveau est le plus bas, au côlon où le niveau est le plus haut suivant ainsi la répartition des micro-organismes dans le tractus digestif. L'activation de différents TLR est limitée par la liaison de la protéine TOLLIP avec les kinases IRAK diminuant ainsi leur phosphorylation (Shibolet and Podolsky, 2007).

A20

La protéine A20 également connue sous le nom de TNFAIP3 est une protéine cytoplasmique avec un domaine à doigt de zinc, qui possède une double activité, ubiquitine ligase et déubiquitinase. Elle est induite par différents stimuli dont le TNF, l'IL1 ou lors de l'activation de NFκB.

On a montré qu'elle déubiquitine TRAF6, la molécule relais centrale de la cascade de signalisation des TLR de surface ainsi que de TIFA. D'autre part, A20 diminue l'activation de TLR3 par certains virus. Les souris qui sont déficientes en A20 développent une inflammation générale et spontanée très importante qui entraîne leur mort après quelques semaines. Ces effets peuvent être limités par le traitement des souris aux antibiotiques ou par l'inactivation de MYD88 (Turer et al., 2008; Vereecke et al., 2014).

SOCS

D'autres protéines comme les SOCS (Suppressor of cytokine signaling), jouent sur les voies de signalisation JAK/STAT induites notamment par NFκB, les IFN et la liaison des cytokines à leur récepteur. Ces protéines sont l'un des composants du complexe E3 ubiquitine ligase qui ubiquitine et induit la dégradation de protéines cibles. Elles bloquent l'activité des coadaptateurs TRAM et MAL nécessaires respectivement aux adaptateurs TRIF et MYD88. Elles sont capables de bloquer les protéines TRAF. Elles inhibent également l'activation des MAPK, de JAK et des éléments induits par l'IFN (IRF) (Duncan et al., 2017).

Les leurres et les compétiteurs

Certaines molécules, nommées leurres de récepteurs, sont des formes tronquées et solubles de TLR qui inhibent l'activité des récepteurs cellulaires par un mécanisme de compétition de liaison avec les ligands (sTLR2, sTLR4). Certains leurres proviennent d'épissage alternatifs, pour TLR4 par exemple, tandis que d'autres sont le résultat de modification post-transcriptionnelles, dans le cas de TLR2 pour lequel on trouve jusqu'à 6 isoformes solubles. Ce

mécanisme est illustré dans la Figure IV-2. Cette forme de régulation n'est pas limitée aux TLR, des variants d'épissage tels que MYD88s, IRAK2c, IRAK2d, entrent en compétition avec l'isoforme fonctionnel (Liew et al., 2005; Shibolet and Podolsky, 2007).

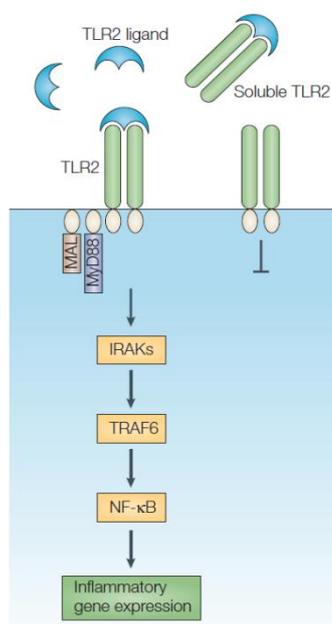


Figure IV-2 : Mécanisme de compétition pour les ligands entre la forme soluble de TLR2 et le TLR2 membranaire. Tiré de Liew 2005

Les régulateurs membranaires

Il existe également des régulateurs membranaires comme SIGIRR/IL1-R (Single immunoglobulin IL-1 receptor-related ou IL-1 receptor), TRAILR (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor) ou ST2L (ou IL1RL1 Interleukin 1 Receptor-Related Protein). Ce sont des récepteurs transmembranaires qui inhibent l'activité des TLR par des mécanismes distincts (Liew et al., 2005). Le récepteur ST2L s'associe à MYD88 et MAL par son domaine TIR et entre ainsi en compétition avec les TLR. Il existe également un isoforme soluble de ST2 (ST2s). TRAILR appartient à la superfamille du TNF, il ne contient pas de domaine TIR mais agit en stabilisant IκBα ce qui a pour effet de diminuer la translocation nucléaire de NFκB. Enfin, le récepteur SIGIRR membranaire est fortement exprimé par les cellules épithéliales intestinales. Il existe sous la forme IL-1R2 et IL-1R8 en plus d'avoir une forme soluble sIL-1R2. Via son domaine TIR, SIGIRR inhibe l'activation des TLR, en particulier de TLR4. Son domaine extracellulaire interfère avec l'activation du récepteur de l'IL1 dont il est proche parent. En outre SIGIRR prend part à la formation du récepteur de l'IL37, cytokine anti-inflammatoire (Molgora et al., 2018).

Les récepteurs NLR

L'activation chronique de NOD2 diminue la réponse induite par les ligands de TLR2 et TLR4 en bloquant en partie la translocation nucléaire de NFκB (Liew et al., 2005). Ces données peuvent sembler contradictoires avec les effets de synergie entre TLR et NOD, décrits plus haut. L'équilibre entre coopération et régulation dépend vraisemblablement de signaux encore non élucidés. Plusieurs études vont dans le sens d'un effet protecteur de NOD2, régulant l'inflammation, ce qui est cohérent avec ce qui est connu au niveau clinique chez l'humain notamment chez les patients atteints de MICI (Berrebi et al., 2003; Simms et al., 2008). Toutefois les mécanismes par lesquels NOD2 contribue à réguler NFκB sont toujours en discussion (Philpott et al., 2014). Au contraire des récepteurs NOD, les autres membres de la famille NLR n'induisent pas l'activation de la voie NFκB, mais plutôt son inhibition. NLRP2, 3 et 4 ont plutôt tendance à inhiber NFκB. L'activation de TLR4 est ainsi bloquée par NLRP3 via des modifications de TRAF6 et l'inhibition des voies IRF.

PPAR γ

Le facteur de transcription PPAR γ (Peroxisome proliferator-activator receptor γ) est activé par certains TLR comme TLR4 et régule des gènes également ciblés par NFκB. PPAR γ peut se lier à RelA dans le noyau et provoquer son exportation du noyau vers le cytoplasme. Ce mécanisme peut limiter dans le temps la réponse induite par NFκB. Le rôle de PPAR γ dans la tolérance intestinale est d'autant plus important qu'il est fortement exprimé dans les cellules

épithéliales du côlon humain (Dubuquoy et al., 2006). De plus, plusieurs publications ont montré que certaines bactéries commensales activent PPAR γ , par des mécanismes distincts (Kelly et al., 2004; Nepelska et al., 2012, 2017). Les patients atteints de rectocolites hémorragiques mais non ceux atteints de la maladie de Crohn, ont une diminution de PPAR γ dans les cellules épithéliales du côlon (Dubuquoy et al., 2003).

Parmi l'éventail des mécanismes de régulation de la voie NF κ B présenté ici, il est intéressant de noter que certains PRR paraissent être plus régulés que d'autres. Ainsi TLR4 est la cible du plus grand nombre de facteurs d'inhibition. La raison précise n'est pas connue mais la sur-activation de TLR4 à des effets particulièrement délétères, pouvant mener jusqu'à la mort. De même, la plupart des inhibiteurs ciblent la voie MYD88, à l'exception d'A20 et de TRAILR. Ce déséquilibre pourrait être un biais dû au fait que la voie MYD88 est la voie la plus étudiée. Il est probable que l'on connaisse également mieux ses régulations. Une autre partie de l'explication vient du rôle central de MYD88 dans l'immunité innée lié aux TLR. Ce qui frappe d'autre part, c'est la variété des points de contrôles qui ciblent des éléments non redondants. Chaque élément semble ainsi être nécessaire mais non suffisant pour contrôler globalement NF κ B. Ces mécanismes en cascade sont très modulables ce qui permet à l'organisme de produire une réponse immunitaire plus ou moins aiguë en fonction de la pathogénicité des micro-organismes, tout en maintenant une tolérance face aux commensaux. Les motifs et les molécules produits par les microbes vivant dans l'intestin participent à la fois à l'activation de l'immunité innée via NF κ B et à son contrôle via des boucles de rétrocontrôle. Le complexe NF κ B joue un rôle clef dans l'immunité innée mais il n'est pas le seul acteur, d'autres facteurs de transcription comme AhR (Aryl hydrocarbon receptor) (Qiu et al., 2012; Spits and Mjösberg, 2012), AP-1 ou encore les IRF sont importants mais ils ne seront pas abordés dans cette introduction (Kieser and Kagan, 2017).

Les cellules épithéliales sont des acteurs majeurs de la détection et de la transmission de ces informations à leur microenvironnement participant ainsi à la mise en place d'une tolérance locale tout en assurant la défense de l'intégrité de l'organisme lorsque c'est nécessaire.

V. Les molécules immuno-modulatrices sécrétées par les cellules épithéliales de l'intestin

Les cellules épithéliales contribuent à la mise en place et à la pérennité de relations hôte-microbes symbiotique en libérant un éventail de molécules dans la lumière intestinale. Elles participent à la formation d'un microenvironnement qui favorise la différenciation des cellules immunitaires professionnelles vers des fonctions de régulation de l'immunité et le maintien de ce phénotype. Les cellules dendritiques et les macrophages sont les relais entre l'immunité innée et adaptative : elles présentent les antigènes aux lymphocytes, facilite leur prolifération, à leur polarisation et régulent leur localisation (« homing »). Les molécules immuno-modulatrices émises par les cellules épithéliales sont dirigées à la fois vers les cellules dendritiques et les macrophages mais elles touchent également les lymphocytes.

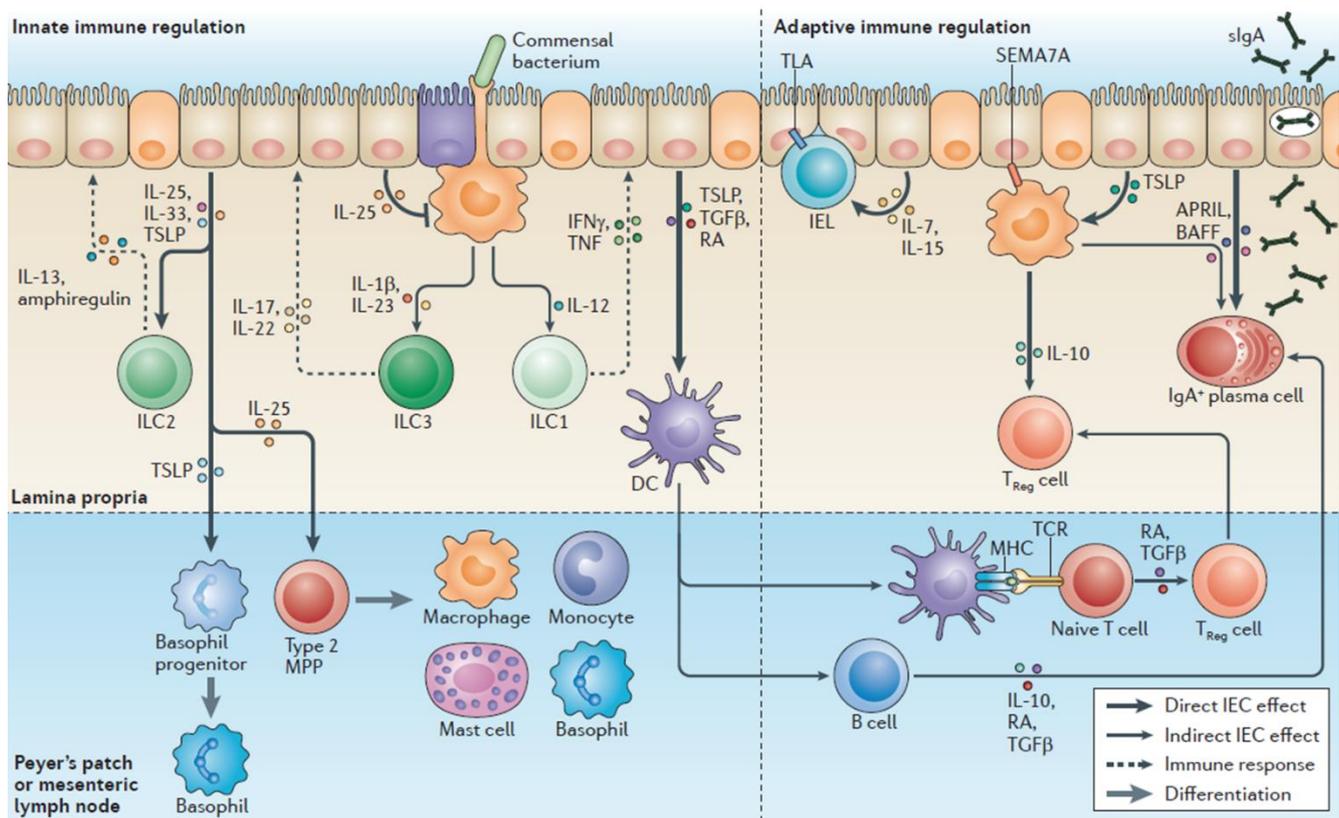
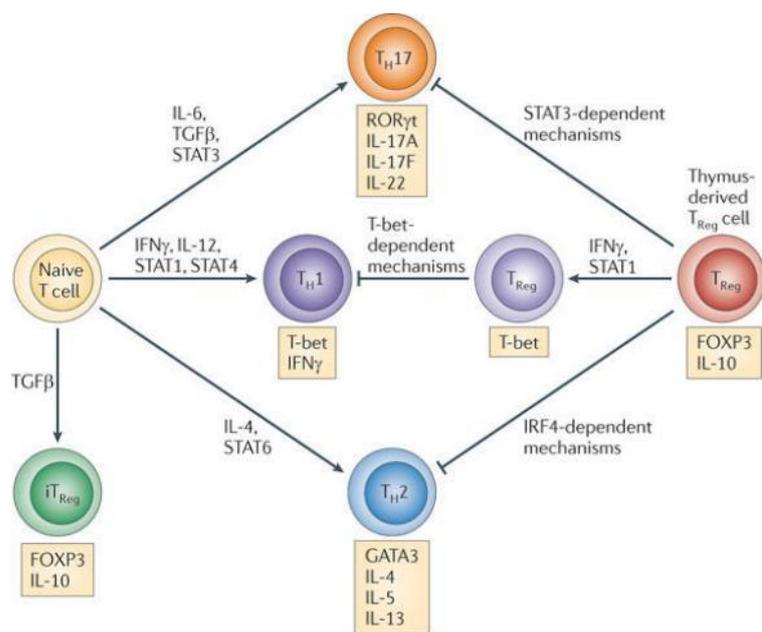


Figure V-1: Les cellules épithéliales intestinales (IEC) s'inscrivent à l'interface des micro-organismes intestinaux et des cellules immunitaires professionnelles présentes dans l'épithélium (IEL) et dans la lamina propria. Elles sécrètent de nombreuses molécules immuno-modulatrices comme TSLP ou encore TGFB. L'IL10 promeut la différenciation en Treg tout en induisant sa propre sécrétion. TLA : thymus leukaemia antigen; sIgA : secretory IgA; IEL : intra-epithelial lymphocyte; SEMA7A : IEC-expressed semaphorin 7A. Adapté de Peterson et Artis, 2014

De nombreuses cytokines sont sécrétées par les cellules épithéliales humaines : IL1, IL6, IL8, IL10, IL25, IL33, TNF, TGFB, ou encore TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) (Okumura and Takeda, 2017; Saenz et al., 2008). Elles produisent aussi des facteurs de stimulation des lymphocytes B comme APRIL (A proliferation-inducing ligand) ou BAFF (B cell-activating factor) (Abreu, 2010). Certains métabolites provenant de l'activité d'enzymes comme l'acide rétinoïque ou les dérivés des acides aminés modifient aussi la réponse immunitaire intestinale. Les molécules sécrétées par les cellules épithéliales participent avec les cellules dendritiques et les macrophages à contrôler l'immunité intestinale (Figure V-1).

Ces molécules ont des mécanismes d'action distincts. Certaines agissent directement sur la polarisation des lymphocytes T et B, tandis que d'autres agissent de manière pléiotropique. Chez des individus sains, il y a un équilibre entre les différents types de lymphocytes T et B présents dans le compartiment muqueux qui détermine l'équilibre entre inflammation et tolérance. Les types de lymphocytes T peuvent être schématiquement répartis entre deux groupes : ceux qui exercent luttent contre les dangers, principalement exogènes, et ceux qui régulent cette réponse. Les lymphocytes B, les différents types de lymphocytes T CD4 (Cluster of differentiation) Th1, Th2, Th17 (Helper), T CD8, intra-épithéliaux (IEL), et les ILC (Innate lymphoid cells) sont les principaux effecteurs de l'immunité, indispensables à la protection de l'organisme contre les pathogènes. A l'inverse, les lymphocytes Treg (T regulator), les Tr1 (Type 1 regulatory) et les Breg ont une fonction de contrôle de la réponse effectrice essentielle pour limiter les effets délétères de la réponse immunitaire effectrice. La spécialisation ou polarisation des lymphocytes est gouvernée par l'engagement du récepteur TCR/BCR (T/B cell receptor) ainsi que par les cytokines et les molécules immuno-modulatrices présentes dans leur environnement (Figure V-2). La majorité des Treg du côlon est induite en localement (i.e en dehors du thymus) sous l'action des cellules dendritiques qui expriment le marqueur CD103 (Tanoue et al., 2016). Des travaux montrent que le répertoire des antigènes reconnus par les Treg intestinaux est spécifique à leur environnement et que ce répertoire doit être varié pour maintenir l'homéostasie (Lathrop et al., 2011; Nishio et al., 2015). Nous n'aborderons pas ici l'impact des cellules épithéliales sur les lymphocytes B, ni sur les différents types de leucocytes, autres que les cellules dendritiques, qui ne sont pas au centre de cette thèse.



Nature Reviews | Immunology

Figure V-2 : Spécialisation des lymphocytes T naifs en différents types fonctionnels selon les signaux immuno-modulateurs présents dans l'environnement. Cette spécialisation peut avoir lieu dans le thymus ou en périphérie (iTreg). Tiré de Campbell 2011

1. Cytokines et métabolites

TSLP, l'IL-25, et l'IL-33

Les cytokines TSLP, l'IL25, et l'IL33 produites par les cellules épithéliales de manière basale, et en particulier par les cellules tuft, ont fait l'objet de nombreux travaux (Saenz et al., 2008). Plusieurs équipes ont mis en évidence

leurs impacts sur la régulation à la fois de l'immunité innée et de l'immunité adaptative en particulier antiparasitaire. L'IL25 est produite par les cellules tufts qui contribue à l'activation des ILC2. Les ILC2 sécrètent à leur tour de l'IL13 stimulant ainsi les Th2 et permet d'éliminer les infections parasitaires (Gerbe et al., 2016; Von Moltke et al., 2016). L'IL33 ou Alarmin est exprimée dans de nombreux tissus dont l'intestin. En présence d'IL2 et de l'engagement du TCR, l'IL33 active le facteur de transcription GATA3, ce qui favorise l'activité des Treg dans un modèle murin d'inflammation chronique intestinal. Lors de lésion de l'épithélium, le niveau d'IL33 est fortement augmenté, ce qui favoriserait la réparation de la barrière intestinale et contrôlerait les dommages dus aux cytokines pro-inflammatoires comme l'IL23 (Schiering et al., 2014). Initialement caractérisée dans les cellules stromales du thymus, TSLP est produite par la plupart de cellules épithéliales : peau, poumon, intestin. La sécrétion de TSLP est induite par les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 β et le TNF α via NF κ B. Cette cytokine participe à l'immunité antiparasitaire par l'induction de Th2 et d'ILC2 ainsi qu'au développement des T régulateurs dans le thymus (Han et al., 2017a; Taylor et al., 2009). Des travaux ont montré que 70 % des patients atteints de la maladie de Crohn ont un défaut de sécrétion de TSLP au niveau de l'épithélium, compromettant le contrôle de l'inflammation intestinale (Rimoldi et al., 2005). Des dérèglements de l'expression de ces trois cytokines seraient impliqués dans différentes pathologies comme les MICI, l'asthme et la dermatite atopique.

IL10

L'IL10 est une cytokine anti-inflammatoire très importante qui bloque les voies de signalisation NF κ B et JAK/STAT. Elle est produite par les cellules hématopoïétiques : lymphocytes T régulateurs et Tr1, B régulateurs, cellules dendritiques, macrophages et leucocytes. Chez l'humain l'IL10 est également produite par les cellules épithéliales intestinales, ce qui ne semble pas être le cas chez la souris (Autschbach et al., 1998; Hyun et al., 2015; Jarry et al., 2008, 2011). Les mécanismes par lesquels l'IL10 diminue la réponse immunitaire sont bien étudiés. Elle favorise notamment l'acquisition par les cellules dendritiques et les macrophages d'un phénotype tolérogène, ce faisant elle bloque le développement des réponses Th1 et Th2. Elle limite aussi les réactions allergiques. Elle bloque la différenciation en lymphocytes effecteurs tout en promouvant la différenciation des Treg, sécrétant eux même de l'IL10. Ces mécanismes de boucles d'amplification et d'auto-induction permettent à l'IL10 de contrôler les processus immunitaires et de limiter les effets délétères comme illustrés dans la Figure V-1 (Saraiva and O'Garra, 2010). Le niveau de cette cytokine est contrôlé par des molécules d'origine bactérienne et contribue à l'imperméabilité de la barrière intestinale (Zheng et al., 2017). En plus de l'IL10, les cellules épithéliales sécrètent la sémaphorine 7A ou CD108, une protéine avec une ancre GPI localisée sur la face basolatérale qui induit la production d'IL10 dans les macrophages (Kang et al., 2012). L'IL10 est clef dans la tolérance intestinale, le blocage du récepteur de l'IL10 ou les souris IL10 $^{-/-}$, développent une inflammation intestinale chronique caractérisée par une augmentation des lymphocytes Th1 (Davidson et al., 1996). Les résultats chez la souris expliquent probablement l'association entre des polymorphismes de l'IL10 et du récepteur de l'IL10 et les MICI (Kaser et al., 2010).

L'acide rétinolique

La conversion de la vitamine A en acide rétinolique (RA) par l'enzyme ALDH/RALDH (Aldehyde déshydrogénase ou Retinaldéhyde déshydrogénase) est un élément favorisant un phénotype tolérogène des cellules immunitaires. Dans l'intestin, les cellules épithéliales expriment RALDH1, tandis que les monocytes expriment RALDH2. L'acide rétinolique intervient dans l'adressage ou « homing » des lymphocytes. Ce médiateur est également nécessaire à la polarisation des Treg et des Th17 en périphérie comme illustré dans la Figure V-3 (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007). Le rôle de ce métabolite dépend du contexte physiologique. Tolérogène à l'état basal, l'acide rétinolique conduit au contraire à la

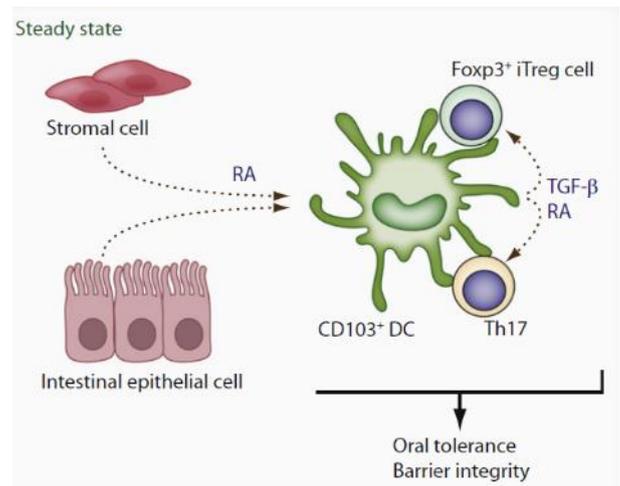


Figure V-3 : L'acide rétinolique produit par les cellules épithéliales dans l'intestin conditionne les cellules dendritiques de la lamina propria dans un phénotype tolérogène et favorise le maintien de la barrière intestinale en augmentant la polarisation des lymphocytes T en Treg et Th17. Tiré de Halle, 2011.

différenciation de lymphocytes effecteurs lors d'une infection ou de lésions. De plus les souris soumises à un régime contenant un haut niveau de vitamine A, développent de fortes inflammations dans les contextes de greffe, de tumeur et de réactivité au gluten (Hall et al., 2011). L'acide rétinolique se lie à différents récepteurs nucléaires RAR (Retinoic acid receptor), RXR (Retinoid X receptor) et PPAR β/δ en fonction des isoformes ce qui provoque la transcription de gènes spécifiques. Les cellules épithéliales humaines impriment un phénotype tolérogène aux cellules dendritiques via la sécrétion d'acide rétinolique et de TGFB (Iliev et al., 2009).

Les Acides aminés

Des travaux montrent qu'un nombre croissant d'acides aminés, l'arginine, la cystéine, la glutamine, le tryptophane, la phénylalanine, ou encore l'histidine ont, en plus de leur rôle métabolique, des propriétés immuno-modulatrices (Grohmann and Bronte, 2010). La prolifération des lymphocytes T, est par exemple entièrement dépendante d'un apport externe de cystéine car ils sont dépourvus des enzymes permettant sa conversion et sa réduction. Le contrôle de l'apport de cystéine par les cellules dendritiques et les macrophages serait un système d'inhibition de la réponse immunitaire. L'histidine est un précurseur de l'histamine, molécule inflammatoire bien connue pour son rôle dans les allergies. L'impact de deux acides aminés sur les cellules immunitaires, l'arginine et le tryptophane, est aujourd'hui bien décrit dans la littérature.

L'arginine est un acide aminé non essentiel pour un individu en bonne santé. Elle est hydrolysée en ornithine et en urée par une métallo-enzyme, l'arginase qui possède deux isoformes Arg1 et Arg2 qui ne sont pas équivalents en termes de localisation. Arg2 est associée aux mitochondries, elle est exprimée dans de nombreux tissus y compris l'intestin, tandis qu'Arg1 est dominante dans le foie et certaines cellules immunitaires. L'arginase a un effet antimicrobien en permettant avec la citrulline, la production d'oxyde nitrique (NO). Le NO est aussi un signal immuno-régulateur pour un grand nombre de cellules. L'acquisition d'un phénotype immuno-suppressif chez les macrophages est lié à la consommation de l'arginine via Arg1 plutôt qu'Arg2 (Saha et al., 2017; Sica and Mantovani, 2012).

Les mécanismes d'action de l'arginase ne sont pas encore entièrement connus. Elle joue un rôle lors de la différenciation des cellules dendritiques (Lippens et al., 2016; Mondanelli et al., 2017; Yang et al., 2015). La diminution de la concentration d'arginine provoque l'activation des détecteurs du niveau des acides aminés comme GCN2 (General control non derepressible 2). Cette kinase bloque la prolifération des lymphocytes T, diminue l'expression de TCR fonctionnel et provoque leur anergie. De plus, la déplétion de l'arginine par une forte activité de l'arginase conduit à rendre le TCR non-fonctionnel par dissociation de la chaîne CD3 ζ , via un mécanisme distinct de celui faisant intervenir GCN2 (Grohmann and Bronte, 2010). Le niveau d'arginase est régulé par STAT6 et par différentes cytokines : l'IL4, l'IL13 ou encore TGFB. Les motifs microbiens comme le LPS ou la chitine induisent aussi son expression (Canali et al., 2010). Le rôle de l'épithélium intestinal dans la régulation de métabolisme de l'arginine reste à explorer, les principaux travaux ayant été jusqu'à présent consacrés aux cellules immunitaires professionnelles. Les cellules épithéliales pourraient elles aussi jouer sur l'arginase puisqu'elles produisent différents inducteurs connus (TGFB, IL10, cAMP, etc.).

La contribution de deux molécules, IDO et TGFB, exprimées au niveau des cellules épithéliales du côlon, semble déterminante dans la mise en place de la régulation de l'immunité. Ces deux facteurs sont au centre d'une partie des travaux de thèse présentés dans ce rapport, c'est pourquoi nous leur consacrons une description plus détaillée.

2.IDO1 et le tryptophane

Catabolisme du tryptophane

Le tryptophane est l'acide aminé le plus rare de notre alimentation. Les concentrations physiologiques de cet acide aminé dans l'organisme sont difficiles à déterminer. Les estimations sont de l'ordre de 40 à 100 μ M (Efimov et al., 2012). Environ 20% du L-tryptophane est utilisé pour la synthèse de la sérotonine et de la mélatonine et 80% dans la voie dite des kynurénines. La dégradation du tryptophane permet par la voie des kynurénines, la synthèse de différents métabolites dont les produits terminaux sont le NAD⁺ (Nicotinamide adenine dinucleotide), l'acide quinolique et l'acide picolinique (Figure V-4).

Le génome des mammifères contient deux groupes d'enzymes contenant un groupe d'hème qui assure le clivage de l'indole du tryptophane en présence d'un cofacteur, l'anion super-oxyde O₂⁻ : TDO1 et TDO2 (tryptophan 2,3-dioxygenase) ainsi que IDO1 et IDO2 (Indoleamine 2,3-dioxygenase). L'enzyme TDO2 est principalement exprimée dans le foie. Elle possède une affinité moyenne pour le tryptophane comparé à IDO1 mais une grande capacité. Son expression est stable, ce qui en fait la régulatrice de l'homéostasie systémique du tryptophane, elle assurerait 90% de sa dégradation.

L'enzyme IDO existe sous deux isoformes, IDO1 et IDO2. Le rôle et l'expression d'IDO2 n'est pas encore entièrement élucidé. IDO2 est exprimé dans un nombre limité de types cellulaires comme le foie, le cortex cérébral, le rein et dans les cellules dendritiques. L'activité enzymatique est en débat car son K_m pour le L-tryptophane est des centaines de fois supérieure à celui d'IDO1 (Badawy, 2017; Pantouris et al., 2014). Les souris déficientes en IDO2

ne présentent pas de baisse significative des métabolites dérivés du tryptophane dans le sang. IDO2 pourrait être responsable d'une tolérance « basale » car son expression est peu inductible tandis qu'IDO1 qui est inductible, serait la source d'une tolérance immunitaire, capable de s'adapter au contexte. L'activité catalytique d'IDO1 est inhibée par de fortes concentrations de tryptophane ce qui n'est pas le cas de TDO1. Certaines maladies auto-immunes sont corrélées à IDO2. Ainsi l'absence d'IDO2 dans les modèles d'arthrite rhumatoïde diminue la production d'antigènes auto-réactifs, tandis que l'absence d'IDO1 n'a pas d'effet (Prendergast et al., 2014).

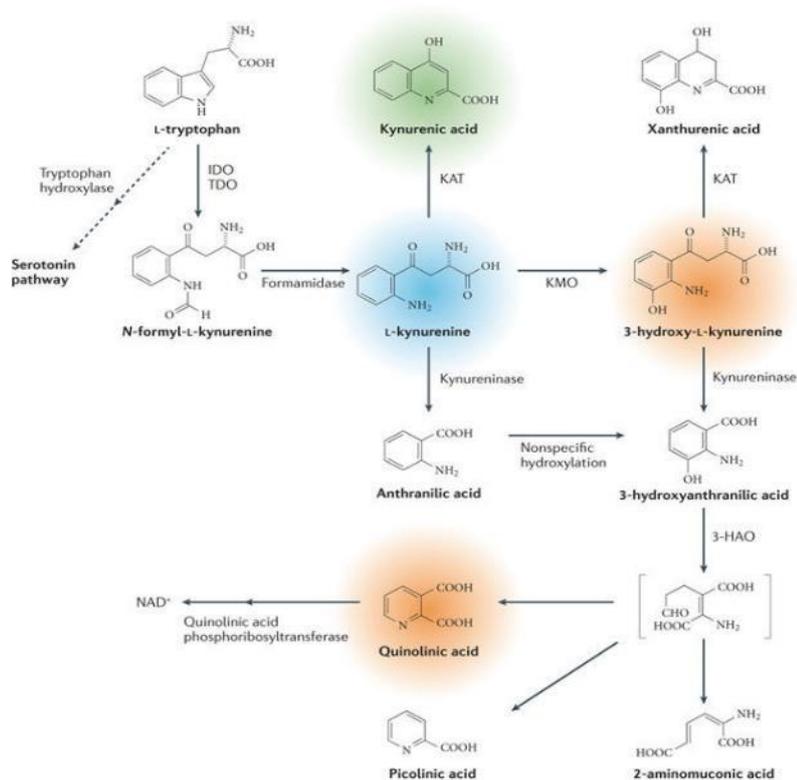


Figure V-4 : Voie de dégradation du Tryptophane chez l'humain. Tire de Vecsei 2013

L'isoforme IDO1 est exprimé dans un plus grand nombre de types cellulaires qu'IDO2. Chez la souris, les ARNm d'IDO1 sont détectés dans les cellules épithéliales de l'intestin et de l'épiderme ainsi que dans le placenta. Cependant en l'absence de signaux activateurs, la protéine IDO1 n'est détectée qu'au niveau de la peau en immunohistochimie (Dai and Zhu, 2010; Fukunaga et al., 2012; Munn, 1998). Chez l'humain, IDO est exprimé dans l'épithélium intestinal à un faible niveau à l'état basal (Ferdinande et al., 2008; Wolf et al., 2004). Son niveau est fréquemment plus élevé chez les patients atteints de MICI et de cancer du côlon (Brandacher et al., 2006; Furuzawa-Carballeda et al., 2013). Il est intéressant de noter que chez les patients atteints de rectocolite hémorragique, l'augmentation des ARNm d'IDO1 n'est pas corrélée à une augmentation de son activité enzymatique (Wolf et al., 2004). L'activité enzymatique serait régulée par la disponibilité des cofacteurs, comme l'anion super-oxyde, qui agirait comme un activateur faisant passer l'enzyme d'un état inactif à un état actif.

IDO1, régulateur de l'immunité

Dans les cellules épithéliales intestinales, seul IDO1 est exprimé. Le niveau de son expression dans le côlon a peu été étudié chez la souris (Dai and Zhu, 2010; Yoshida et al., 1980) comme chez l'humain (Ferdinande et al., 2008; Wolf et al., 2004). Les analyses du projet ENCODE indiquent que le niveau d'expression chez la souris est à son

plus haut dans les tissus génitaux, mammaires et intestinaux (Fagerberg et al., 2014). Le profil d'expression chez l'humain est assez similaire. IDO1 est exprimé dans les tissus reproducteurs, l'intestin, la rate et les ganglions lymphatiques. La plupart des travaux chez l'humain portent sur des patients atteints de cancer ou de MICI qui expriment plus fortement IDO1 que des individus non malades (Brandacher et al., 2006; Furuzawa-Carballeda et al., 2013).

IDO1 présente une forte affinité pour le tryptophane mais une faible capacité de catabolisme. Cette enzyme ne contrôlerait pas l'homéostasie du tryptophane dans l'organisme mais aurait une fonction de régulation locale du catabolisme, en lien avec le niveau d'inflammation de l'environnement. Différents travaux indiquent qu'IDO1 joue un rôle important dans la tolérance immunitaire, en particulier dans l'intestin, impliquant plusieurs mécanismes. Un premier mécanisme, toujours en débat, reposerait sur la diminution du niveau de tryptophane et/ou sur l'augmentation des métabolites dérivés de son catabolisme (Badawy et al., 2016). L'activité d'IDO1 induit la kinase GCN2 qui détecte la diminution de certains acides aminés. Cette protéine contrôle l'activation et la différenciation des lymphocytes Treg. Parallèlement, GCN2 bloque le cycle cellulaire, provoque l'anergie des lymphocytes T CD8 et bloque la différenciation des Th17, comme le fait la baisse de l'arginine (Munn and Mellor, 2013).

Depuis les années 1980, d'autres mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire par IDO1 ont été décrits. Une première étude menée par Pfefferkorn en 1984, a montré que l'induction d'IDO1 par de l'IFN γ dans des fibroblastes pouvait bloquer la réplication de *Toxoplasma gondii* (Pfefferkorn, 1984). Cette étude a donné naissance à l'hypothèse d'un effet antimicrobien d'IDO dû à la déplétion locale de tryptophane pour les organismes auxotrophes. La diminution de la concentration de tryptophane a également pour effet de promouvoir la polarisation en Th2. Cette théorie s'est révélée difficile à démontrer et elle suscite toujours des débats (Badawy et al., 2016; Frumento et al., 2002). Elle a mené à la prise en compte de la fonction immuno-régulatrice des métabolites dérivés du tryptophane. Les kynurénines sont des ligands qui activent le facteur de transcription AhR. Les effets immunologiques d'AhR sont complexes. En cas d'une stimulation avec les kynurénines même en faible

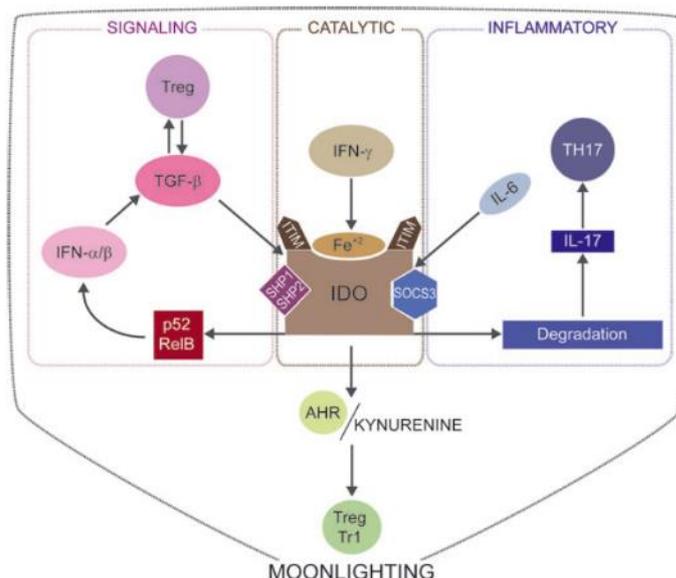


Figure V-5 : Mécanismes d'action et de régulation de la protéine IDO1. Au centre est représentée l'activité enzymatique de dégradation du tryptophane dépendant du Fe²⁺. A gauche est représenté la boucle d'auto-activation reposant sur TGFβ1, SHP1/2, NFκB et l'IFN de type I qui permet un effet immuno-suppresseur à long terme. A droite est schématisé un mécanisme de dégradation d'IDO1, induite par l'IL6 et SOCS3 qui favorise la différenciation des Th17. Les deux autres mécanismes régulent les voies de signalisation de TGFβ et de l'IL17. En bas, est représenté l'effet immuno-suppressif des kynurénine et d'AhR ainsi que l'impact sur les Treg et Tr1. Tiré de Fallarino 2012

concentration, AhR peut promouvoir la différenciation des lymphocytes Treg et l'activité des cellules dendritiques (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018; Mezrich et al., 2010; Nguyen et al., 2010). A l'inverse ces métabolites sont associés aux inflammations chroniques du système nerveux, corrélé à des dépressions et à une forte morbidité (Campbell et al., 2014).

En plus d'avoir un rôle antiparasitaire, IDO1 est nécessaire à la régulation des cellules T par les trophoblastes. La gestation placentaire chez les mammifères est un défi pour le système immunitaire qui, confronté à des antigènes étrangers, ne doit pas éliminer le fœtus. L'expression d'IDO1 par les trophoblastes et les cellules immunitaires utérines est l'une des fonctions les plus récentes, en terme évolutif, de cette enzyme. Elle permet avec d'autres molécules le développement et le maintien d'une population de Treg essentielle pour le bon déroulement de la gestation (Terness et al., 2007). En outre, dans contexte immunologique où TGFB1 est abondant, une boucle d'auto-activation active IDO1 via ses domaines de liaison avec les protéines tyrosines phosphatases SHP1/2. Cet axe TGFB1/SHP/IDO1/NFκB permet à IDO1 d'avoir un effet immunosuppresseur sur le long terme, par exemple pendant la grossesse, qui est indépendant de l'IFN et de son activité enzymatique (Pallotta et al., 2011)

De par son activité enzymatique, IDO1 joue un rôle important dans les cellules dendritiques et les macrophages mais pas uniquement. C'est à la fois une enzyme intracellulaire et une enzyme sécrétée. IDO1 peut être exprimée mais ne pas avoir d'activité sur le catabolisme du tryptophane (Fallarino et al., 2012). L'expression d'IDO dans les cellules dendritiques est nécessaire à la différenciation de Treg mais pas son activité enzymatique. En effet la diminution d'IDO par des ARN interférents bloque la différenciation de lymphocytes T naïfs en Treg, même en présence de TGFB et d'IFNγ. Cependant, la même équipe a montré qu'en présence d'un inhibiteur enzymatique d'IDO, la protéine continue à induire la différenciation en Treg (Pallotta et al., 2011). La présence de domaines de liaison aux protéines SHP1/2 et de deux domaines ITIMS explique en partie les effets de signalisation d'IDO1 qui sont non-enzymatiques (Pallotta et al., 2011). Enfin, l'inhibition de NIK montre que la voie non-canonique de NFκB est également nécessaire à aux fonctions immuno-régulatrices d'IDO1 sur les Treg (Tas et al., 2007). Dans des travaux récents, il a été mis en évidence la nécessité de la coexpression de l'Arg1 et de la production de polyamines pour l'activation d'IDO1 dans les cellules dendritiques et l'acquisition d'un phénotype immuno-suppressif (Mondanelli et al., 2017).

IDO1 n'a pas seulement un rôle immuno-modulateur dans les cellules immunitaires. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de l'expression d'IDO1 par les cellules épithéliales de poumon dans des contextes infectieux (Desvignes and Ernst, 2009; De Luca et al., 2010). L'expression d'IDO par ces cellules protège le poumon des effets délétères dus à l'infiltration massive de neutrophiles et de Th17.

Les souris déficientes en IDO ne développent pas d'anomalies auto-immunes létales. Néanmoins l'absence d'IDO empêche de développement d'une tolérance vis-à-vis de nouveaux antigènes notamment dans le cas des greffes. Ces souris développent spontanément des lupus en cas de dommages cellulaires répétés. Il est intéressant de noter qu'*in vivo*, le rôle d'IDO1 est compromis lorsqu'IDO2 est absent, soulignant un lien fort entre l'activité de ces deux protéines qui n'est pas encore entièrement compris (Munn and Mellor, 2013; Prendergast et al., 2014; Put et al., 2016; Ravishankar et al., 2012).

La régulation d'IDO1

La protéine IDO1 est encodée par un gène composé de 10 exons sur le chromosome 8, chez l'humain comme chez la souris révélant l'existence d'une synténie. L'alignement des régions promotrices montre qu'elles sont assez peu conservées.

La voie classique d'activation d'IDO1 est celle de l'IFN. Des éléments de réponse à l'IFN α ou β (Type I) et IFN γ (Type II) sont présents dans le promoteur : IRF, ISRE (Interferon-stimulated response element), GAS (γ IFN-activated site). La voie canonique d'induction par les IFN passe par les voies JAK (Janus Kinases)/STAT (Signal transducer and activator of transcription) illustrées dans la Figure V-6.

Schématiquement, la liaison de l'IFN à son récepteur active les kinases JAK, qui sont liées de manière permanente au récepteur. En fonction du type d'IFN, les JAK 1/2 ou la kinase TYK2 (tyrosine kinase 2) sont phosphorylées et induisent à leur tour le récepteur ce qui autorise la liaison avec les protéines STAT1 et/ou STAT2. Celles-ci sont ensuite phosphorylées et forment des dimères. L'IFN de type I induit des homodimères de STAT1 tandis que l'IFN de type II est associé à des hétérodimères STAT1/STAT2. Les dimères de STAT activés sont transloqués dans le noyau où ils agissent comme des facteurs de transcription en se liant à des motifs ISRE (IFN type II) ou GAS (IFN type I). Les dimères de STAT1/STAT2 s'associent avec différentes protéines IFN ce qui augmente leur activité (Chon et al., 1996; Konan and Taylor, 1996; Robinson et al., 2003).

D'autres cytokines comme l'IL10, le TGF β , l'IL1 et le TNF, stimulent IDO. Des signaux microbiens comme le LPS ou nucléotidiques (CpG), activent la transcription d'IDO par une voie indépendante de l'IFN γ (Fujigaki et al., 2001; Munn and Mellor, 2013). Certaines molécules régulent la transcription d'IDO1 comme la molécule CTL4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) exprimée par les Treg. CTL4 se lie à CD80/CD86 dans les cellules dendritiques et provoque une inhibition de l'activité inflammatoire. Cet effet a été décrit comme de la « signalisation inverse » par Puccetti et Grohmann puisque les Treg induits, entre autre par IDO, sont capables d'activer à leur tour son expression (Puccetti and Grohmann, 2007). Enfin, certaines régulations sont liées à un état physiologique particulier comme la grossesse. Les œstrogènes et l'hCG (Human chorionic gonadotropin) augmentent l'expression d'IDO1 dans le placenta.

L'étude des souris dépourvues de flore montre que l'expression d'IDO1 est dépendante des signaux émis par les micro-organismes intestinaux. Le niveau d'ARN messagers d'IDO est particulièrement faible dans l'épithélium intestinal des souris stériles (Atarashi et al., 2011a; Rhee et al., 2005b). Les mécanismes moléculaires par lesquels la

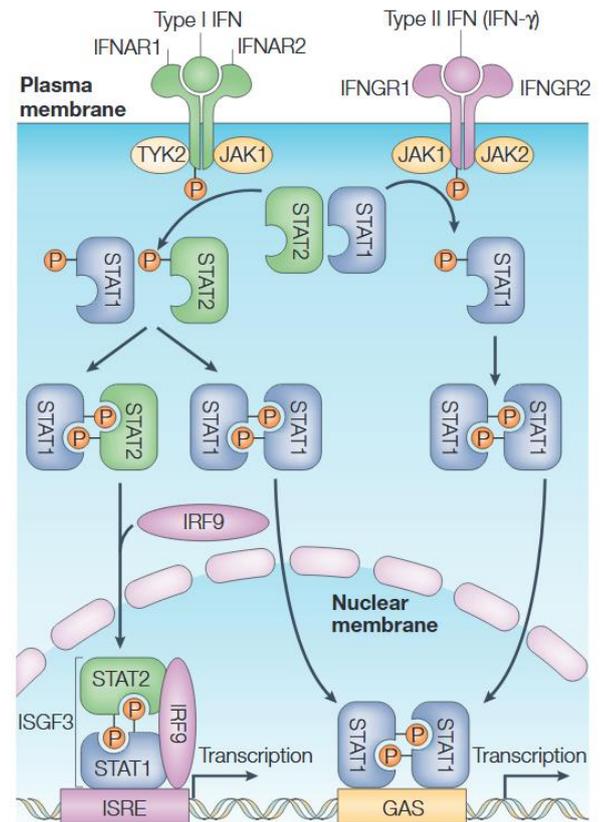


Figure V-6 : Voie d'activation des IFN de type I et II. Tiré de Decker 2005

flore contrôle l'expression d'IDO1 ne sont pas connus. Toutefois une étude menée par l'équipe de Bäckhed indique cette régulation n'est pas dépendante de MYD88 (Larsson et al., 2012).

L'activité non-contrôlée d'IDO1 pourrait être délétère pour l'organisme à la fois en le rendant plus susceptible aux infections et en provoquant une diminution néfaste du tryptophane nécessaire au métabolisme. Assez peu de régulateurs négatifs bloquant la transcription ont été décrits. BIN1 (BAR adapter–encoding 1) est l'un d'entre eux (Muller et al., 2005). La stabilité de la protéine IDO1 et son activité enzymatique sont finement contrôlées. L'IL6 inhibe l'activité d'IDO1 et induit l'inhibiteur SOCS3. La protéine SOCS3 se lie aux domaines ITIMS (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) d'IDO1. Le complexe SCOS3-IDO1 est ubiquitiné et dégradé par le protéasome comme illustré dans la Figure V-5 (Orabona et al., 2008). Enfin, l'activité enzymatique d'IDO1 est naturellement limitée par la disponibilité de ses cofacteurs (hème et surper-oxyde). Les oxydes nitriques sont des inhibiteurs qui inactivent l'hème et induisent la dégradation d'IDO1. D'autre part, une concentration en tryptophane supérieure à 50 à 550 μM pour L-tryptophane et de D-Tryptophane respectivement bloque aussi l'activité enzymatique d'IDO1 (Efimov et al., 2012; Pantouris et al., 2014). Les dérivés méthylés du tryptophane comme le 1-Methy-L-Tryptohane (1-MT) sont des inhibiteurs très étudiés dans le cadre d'applications cliniques en cancérologie pour restaurer la réponse antitumorale.

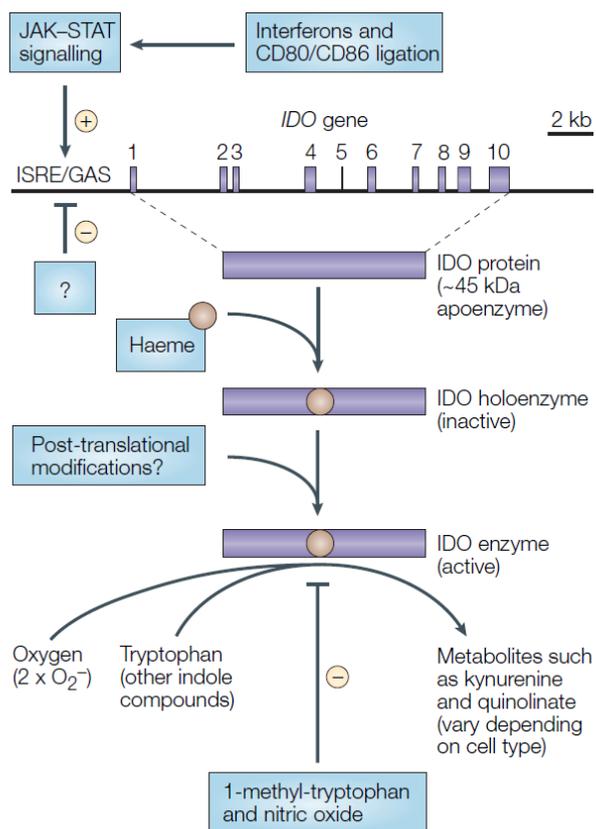


Figure V-7 : Schéma montrant d'autres types de régulation d'IDO1 en plus de ceux illustré dans la Figure V-5. Tiré de Mellor et Munn 2004

3. Transforming growth factor B

TGFB : un géant très contrôlé

Il existe une littérature très abondante autour de TGFB: une requête avec ce mot clef dans la base de PubMed n'indique pas moins de 75 334 entrées en ce début d'année 2018. Les raisons de cette abondance tiennent au fait que TGFB est une protéine pléiotropique, exprimée par de nombreux tissus. Elle est impliquée dans l'embryogénèse, la cicatrisation, l'homéostasie, la cancérogénèse ainsi que l'immunité. Afin de limiter l'exposé, nous n'aborderons dans cette introduction que les aspects de TGFB liés à l'homéostasie intestinale et à l'immunité.

Chez les mammifères, la famille du TGFB comprend trois membres encodés par des gènes différents : TGFB1, TGFB2 et TGFB3. La forme la plus importante au niveau de l'immunité est TGFB1. Étonnamment, la régulation de TGFB, en elle-même, n'est pas la partie qui est la mieux documentée. Des signaux de différentes natures activent la transcription de TGFB1: le glucose, les glucocorticoïdes, l'apoptose, des facteurs de croissance (EGF, FGF) ainsi que le virus de l'hépatite et quelques bactéries (Kashiwagi et al., 2015; Toossi et al., 1995; Xiao et al., 2008). Peu de signaux inhibiteurs ont été publiés (Kwong et al., 2004). Depuis la description du promoteur, à la fin des années 1980, par Kim (Kim et al., 1989b), quelques dizaines de publications ont suivi. Des motifs de liaison avec des facteurs de transcription ont été identifiés et démontrés expérimentalement : AP-1 (Birchenall-Roberts et al., 1990; Presser et al., 2013; Weigert et al., 2000), SP1/KLF (Specificity Protein-1/ Krüppel-like factor) ainsi que NFκB (Lee et al., 2006b).

L'auto-induction est la voie d'activation de la transcription de TGFB la mieux décrite. La liaison de TGFB à son récepteur entraîne la phosphorylation de la voie SMAD, en particulier de SMAD2 et SMAD3, ainsi que la voie des MAPK induisant AP-1 (Syed, 2016; Zhang et al., 2006). La voie SMAD augmente la transcription d'un grand nombre de gènes dont TGFB lui-même. Elle stimule également sa propre boucle de contrôle. SMAD2/3 active SMAD7 et provoque la dégradation du récepteur de TGFB, limitant ainsi la boucle d'auto-induction (Figure V-8).

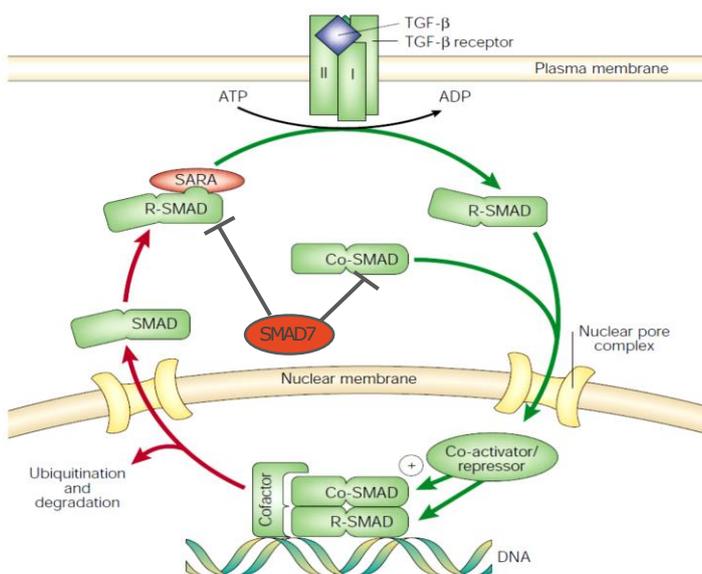


Figure V-8 : Boucle d'auto-induction classique de TGFB. R-Smad = Smad2/3, Co-Smad = Smad4. Massagué 2000

Synthesis (intracellular)

1. TGF-β precursor
N-terminal ————— C-terminal

2. Dimerization and cleavage
Furin ↓

3. Small Latent Complex

4. Large Latent Complex

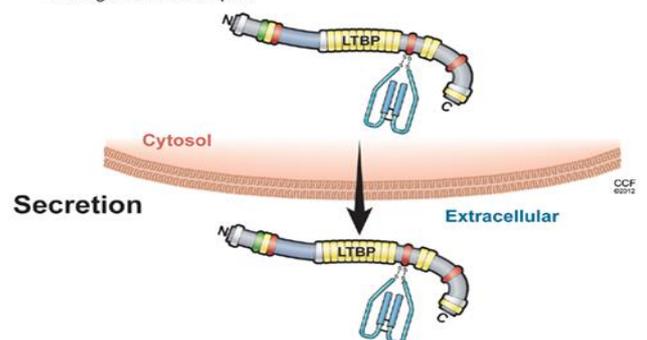


Figure V-9 : Illustration du processus de maturation, d'assemblage et d'action de TGFB. Tiré de Hayashi 2012

La synthèse et la production de la protéine TGFB mature passent par un grand nombre d'étapes, illustrées dans la Figure V-9. TGFB est synthétisé sous forme de pre-proTGFB de 390 acides aminés qui contient un peptide signal,

un précurseur LAP (Latency-associated protein) et la future protéine TGFB. Cet ensemble est ensuite clivé en deux parties : le TGFB mature (25kDa) et la partie LAP associée au peptide signal. Ces différentes parties se dimérisent et forment dans le noyau le « small latent TGFB ». L'homodimère du « small latent » TGFB est exporté dans le cytosol où il constitue le « Large Latent TGFB » complexe avec un second complexe nommé LTBP (latent TGFB binding protein).

Selon le type cellulaire, TGFB peut être sécrété à l'état de petit ou de grand complexe ou encore être stocké dans la cellule. Une fois sécrété, il s'associe de manière préférentielle avec la matrice extracellulaire. Pour être actif et se lier à son récepteur, TGFB doit être libéré des complexes par l'intervention de différentes enzymes (intégrine, plasmine, matrix métalloprotéinase, etc.).

Les mécanismes résumés ici indiquent que le niveau de TGFB est finement contrôlé. Cette régulation paraît avoir surtout lieu via les modifications post-transcriptionnelles, nombreuses et complexes, que subit la protéine plutôt qu'au niveau de la transcription. On peut faire l'hypothèse que ces différences de contrôle sont liées au nombre plus faibles d'études sur la partie transcriptionnelle. La régulation du rôle de TGFB passe aussi par son stockage à l'état non fonctionnel et à son activation par différentes protéines en fonction de l'environnement. Tous ces processus, à de multiples niveaux, concourent à la régulation de TGFB.

Le rôle de TGFB dans l'immunité

Les mutations qui rendent TGFB non fonctionnel sont létales : les souris déficientes meurent deux à trois semaines après leur naissance, démontrant ainsi son caractère indispensable. Chez l'humain, la mutation monogénique du récepteur de type I ou II provoque le syndrome de Loeys-Dietz avec des défauts du squelette et au niveau des artères, une plus grande susceptibilité à l'anévrisme. Ces individus, dès l'enfance, développent des troubles immunologiques avec des risques importants d'allergie et de troubles intestinaux sévères (Naviglio et al., 2014; Pezzini et al., 2012). Chez les patients atteints de MICI, les données concernant le niveau de TGFB dans la muqueuse intestinale sont contradictoires (Ihara et al., 2017). Des défauts dans la voie de signalisation SMAD, concernant SMAD3 et SMAD7 ont été identifiés (Monteleone et al., 2004, 2008). Parmi les loci génomiques associés à une augmentation du risque de développer une MICI, *SMAD3* a été identifié (Lees et al., 2011; Li and Flavell, 2008).

TGFB est nécessaire au développement, à l'homéostasie, à la tolérance et à la réponse immune de manière générale (Figure V-10). En effet TGFB est au centre d'un vaste réseau de signalisation, indispensable aux lymphocytes T et aux différents leucocytes, comme illustré dans la Figure V-10. La protéine TGFB contrôle la tolérance immunitaire dans l'intestin par deux mécanismes distincts. Un premier mécanisme est lié à l'induction de lymphocytes Treg. TGFB induit via SMAD3 l'activation du facteur de transcription spécifique des Treg, FOXP3 (Li and Flavell, 2008). TGFB est nécessaire au développement des Treg dans le thymus dans une fenêtre courte de quelques jours après la naissance chez la souris. Il est aussi nécessaire au développement des Treg en périphérie, c'est-à-dire en dehors du thymus. Les souris déficientes en TGFB développent une inflammation et une auto-immunité généralisée dues à l'excès de présentation d'antigènes auto-réactifs et ne survivent que quelques semaines. Les mutations conditionnelles de TGFB dans différents types de lymphocytes T CD4 mènent à l'expansion des lymphocytes Th1 et Th2 et à une inflammation systémique mortelle. La perte du récepteur de type I de TGFB dans les lymphocytes T CD4 provoque un tableau clinique équivalent à la perte de la protéine TGFB. Un défaut du récepteur de type II dans les lymphocytes B provoque l'absence d'IgA dans le sérum des souris. La mutation du récepteur de type II dans les cellules dendritiques provoque la mort des souris à environ quinze semaines, avec une inflammation auto-immune généralisée (Chen and Ten Dijke, 2016; Ihara et al., 2017).

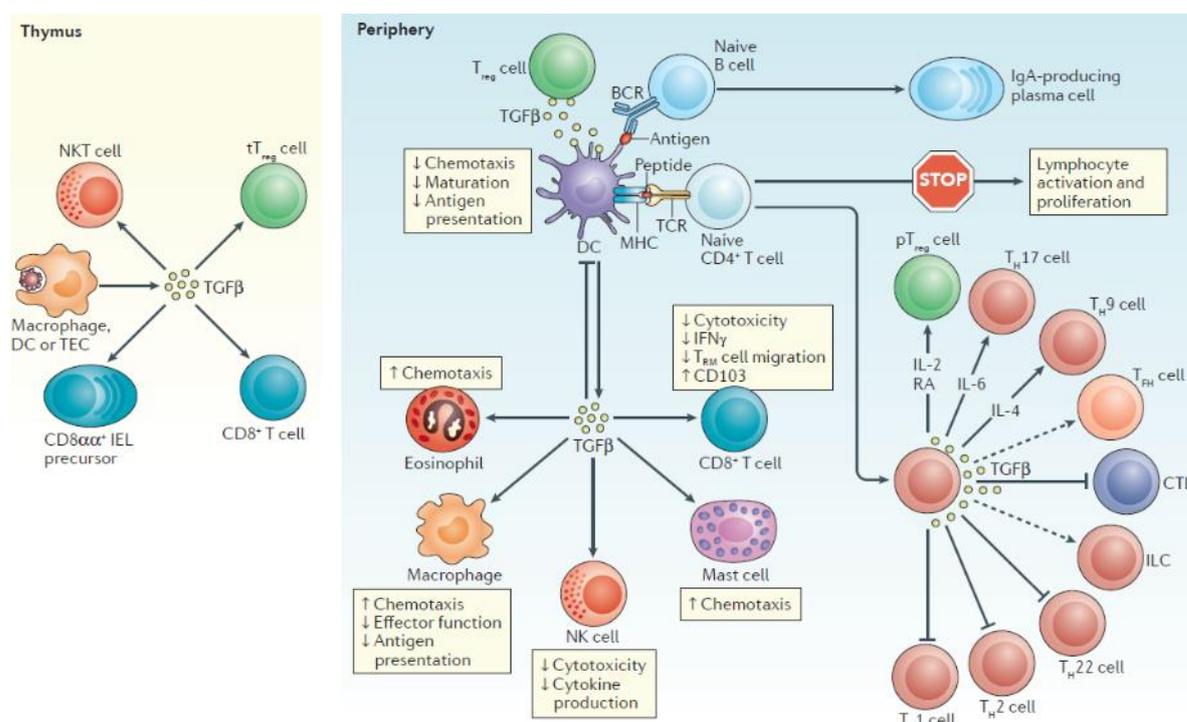


Figure V-10 : TGFB joue sur la différenciation et l'expansion des cellules immunitaires dans le thymus et en périphérie. NK : natural killer, NKT : natural killer T, CTL : cytotoxic T lymphocyte, DC : dendritic cell, ILC : innate lymphoid cell ; TEC : thymic epithelial cell, IEL : intraepithelial lymphocyte, T_{RM} : T resident memory, T_{FH} : follicular helper. Tiré de Chen 2016.

Les cellules dendritiques sont décrites, au moins chez la souris, comme les productrices majeures dans l'intestin des deux cytokines immunosuppressives, TGFB et l'IL10. Ces cellules produisent également de l'acide rétinoïque qui favorise la différenciation des lymphocytes T en Treg (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007). Le seul blocage de TGFB par des anticorps abolit l'induction des Treg, démontrant ainsi sa nécessité. D'autres travaux ont aussi révélé l'importance de TGFB dans la production d'IgA et dans la sécrétion des IgA par les cellules épithéliales dans la lumière intestinale. Ces immunoglobulines contribuent à l'intégrité de la barrière intestinale (Klein et al., 2006).

Différentes études ont démontré le rôle de TGFB au niveau de l'épithélium intestinal. Dans des modèles de cancer, les souris qui ne produisent pas de TGFB dans les cellules épithéliales sont plus susceptibles aux colites induites, même elles ne développent pas de colite spontanée. La cytokine participe à l'imperméabilité de la barrière intestinale en augmentant la production des claudines. Une équipe a récemment montré que les cellules épithéliales émettent des vésicules extracellulaires qui contiennent du TGFB. En fusionnant avec la membrane des cellules dendritiques, les vésicules libèrent TGFB, ce qui augmente la différenciation des Treg intestinaux (Jiang et al., 2016). Le maintien de l'imperméabilité intestinale est essentiel dans la tolérance immunitaire. Les patients atteints de MICI présentent une plus forte perméabilité intestinale, ce qui augmenterait la réactivité du système immunitaire vis à vis du microbiote.

Les travaux de ces dix dernières années ne laissent plus de doute sur le fait que la présence d'un écosystème complexe dans notre système digestif a un impact important sur la physiologie de l'hôte. Toujours plus nombreux, des travaux mettent en évidence la nécessité d'une flore variée et équilibrée afin d'assurer le développement et la maturation d'un système immunitaire capable de discerner les signaux de dangers des signaux commensaux. Les molécules immuno-modulatrices produites par les côlonocytes (TGFB, IDO1, l'IL10) contribuent à l'éducation du système immunitaire afin qu'il développe des réponses adaptées à l'environnement (Faragasan 2010, Geuking, 2011, Hooper 2012)

VI. De la redécouverte de la flore intestinale au microbiote

1. Des animalcules au microbiote:

Le perfectionnement des premiers microscopes a plongé les observateurs, comme Leeuwenhoek dans un grand étonnement devant la quantité de petits animalcules peuplant la bouche et l'intestin des animaux, y compris humains. Dès le XIXe siècle, les observations révèlent que les humains naissent vierges de tout microbe et qu'ils sont tout de suite colonisés par les microbes environnants. Dans son exposé devant la société savante de Manchester, en 1901 Elie Metchnikoff explique que la flore est composée en majorité de bactéries ainsi que de quelques levures (Metchnikoff, 1901). Déjà, on sait qu'il y a une grande différence de composition entre la flore présente sur la peau riche en coques, celle de bouche et celle de l'intestin riches en bacilles. Les savants ont déduit que le tractus digestif est colonisé par les microbes suivant un gradient allant de l'estomac, avec une flore peu abondante, au côlon qui renferme la flore la plus riche. Dès cette époque, différents auteurs avaient constaté que la flore variait suivant le régime alimentaire. En ce début de vingtième siècle, les connaissances sont limitées par le fait que l'on ne sait pas cultiver la plupart de ces bactéries. Metchnikoff et ses collègues font néanmoins à cette époque, l'hypothèse que la présence de cette flore peut rendre d'innombrables services à l'hôte : aide à la digestion, production de certaines molécules absorbées par l'intestin et compétition qui prévient la colonisation par des microbes pathogènes. Dans le même temps, ils sont conscients de l'origine microbienne de nombre de maladies infectieuses. De grands débats agitent alors la communauté scientifique pour savoir si les microbes ont un rôle dans d'autres maladies telles que le diabète, l'athérosclérose, les affections de la peau, les maladies mentales, etc. Le rôle de la flore paraît alors fort

paradoxal : à la fois bénéfique et potentiellement nuisible. Une centaine d'années plus tard, ces questionnements semblent éminemment contemporains.

Est-il possible de vivre sans microbes ? C'est la grande question qui se pose alors. Pour essayer de répondre à cette question Nuttal, Thierfelder et Schottelius tentent d'élever des animaux dans des conditions d'asepsie complète, après une césarienne ou après l'éclosion des œufs, bien que ce soit alors très difficile à réaliser. Les scientifiques arrivent à des conclusions diamétralement opposées laissant donc la question non résolue. Cependant, il apparaît déjà assez clairement que, hormis chez les herbivores, pour un grand nombre d'animaux, la flore n'est pas indispensable à la digestion.

Les premières techniques d'élevage d'animaux en asepsie totale (ou axénie), dans des isolateurs, datent des années 1930 (Reyniers et al., 1959). Ces expériences répondent à la question de la nécessité des microbes pour la vie des animaux : les mammifères et les oiseaux, peuvent effectivement vivre sans être colonisés par des microbes, même si leur croissance n'est pas tout à fait similaire à celle des animaux dits « conventionnels » (Johansson and Sarles, 1949). L'étude des différences entre animaux axéniques, « germ free » et animaux conventionnels, apporte des données nouvelles sur le rôle des microbes dans le développement et la physiologie des animaux. Des décennies d'observations montrent que ces différences sont nombreuses (Round and Mazmanian, 2009; Smith et al., 2007).

En ce qui concerne l'intestin, on constate que le système digestif est globalement atrophié, le tractus est raccourci, les villosités et les cryptes sont plus courtes et le caecum est plus volumineux. L'intestin est plus oxygéné, la motilité est altérée et le temps de transit modifié. Plusieurs publications ont montré que les enzymes digestives sont plus abondantes et que l'on retrouve dans les fèces plus de mucine, de bilirubine, d'acides aminés ou encore d'acides gras non saturés. Les acides gras à chaînes courtes sont absents ainsi que d'autres molécules produites par le microbiote. Au niveau des cellules épithéliales, les animaux axéniques ont un temps de renouvellement de l'épithélium plus long en particulier dans l'intestin grêle. La composition de la mucine est différente. Au niveau de l'immunité mucoale, les principales différences sont, la réduction du système lymphatique, des lymphocytes T, des plaques de Peyer dans l'intestin grêle, des ganglions mésentériques et des centres germinatifs. De plus on observe que le niveau d'IgA est très diminué. Les animaux axéniques sont plus susceptibles à la plupart des infections bactériennes et virales mais ils semblent pouvoir développer une réponse immunitaire normale contre différents parasites.

Parallèlement au développement des élevages axéniques, les techniques de culture microbiologique se sont perfectionnées en particulier pour les bactéries intestinales (Hungate, 1950). Les isollements successifs sur différents substrats énergétiques et dans différentes atmosphères de culture en absence d'oxygène (chambre anaérobie ou culture en tube) ont permis de cultiver un large éventail de micro-organismes. Ces techniques ont donné un aperçu plus complet de la composition de la flore intestinale. Les avancées de la biologie moléculaire ont apporté des outils comme l'analyse des ARN 16S et 18S pour distinguer les lignées de microbes entre elles. La banalisation du séquençage a ensuite permis d'affiner l'identification des micro-organismes et ainsi nos connaissances de la diversité de cette flore (Matsen, 2015). Ces dernières années, un regain d'intérêt pour les techniques de culture, la mise en place de « culturOmic », a permis d'augmenter la proportion de bactéries intestinales cultivables, qui selon les études serait entre 75 et 95 % (Lagier et al., 2015, 2016; Lagkouvardos et al., 2017). Les techniques de cultures sont indispensables

pour comprendre dans le détail comment l'environnement influence le métabolisme des organismes, quelles sont les interactions avec d'autres microbes, et les interactions avec l'hôte.

Depuis une quinzaine d'années, de nouveaux outils techniques donnent des informations jusqu'à récemment très difficile à obtenir concernant des écosystèmes complets : métagénomique, métatranscriptomique, métaprotéomique, etc. Ces travaux donnent à la fois des informations sur le type d'organismes présents dans le microbiote et fournissent un catalogue des gènes, des transcrits ou encore des protéines qui sont présents dans une communauté microbienne à un instant donné. Il est ainsi possible d'extrapoler les capacités métaboliques d'un écosystème. Ces informations sont d'une grande puissance lorsqu'elles sont corrélées avec des données cliniques. C'est ce que ce sont efforcés de faire les grands projets sino-européens MetaHit et étasunien Human Microbiome Project (HMP) en séquençant les métagénomomes des différents microbiomes humains chez un grand nombre d'individus, aux statuts cliniques divers (Human et al., 2012; Li et al., 2014). Ces projets ont fortement augmenté le nombre des organismes connus. Cependant, ces nouveaux venus restent souvent à l'état d'OTU (Operationnal taxonomic unit) ou d'espèce métagénomique (MGS), ce qui indique une proximité d'identité avec des organismes connus mais ne permet pas leur étude spécifique. Pour le moment, l'études de ces organismes « *in silico* » : morphologie, paroi, température et habitat, etc., reste limitée car ils sont rarement isolés et caractérisés (Caro-Quintero and Konstantinidis, 2012; Konstantinidis et al., 2017). Après plus de 150 ans de recherche, l'écosystème intestinal a changé de nom, désormais il n'est plus question de flore mais de microbiote ou de microbiome, éliminant ainsi un terme historique qui rapprochait les microbes des plantes dites inférieures.

Les animaux axéniques sont un moyen unique d'observer les effets de la colonisation par des micro-organismes à différents stades de développement. Néanmoins, ces animaux présentent de nombreuses différences par rapport à des animaux conventionnels c'est pourquoi des équipes leur préfèrent des animaux traités avec des antibiotiques à large spectre pour étudier le lien entre microbiote et différentes maladies. L'introduction d'une espèce particulière ou d'un consortium d'espèces permet d'associer un phénotype à une bactérie ou un mycète particulier. Ces modèles

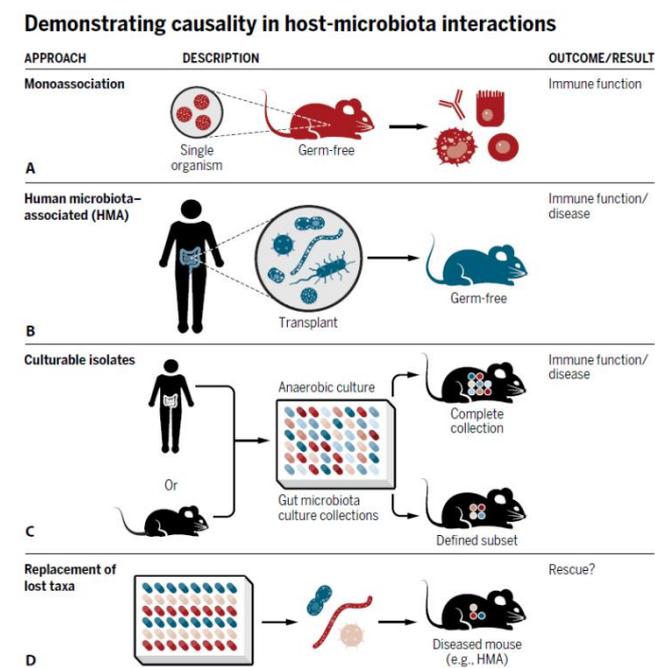


Figure VI-1 : Différentes stratégies pour démontrer que l'apparition d'un phénotype chez les animaux axéniques est due au microbiote (souris ou autre). HMA : human-microbiota associated. Tiré de Round 2018

autorisent la mise en évidence de corrélation, voire de causalité, dans les relations entre microbiote et hôte. Des travaux spectaculaires ont ainsi montré qu'il est possible de transférer une pathologie en transférant la flore intestinale d'un animal malade dans un animal axénique sain (Berer et al., 2017; Turnbaugh et al., 2006). Parallèlement, les études de métagénomique ont lié des modifications de la structure et de diversité du microbiote avec un nombre croissant de maladies. Dans le cas des MICI, ces perturbations du microbiote ou dysbiose sont bien caractérisées (Lepage et al., 2011; Machiels et al., 2014; Manichanh et al., 2006; Mondot et al., 2011; De Preter et al., 2015; Walters et al., 2014).

Le microbiote d'un individu est dit dysbiotique lorsqu'il est perturbé, atteint d'une baisse de la diversité globale et quelques fois d'une expansion de bactéries normalement présentes en faible proportion. À ce jour, il est très difficile de définir ce qu'est un microbiote sain ou symbiotique. En conséquence, il n'est pas possible de donner une définition précise de la dysbiose. Le dysfonctionnement du microbiote peut avoir un impact au niveau intestinal et également au niveau systémique. Des corrélations ont été établies entre un changement de composition du microbiote et différentes maladies : obésité, allergie, asthme, maladie cardiovasculaire, syndrome métabolique, maladies auto-immunes comme le diabète, maladies inflammatoires ou encore troubles psychologiques. Les différentes stratégies qui permettent de montrer des liens de causalité entre la composition du microbiote et phénotypes, sont schématisées dans la Figure VI-1

2. Aperçu du microbiote en 2018

Chacune des techniques développées ont permis de mieux décrire et donc de mieux comprendre les relations qu'entretiennent les micro-organismes commensaux et leurs hôtes. Nous savons aujourd'hui que le microbiote intestinal est composé d'un très grand nombre de Virus puis, par ordre d'abondance, d'Eubactéries, d'Archées et d'Eucaryotes (fungi et protozoaires). Certains de ces organismes ne vivent que de manière transitoire dans l'intestin quand d'autres y résident de manière pérenne. Des populations adhèrent au mucus tandis que d'autres vivent dans la lumière intestinale. Le tractus digestif forme différentes niches écologiques, relativement stables, différentes par leur pH, leur potentiel redox et le temps de transit. Les organismes du microbiote trouvent dans ces biotopes de nombreux nutriments qui rendent possible leur survie et leur maintien. Ils produisent diverses molécules ou métabolites qui peuvent être absorbés par l'hôte. Les métabolites bactériens sont les mieux caractérisés. Ce sont des vitamines, des dérivés de la dégradation des fibres alimentaires et un éventail de peptides, sucres et lipides que nous évoquerons dans la dernière partie de ce chapitre.

Dans la suite de cet exposé nous nous concentrerons sur les bactéries du microbiote intestinal, qui est la composante étudiée dans cette thèse. Le tractus intestinal est, comme cela avait été observé dès le XIXe siècle, colonisé à la naissance par des consortiums de bactéries qui varient selon l'âge, l'environnement, régime alimentaire et le type de délivrance et l'histoire clinique. La stérilité des enfants in utero est aujourd'hui contestée cependant s'il y a colonisation pendant la gestation, elle serait relativement faible (Perez-Muñoz et al., 2017). L'origine géographique et le patrimoine génétique, ont une influence très faible que la composition du microbiote (Goodrich et al., 2016; Rothschild et al., 2017). Si, après les premières années de la vie, le profil du microbiote d'un individu, tel qu'il est perçu dans les fèces, est globalement stable au niveau des espèces dominantes, il peut être transitoirement influencé par les maladies, les traitements médicamenteux. Les espèces en sous-dominance ont une plus grande

tendance à varier. Le microbiote intestinal, comme de nombreux écosystèmes complexes, est caractérisé par une grande résilience qui lui permet de faire face aux perturbations. En fonction de l'importance des perturbations et de leurs fréquences, le microbiote peut revenir à son équilibre antérieur ou trouver un nouvel équilibre. Les paramètres qui déterminent la résilience de cet écosystème font actuellement l'objet d'intenses recherches (Dethlefsen and Relman, 2011; Gibson et al., 2014). La diversité paraît être l'une des clefs de la stabilité du microbiote.

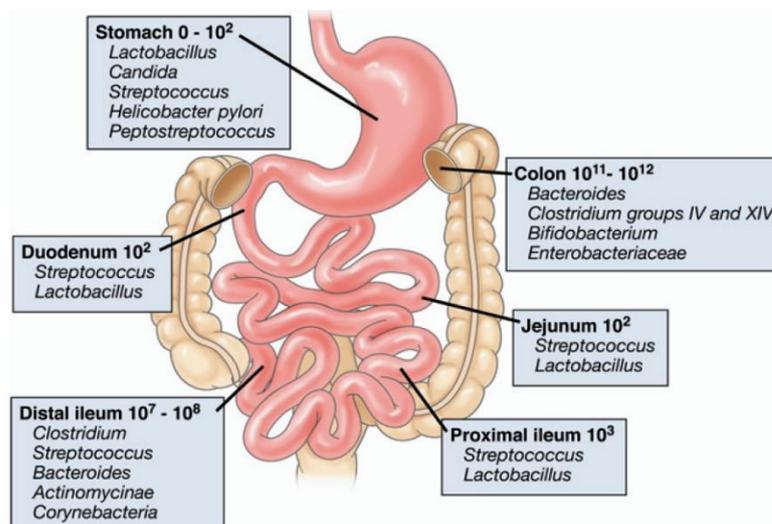


Figure VI-2 : Composition et nombre des bactéries le long du tractus digestif, en organisme/g de contenu intestinal. Tiré de Strator 2008

Les informations sur le microbiote intestinal humain et murin proviennent dans leur très grande majorité, d'échantillons fécaux et non pas de prélèvements internes. Chez l'humain, les comparaisons entre des microbiotes fécaux et des microbiotes du côlon (lumière ou muqueuse) montrent que les communautés retrouvées ne sont pas les mêmes (Eckburg et al., 2005; Marteau et al., 2001; Nava and Stappenbeck, 2011). Chaque individu hébergerait dans son intestin entre 500 et 1000 « espèces » de bactéries, anaérobies pour la grande majorité. Les données des différents projets métagénomiques indiquent que chez l'ensemble des humains échantillonnés, le microbiote intestinal serait riche de plusieurs milliers d'« espèces » de bactéries. Les catalogues métagénomiques représentent environ dix millions de gènes, non redondants, à 99.1 % bactériens. Ce chiffre est à mettre en relations avec les quelques 20 000 gènes présents dans le génome humain. Il existe probablement une forte redondance d'un certain nombre de fonctions codées dans le microbiote. Les cohortes étudiées sont encore trop petites pour avoir une vision précise de la diversité du microbiote.

Ces bactéries appartiennent principalement à deux grands phyla : Bacteroidetes et Firmicutes. D'autres phyla plus minoritaires sont présents comme les Actinobacteria (*Collinsella*, *Bifidobacteria*, *Atopobium*), les Proteobacteria et les Verrucomicrobia (*Akkermansia*). Le phylum des Bacteroidetes, des bactéries à Gram⁻, est principalement représenté dans l'intestin par les genres *Bacteroides* et *Prevotella*. Les Firmicutes sont des bactéries à Gram⁺, qui comprennent surtout les ordres des *Lactobacillales* et des *Clostridiales*. Les *Clostridiales* sont un groupe de bactéries hétérogènes qui est en pleine reclassification. Parmi les *Clostridiales* les genres les plus abondants sont les *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* et *Butyrivibrio*. Les groupes de bactéries présentes en sous-dominance sont plus difficiles à étudier. Certains auteurs ont pu remarquer que cette diversité est relativement faible comparé à la cinquantaine de phyla bactériens existants ce qui suggère une coévolution assez restrictive. A l'inverse, l'un des caractères particuliers de cet écosystème est sa très grande richesse totale, en terme de nombre de

bactéries (diversité α). De plus, bactéries intestinales sont relativement typiques des intestins, elles se sont peu présentes dans d'autres biotopes (Mondot et al., 2013). Le microbiote de notre espèce est nous est propre. En effet, si les humains et les souris partagent une composition semblable au niveau des phyla, lorsque l'on étudie la composition au niveau du genre et de l'espèce, il semble que 85% des espèces présentes chez l'humain ne soient pas présentes chez la souris (Ley et al., 2005).

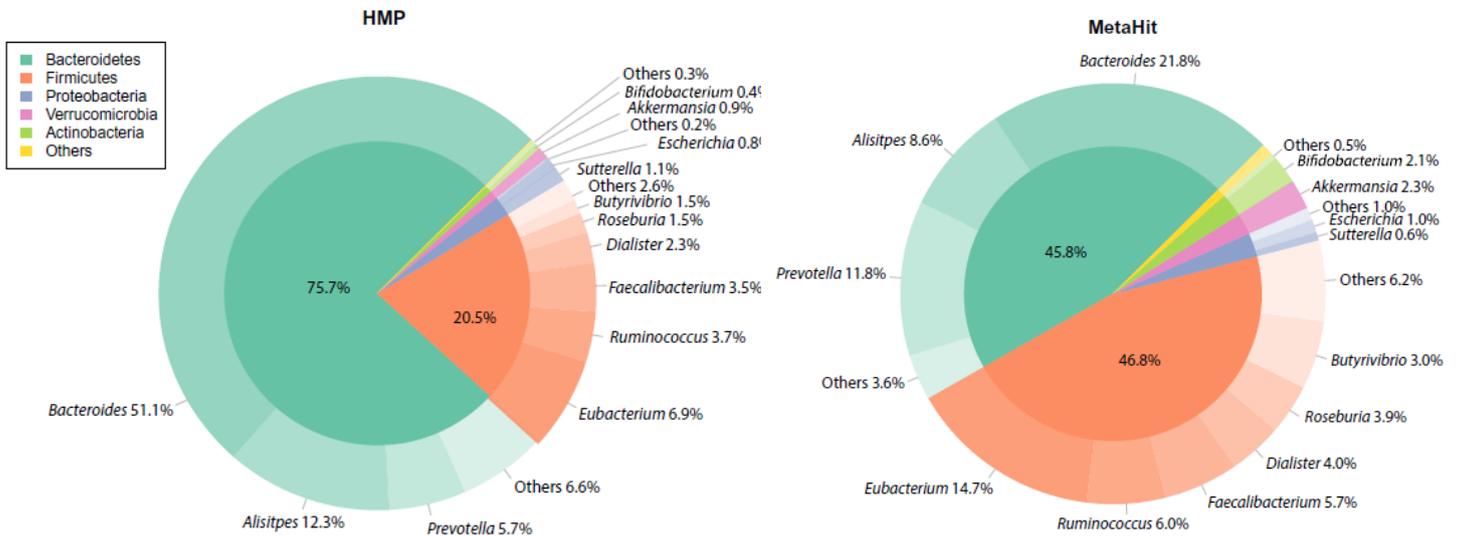


Figure VI-3 : Distribution des bactéries du microbiote fécal humain selon leur phylum et leur genre. Les échantillons provenant des études HMP et MetaHit montrent qu'il existe une forte variabilité entre proportions des phyla selon les individus. Adapté d'Arora 2016

Les études publiées à la suite de MetaHit montrent qu'il existe un noyau phylogénétique comprenant les espèces partagées par 50% des individus échantillonnés (Falony et al., 2016; Qin et al., 2010). Ce noyau comporte une centaine d'« espèces », appartenant principalement aux Bacteroidetes et aux Firmicutes. La composition du microbiote intestinal à l'âge adulte est en partie héritée par l'allaitement, le régime alimentaire et le mode de vie. Entendue comme le nombre de gènes du microbiote portés par un individu, la diversité individuelle n'est pas répartie de manière homogène : certains individus sont porteurs d'une plus grande diversité métagénomique que d'autres. La diversité suit une distribution bimodale avec un groupe dit « High gene count » et un groupe « Low gene count » (Le Chatelier et al., 2013). Les individus ayant une plus faible diversité auraient une plus forte proportion de *Bacteroides* et répondraient moins bien à des traitements contre l'obésité.

Il est possible de stratifier la population humaine en fonction de la composition de leur microbiote en trois grands groupes, appelés entérotypes. Chaque entérotype est caractérisé par l'abondance d'un groupe : *Prevotella*,

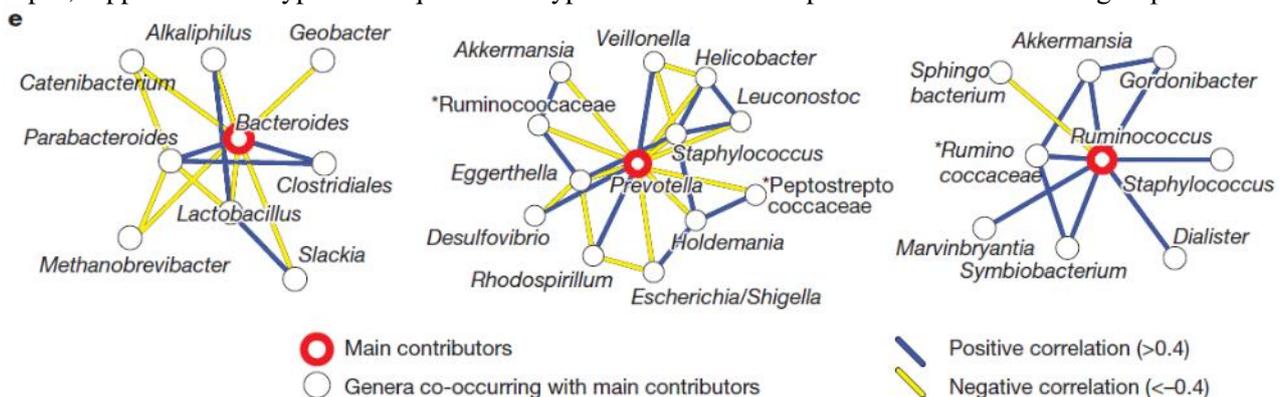


Figure VI-4 Représentation des réseaux de cooccurrences au sein de chaque entérotype. Les genres avec une *, n'ont pas d'assignation taxonomique précise. Tiré d'Arumugam 2011.

Bacteroides, *Ruminococcus* qui détermine la présence d'autres genres bactériens, comme illustré dans la Figure VI-4 (Arumugam et al., 2011; Costea et al., 2018; Falony et al., 2016; Zhernakova et al., 2016). Les entérotypes pourraient avoir un intérêt clinique à la fois comme indicateur de risque, comme élément de diagnostic sur l'avancement ou sur l'identification de maladie (Le Chatelier et al., 2013; Nielsen et al., 2014; Qin et al., 2014; Riva et al., 2016; Sokol et al., 2009). Par exemple l'augmentation des *Bacteroides* est associée à une réduction de la diversité globale, au développement de la stéatose hépatique, du cancer colorectal, à la maladie cœliaque ainsi qu'à une inflammation de bas grade. L'abondance des *Prevotella* serait liée à l'utilisation d'antibiotiques sur de longues périodes, au diabète de type II ou encore à l'arthrite rhumatoïde. Ces informations pourraient aussi être utilisées pour prédire le métabolisme de certains médicaments ou la réponse à un traitement spécifique (Forslund et al., 2015; Pitt et al., 2016; Spanogiannopoulos et al., 2016). Les études publiées sur les associations entre entérotypes et pathologies dans différentes cohortes ne sont pas toujours concordantes. Des efforts pour mieux comprendre le sens physiologique et les mécanismes de ces associations sont en cours, notamment en étudiant les bases moléculaires du dialogue entre hôte et microbiote. Les changements dans la structure des communautés microbiennes, les dysbioses, coïncident avec des modifications des molécules produites. Comprendre comment sont régulées les différentes communautés et les fonctions métaboliques qu'elles assurent est nécessaire pour la mise en place de thérapies visant à modifier ou à restaurer le microbiote.

3. Les métabolites provenant du microbiote : un immense éventail de composés à découvrir et caractériser

Le microbiote intestinal, fort de ces 10^{11} organismes par gramme de contenu dans le côlon (Whitman et al., 1998) et de ses millions de gènes, produit une grande quantité de molécules, de nature très diverse. En parallèle des études sur les animaux axéniques et sur les cohortes humaines, les travaux de métabolomique ont permis d'identifier et de constituer un catalogue qui contiendrait au minimum 500 000 molécules, sur l'ensemble des microbiotes présents sur le corps (Dorrestein et al., 2014). Ce nombre varie selon que l'on considère une molécule ou toutes ses variations possibles produites par des modifications post-traductionnelles. Le couplage de la chromatographie et de la spectrométrie de masse donne accès à des milliers de molécules à partir desquelles il est possible de reconstruire les voies de synthèse grâce aux informations contenues dans les catalogues de métagénomiques (Marcobal et al., 2013). On peut mettre en évidence des corrélations entre la présence d'un métabolite et une pathologie, qui peuvent ensuite être testées dans des modèles animaux ou *in vitro*. Les premiers travaux de métabolomique comparant des animaux axéniques à des animaux conventionnels ou à des souris aux microbiotes humanisés, datent d'une dizaine d'années (Claus et al., 2008; Wikoff et al., 2009). Ils ont confirmé l'importance biologique de certaines molécules produites ou transformées par le microbiote intestinal : vitamines (K, B12, biotine, folate, thiamine, riboflavine, pyridoxine), tryptophane, acides gras, triméthylamine (TMA) ou encore les acides biliaires (Martin et al., 2007; Maslowski et al., 2009). La compréhension des mécanismes de régulation du microbiote lui-même et du dialogue hôte-microbiote réside probablement dans la caractérisation des molécules et l'étude de leurs circulations (Dorrestein et al., 2014; Sharon et al., 2014). Dans un article de 2015 M. Donia et M. Fischbach proposent de classer les quelques 15 000 petites molécules identifiées dans l'ensemble des microbiotes humains (peau, bouche, intestin, etc.) en grandes catégories selon leur nature. Cet article est résumé dans la Figure VI-5 (Donia and Fischbach, 2015) :

Peptides avec modifications post-transcriptionnelles (RiPP) :

Ce sont des peptides toxiques pour un groupe limité de bactéries, proches de celles qui les produisent. Les RiPP sont probablement importants dans la colonisation des niches et les relations bactéries-bactéries (Donia et al., 2014).

Il existe de nombreux sous-groupes de RiPP dont quatre ont été identifiés dans des bactéries associées aux humains :

- Lantibioques et bactériocines : les lantibiotiques sont de petits peptides modifiés, comprenant moins de 40 acides aminés, qui comportent un groupe thiol et une sérine ou thréonine qui forment le « lanthionine », très stable. Les lantibiotiques sont produits par les Firmicutes et ciblent d'autres Firmicutes. Les bactériocines sont des peptides plus longs qui assurent les mêmes fonctions.

Exemples : salivaricine (*S. salivarius*), ruminococcine A (*R. gnavus* et *C. nexile*), staphylococcine (*S. aureus*)

- Microcines ou TOMM (thiazole/oxazole-modified microcin) : ce sont des peptides avec des modifications peu courantes comme des conversions de résidus en thiazoles, oxazoles, l'ajout de sidérophores, etc. Les microcines sont produites par les *Enterobacteriaceae* et ciblent des bactéries apparentées. Les TOMMS sont similaires mais ils sont produits par un large spectre de bactéries à Gram⁺ et Gram⁻.

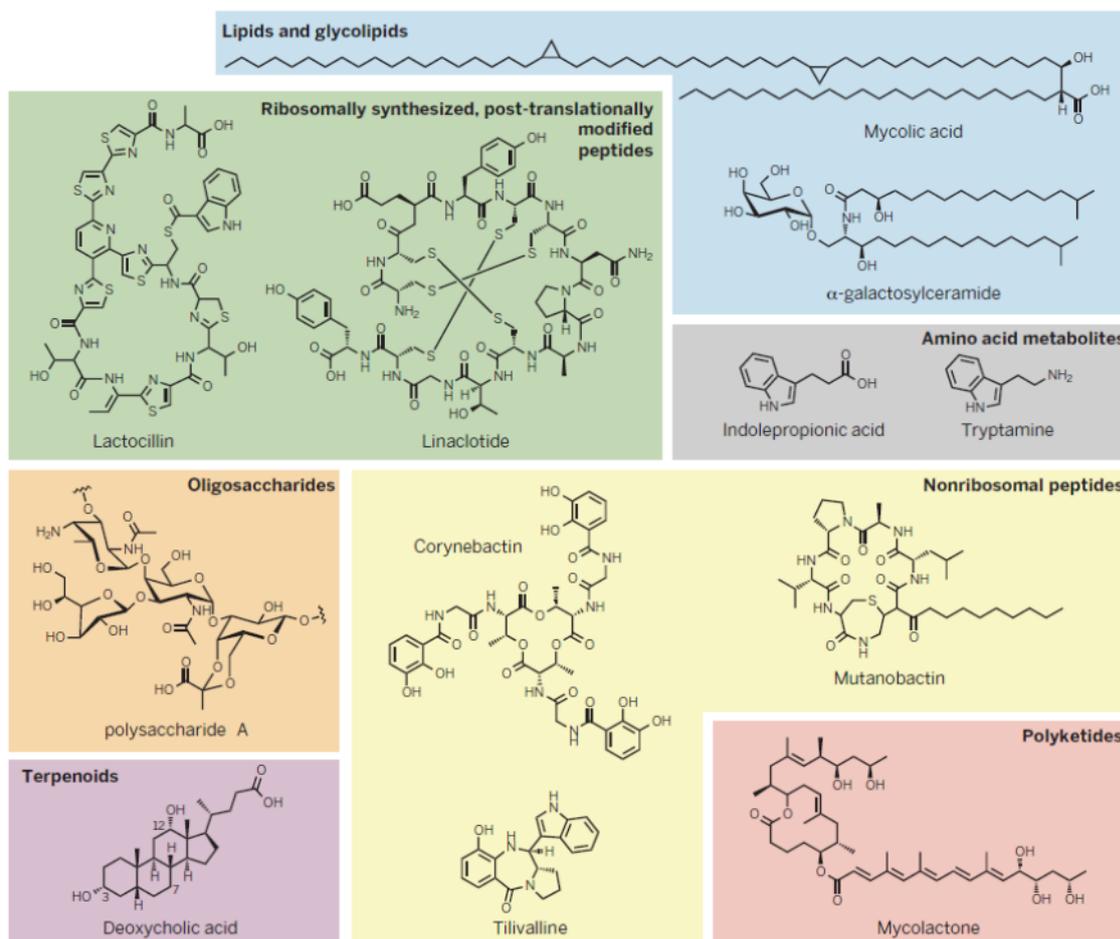


Figure VI-5 : Diversité de structures et de natures des petites molécules provenant du microbiote intestinal humain. Tiré de Donia 2015

Exemples : microcine B17, C7 ou streptolysine S (*S. pyogenes*), listeriolysine S (*L. monocytogenes*) ou encore clostridiolysine (*C. botulinum* et *C. sporogenes*)

Polykétides et peptides non ribosomaux

Ce sont des molécules très abondantes dans les écosystèmes édaphiques et aquatiques mais apparemment plus rares dans tous les microbiotes humains (Donia et al., 2014). Deux facteurs de virulence appartenant à cette catégorie ont été décrits chez *S. aureus*, *S. epidermidis*, sur la peau et *S. mutans*, sur les dents. Les gènes codant la synthèse de molécules comme les pyrazinones et les dihydropyrazinones sont particulièrement présents dans la classe des *Clostridia*. Ces molécules inhibent les protéases humaines et sont présentes dans près de 88% des échantillons fécaux du projet HMP (Guo et al., 2017a).

Exemples : molécules connues chez les pathogènes : cereulide, mycolactone, colibactine, tilivalline. La colibactine est également présente dans des souches non pathogènes d'*E.coli* comme la souche Nissle 1917.

Entérotoxines résistantes à la chaleur

Les entérotoxines sont des peptides proches des RiPP qui n'interviennent pas à priori dans les relations bactéries-bactéries mais dans les relations avec l'hôte. La plus connue est la toxine produite par *E. coli* qui mime les effets de peptides humains, guanyline et uroguanyline. Elle se lie aux récepteurs à la surface des cellules épithéliales, ce qui active la sécrétion d'électrolytes dans la lumière intestinale qui provoque une diarrhée.

Produits du métabolisme des acides aminés

Les acides aminés servent de substrats énergétiques aux bactéries protéolytiques. Dans le côlon, pauvre en oxygène, la fermentation des protéines a lieu par la voie réductrice de déamination. Les produits de cette dégradation sont les acides gras, dont les acides gras ramifiés, l'ammoniac, les phénols, les polyamines etc. Les bactéries utilisent fréquemment les acides aminés comme accepteur d'électrons ce qui génère un grand nombre d'acides aminés réduits, ce qui constitue une signature assez spécifique à cet écosystème (Davila et al., 2013). Les molécules sont souvent absorbées par l'hôte et s'accumulent dans les tissus.

Un exemple caractéristique des produits dérivés des acides aminés, est le tryptophane. Un grand nombre de métabolites en sont dont les indoles, l'acide indole-propionique ou la tryptamine. Les indoles servent de molécule de dialogue entre les bactéries et sont absorbés par l'hôte où ils sont modifiés. Les indoles sont des ligands du facteur de transcription AhR qui en régulant les lymphocytes innés ROR γ t producteurs d'IL22, favorise l'intégrité de la barrière intestinale (Spits and Mjösberg, 2012). La tryptamine peut agir comme un neurotransmetteur sur le système nerveux entérique. Un autre produit du métabolisme des acides aminés est le neurotransmetteur GABA (acide γ -aminobutyrique) produit par de nombreuses bactéries.

Les produits lipidiques

- Terpénoïdes

Les terpènes les plus abondants dans le microbiote intestinal ne sont pas produits par les bactéries elles-mêmes, mais dérivent du métabolisme de l'hôte. Ils proviennent des acides biliaires primaires, acide cholique et acide

chénodésoxycholique, synthétisés par le foie et sécrétés dans la bile. Si la majeure partie (90 %) est réabsorbée dans l'iléon, le reste passe dans le côlon. Les acides biliaires primaires y subissent de nombreuses modifications par le microbiote intestinal : déconjugaison, oxydation, épimérisation, réduction, estérification, etc. Les acides biliaires sont reconnus par le récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X receptor) et des récepteurs membranaires tels que TGR5 (G protein-coupled membrane receptor 5). Les récepteurs des acides biliaires régulent le métabolisme du glucose, des lipides, de l'insuline par exemple ainsi que les réponses immunitaires. Certains Firmicutes ainsi que des Bacteroidetes forment des espèces qui peuvent être toxiques pour l'hôte comme l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA) (Veldhoen and Ferreira, 2015; Wahlström et al., 2016).

- Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont une autre catégorie de terpène, est connue pour avoir des rôles biologiques importants chez l'humain (Veldhoen and Ferreira, 2015). Ces molécules, souvent des pigments, protègent l'hôte des radicaux oxygénés. Dans le microbiote cutané, la staphyloxanthine est un caroténoïde ancré dans la membrane de *S. aureus* auquel la bactérie doit sa couleur. La staphyloxanthine est un facteur de virulence qui protègerait la bactérie du stress oxydatif de la réponse immunitaire de l'hôte (Cimermancic et al., 2014).

- Glycolipides

Le plus connu des glycolipides est le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram⁻ qui est reconnu par le système immunitaire de l'hôte. D'autres glycolipides bactériens sont décrits comme les α -galactosylcéramides de *Bacteroides* et les acides mycoliques de *Corynebacterium* et des *Mycobacterium*. L' α -galactosylcéramide produit par *B. fragilis* a la capacité d'inhiber la réponse des cellules NK T dans l'intestin et protège d'une colite induite. Les acides mycoliques sont de longues chaînes carbonées avec deux queues lipidiques qui sont reconnues par les cellules T et provoquent une réponse anti-infectieuse.

- N- Acylamides

Les N-acyl amides à longues chaînes sont de métabolites produits par des bactéries appartenant principalement aux Proteobacteria et aux Bacteroidetes ainsi qu'aux Firmicutes de façon minoritaire. Ces métabolites sont présents dans les microbiotes des fèces et de la bouche et chez 90% des individus échantillonnés. Les rôles des N-acyl amides pour les bactéries elles-mêmes ne sont pas connus. En utilisant des approches de caractérisation *in silico* des molécules présentes dans les bases HMP et Metahit, couplées à leur caractérisation *in vitro*, différentes études mettent en évidence la capacité de certains N-acylamides bactériens à se lier à des récepteurs couplés aux protéines G (GPR) humains. Ces molécules miment les ligands produits par l'hôte et activent les récepteurs GPR119 (endocannabinoïde), S1PR4 (Sphingosine-1-phosphate receptor 4) ou encore PTGIR (Prostaglandin I2 receptor), impliqués dans différentes pathologies telles que les colites, l'obésité ou le diabète. Cette stratégie fructueuse, a permis d'identifier la comedamine, comme ligand du récepteur GPR132/G2A, resté jusque-là orphelin et lié à des maladies auto-immunes (Cohen et al., 2015, 2017).

Oligosaccharides

Les polysaccharides de capsules de *Bacteroides* et de *Streptococcus* sont bien connus pour avoir en plus de leur rôle structurel au niveau de la bactérie, un rôle important dans la modulation du système immunitaire. Le polysaccharide A (PSA) de *B. fragilis* a fait l'objet de nombreuses publications montrant qu'il induit une régulation de la réponse immunitaire (Mazmanian et al., 2008; Round and Mazmanian, 2010; Round et al., 2011a). Il existe des centaines d'autres polysaccharides de surfaces et de fragments de peptidoglycane dont on ignore les propriétés et qui peuvent être reconnus par les récepteurs TLR, NOD ou Lectine de type C.

Le travail de Donia et Fischbach relève que les gènes codant les oligosaccharides et les RiPP sont les plus présents dans les bases métagénomiques d'HMP. Toutefois, il reste à faire un travail effort important afin de compléter les bases de données car, faute d'information, une partie des séquences et des données de spectrographie ne peuvent être assignées.

Les produits de la dégradation des fibres alimentaires fait l'objet d'un exposé plus détaillé dans la partie suivante en raison de l'importance de ces molécules dans ce travail de thèse.

4. Les Acides gras à chaînes courtes (AGCC)

Origine et synthèse des AGCC

Une grande classe de molécules provient du métabolisme des polysaccharides dérivés des fibres (cellulose, arabinoxylanes, xyloglucanes, pectines et gommés), de l'amidon ainsi que du mucus produit par l'hôte. Selon leur régime alimentaire les individus absorbent entre 10 et 60 g de polysaccharides complexes qui sont principalement fermentés dans le côlon par les bactéries fibrolytiques. Les *Clostridiales*, les *Bacteroides* et les *Fusobacteria* sont les principaux groupes bactériens qui possèdent la machinerie enzymatique complexe qui permet la dégradation des fibres. Ce groupe d'enzyme est appelé CAZymes (Carbohydrate-active enzymes) et fait l'objet d'intenses recherches en raison de son potentiel pour la santé et de son intérêt industriel (Kaoutari et al., 2013; Patrascu et al., 2017). La dégradation des fibres conduit à la formation de pyruvate qui est ensuite transformé en acide gras à chaînes courtes par des voies métaboliques qui varient selon les espèces bactériennes (Duncan et al., 2004; Pryde et al., 2002). La fermentation des fibres ne produit pas uniquement des AGCC. Elles produisent des gaz : méthane et sulfite d'hydrogène, dont une grande partie est utilisée par les archées et les bactéries, méthanogènes et hydrogénéotrophes (Koh et al., 2016; Louis et al., 2004). Une part des produits de la dégradation des polysaccharides est utilisé par les micro-organismes du microbiote intestinal eux-mêmes, une autre est absorbée par l'épithélium, le reste est évacué avec les selles (Louis et al., 2014). Les voies métaboliques ainsi que quelques interactions trophiques entre bactéries

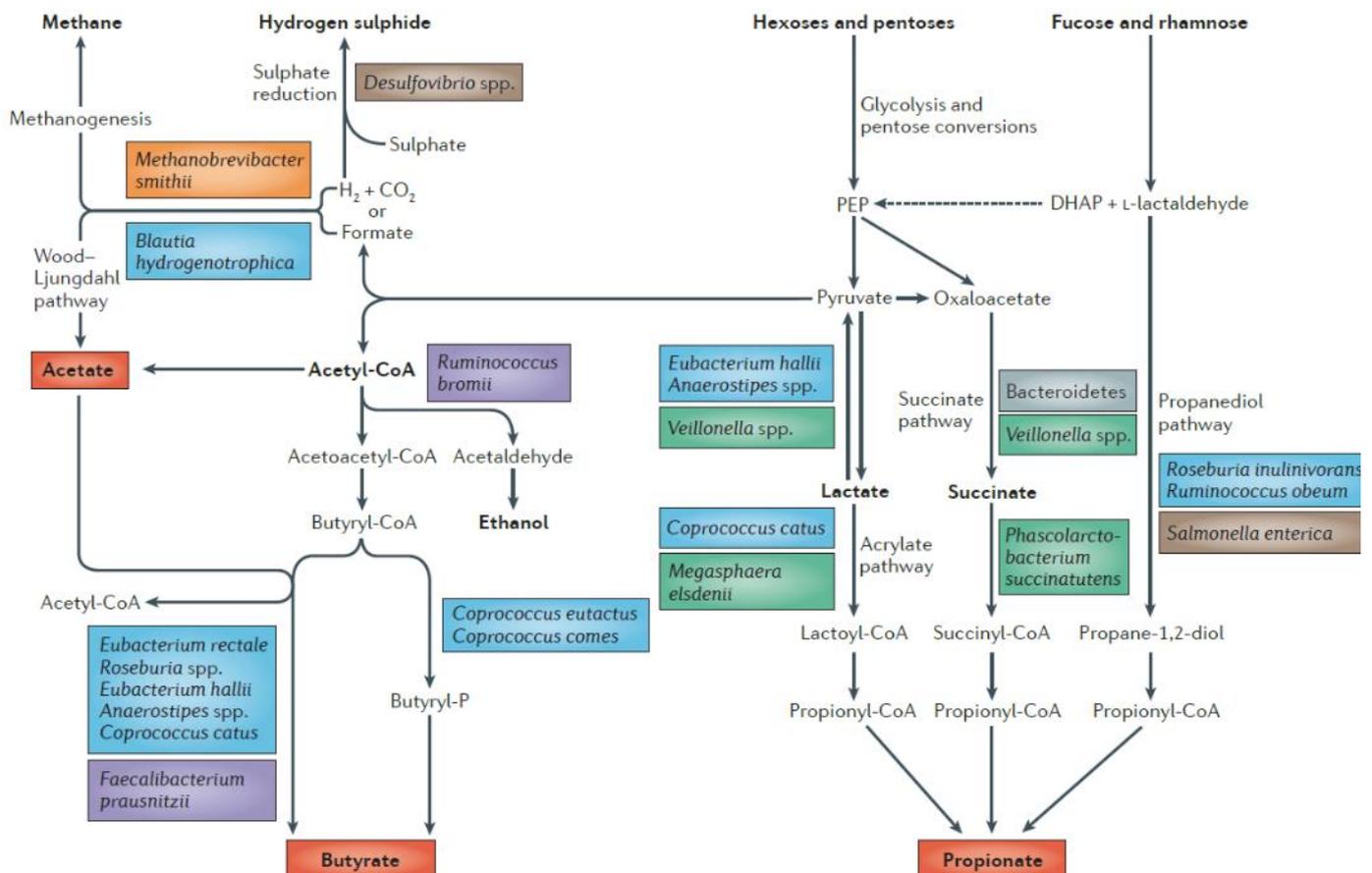


Figure VI-6 : Voies métaboliques qui mènent à la transformation des fibres alimentaires en métabolites. Des exemples de bactéries et d'archées pour lesquelles il y a des preuves expérimentales ou des informations métagénomiques sur l'utilisation de ces voies métaboliques. Les archées sont en orange, les Bacteroidetes en gris, les Proteobactéries en marron, les Firmicutes sont répartis en Lachnospiraceae en bleu, Ruminococcaceae en violet et Negativicutes en vert. DHAP : dihydroxyacetonephosphate; PEP : phosphoenolpyruvate. Tiré de Louis 2014

Absorption des AGCC et voies de signalisation

Les travaux chez l'humain, de Cummings et Macfarlane dans les années 1980 et 1990, indiquent que les trois acides gras principaux dans le côlon sont l'acétate (2 carbones C2), le propionate (C3) et le butyrate (C4) dans des concentrations d'environ 57/22/21 mM (Cummings et al., 1987). Les AGCC sont rapidement absorbés par l'hôte. Le butyrate joue un rôle particulier dans la physiologie intestinale. Il est le substrat énergétique utilisé de préférence par les entérocytes dans la β -oxydation, et ce même en présence de glucose. La β -oxydation a lieu principalement dans les mitochondries et permet la lipolyse des acides gras. En consommant l'oxygène présent dans la muqueuse, la dégradation des lipides favorise le maintien de l'hypoxie dans la lumière intestinale et cela explique le faible niveau de butyrate dans la circulation sanguine et dans les tissus. Le propionate est principalement métabolisé dans le foie. Seul, l'acétate peu métabolisée dans le côlon atteint des concentrations importantes en périphérie et dans le sang (100-150 μ M) alors que le niveau de butyrate et de propionate ne dépasse pas 1 μ M dans le sang. Le niveau d'AGCC dans les fèces dépend du régime alimentaire. Plusieurs études montrent que la supplémentation en fibres chez l'humain comme chez le rongeur modifie le temps de transit, diminue le pH intestinal et augmente la production d'AGCC (Lewis et al., 1997; Macfarlane and Macfarlane, 2003; Stephen et al., 1987).

Après des décennies d'études, les différents mécanismes d'entrée des acides gras au niveau de l'épithélium intestinal ne sont pas encore totalement compris et font encore débat (Argenzio, 1981; Cummings, 1981; Fleming and Yeo, 1990; Rambeau et al., 1987). Les acides gras à chaîne courte semblent pouvoir entrer quand ils sont sous forme d'acides, par des voies de diffusion passive. L'entrée par diffusion est probablement mineure puisque le pKa des AGCC se situe autour de 4,8 quand le pH du côlon se situe plutôt entre 6 et 7. Différents transporteurs régulent l'entrée des acides gras dans les entérocytes. L'entrée dans la cellule entraîne l'absorption de Na⁺, de Cl⁻ et d'H₂O ainsi que l'accumulation d'H⁺/HCO₃ favorable à leur absorption. Les deux principaux transporteurs dans le côlon sont le Monocarboxylate Transporter1 (MCT1 ou SLC16A1) et le Sodium Monocarboxylate Transporter 1 (SMCT1 ou SLC5A8). Leur capacité, leur expression et leur polarisation sont résumées dans le Tableau 2. Le transport des AGCC vers la circulation sanguines est contrôlé par MCT4 et MCT5 (Ritzhaupt et al. 1998; Gonçalves, Araújo, and Martel 2011; Lecona et al. 2008).

Plus récemment, différentes équipes ont montré que les AGCC sont les ligands des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR ou GPR) restés orphelins jusqu'à là (Brown et al., 2003; Le Poul et al., 2003; Thangaraju et al., 2009). Chez l'humain, les récepteurs GPR43 et GPR41, codés respectivement par les gènes *FFAR2* et *FFAR3* sont des récepteurs très proches des récepteurs reconnaissant des acides gras à chaînes moyennes ou longues. Ces récepteurs sont exprimés dans les entérocytes et les cellules immunitaires mais leur localisation à la surface des colonocytes n'est pas encore résolue. Cette question est déterminante pour comprendre leurs rôles puisque les concentrations apicales en AGCC sont de l'ordre du millimolaire quand elles sont de l'ordre du micromolaire sur la face basolatérale. L'affinité de GPR41 et GPR43 pour les AGCC est de l'ordre du micromolaire. Le GPR43 a plus d'affinité pour l'acétate que le GPR41. Les deux récepteurs ont une affinité sensiblement équivalente pour le propionate et le butyrate. Il existe également des différences entre souris et humain concernant les affinités des récepteurs (Hudson et al., 2012; Smith et al., 2011b).

Un groupe a mis en évidence un troisième récepteur, le GPR109a codé par le gène *HCAR2* (ou encore *PUMA*) et qui est fortement exprimé dans le côlon humain sur la face apicale des cellules. C'est un récepteur de la niacine et du butyrate, à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Une telle concentration ne se rencontre qu'au niveau de l'épithélium intestinal. Il existe un second isoforme, GPR109b, qui est également exprimé dans le côlon humain, mais il possède une très faible affinité pour la niacine et le butyrate

Tableau 2: Résumé des affinités des récepteurs et des caractéristiques des transporteurs des AGCC dans l'intestin humain ainsi que leur localisation

Nom	Affinité - Capacité	Localisation/intestin	Localisation/cellule
MCT-1/4	Lactate (C3) ≈ Butyrate (C4) ≈ Propionate (C3) ≈ Acétate (C2) faible affinité – forte capacité	Côlon ascendant > sigmoïde > intestin grêle (Al-mosawi et al., 2016)	Basolatérale (Wanaga et al., 2006) ≠ Apicale (Borthakur et al., 2012; Gill et al., 2005; Ritzhaupt et al., 1998a)
SMCT	Butyrate (C4) > Propionate (C3) > Lactate (C3) > Acétate (C2) forte affinité – faible capacité	Intestin grêle et côlon	
GPR41	Propionate (C3) ≈ Iso-butyrate (C4) ≈ Butyrate (C4) > Valérate (C5) > Acétate (C2)	Côlon (Tazoe et al., 2009)	
GPR43	Acétate = Propionate (C3) = Butyrate (C4) > Iso-butyrate (C4)	Côlon > intestin grêle	
GPR109a	B-D-hydroxybutyrate > Butyrate (C4) = acide nicotinique	Côlon	

Le récepteur GPR43 peut être couplé à deux types de sous-unités de protéines G : $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha i}$, selon le contexte. Le GPR41 et le GPR109a sont décrits comme étant uniquement couplé à la sous-unité $G_{\alpha i}$. (Taggart et al., 2005). Les voies de signalisation activées diffèrent selon les récepteurs, ce qui implique des effets physiologiques différents. De manière très schématique, l'activation de la sous-unité $G_{\alpha q}$ du GPR43 stimule la phospholipase- $C\beta$, ce qui provoque l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et l'activation de la PKC (Protein Kinase C). Les récepteurs couplés à $G_{\alpha i}$ inhibent la production d'AMPC (Adenosine mono phosphate cyclique), activant la PKA (Protein Kinase A) et les MAPK (ERK et p38). Cela provoque également une modification de l'équilibre ionique dans la cellule. Les voies de signalisation sont représentées dans la Figure VI-7 (Dorsam and Gutkind, 2007; Wang et al., 2018).

Les AGCC, de puissants régulateurs transcriptionnels

En plus de leurs impacts via les GPR, les AGCC régulent de nombreux processus cellulaires par le biais de l'inhibition de la déacétylation des lysines protéiques et en particulier des histones. Dès 1976, il a été montré que le

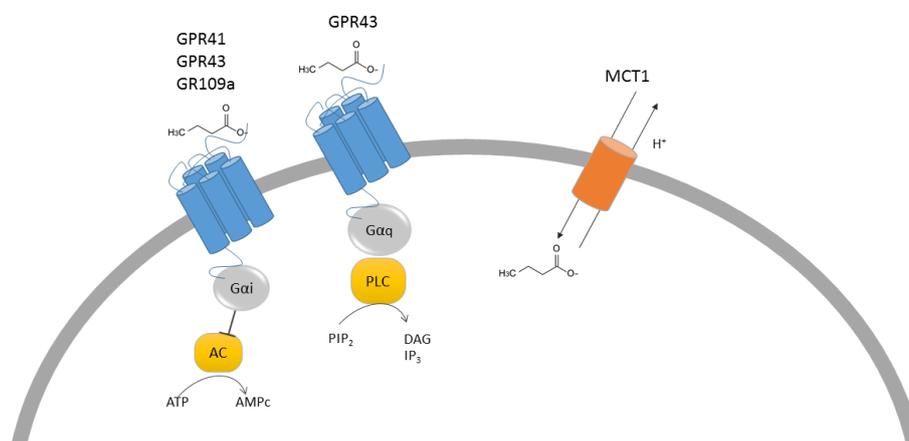


Figure VI-7 : Voies de signalisation mis en jeu par l'activation des GPR selon les sous-unités auxquelles ils sont liés et principal transporteur des AGCC.

butyrate exerce une fonction K/HDACi (lysine/histone deacetylases inhibitor), y compris dans des essais acellulaires (Boffa et al., 1978; Candido et al., 1978; Sealy and Chalkley, 1978). Le propionate et le valérate induisent également, mais dans une moindre mesure, une augmentation de l'acétylation (Hinnebusch et al., 2002). Cette activité est donc indépendante des GPR. Une étude transcriptomique sur une lignée cellulaire a montré que le butyrate modifie l'expression de 5 à 10 % des gènes humains (Rada-iglesias et al., 2007). D'autres travaux avec différents K/HDACi ont également mis en évidence un effet limité (Peart et al., 2005; Ruijter et al., 2005). Des études plus récentes montrent que le butyrate agit également sur l'acétylation de protéines, non histones, telles que les facteurs de transcription SP1 et FOXP3 (Arpaia et al., 2013; Thakur et al., 2016). Les K/HDACi peuvent augmenter aussi bien que diminuer l'expression d'un gène. Les K/HDACi sont classés en différentes familles selon leur nature et les différentes classes de HDAC qu'ils inhibent. Le butyrate appartient à la famille des acides aliphatiques tout comme le valproate. Ils ciblent les HDAC de classe I 1,2,3 et 8 et les HDAC de classe II 4,5,7 et 9. D'autres inhibiteurs tels que la Trichostatine A (TSA) et le Vorinostat (SAHA) appartiennent à la famille des acides hydroxyamiques (Dokmanovic et al., 2007; Gallinari et al., 2007). Les K/HDACi sont étudiés pour leur effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses et certains, comme le Vorinostat, sont autorisés en clinique.

Le butyrate inhibe les HDAC (Histone deacetylase) et favorise l'activité des HAT (Histone acetyltransferase). Le degré d'acétylation des histones régule la compaction de la chromatine en modifiant la charge positive portée par l'histone et ainsi son interaction avec l'ADN de charge négative. Schématiquement, les HDAC, qui sont des métalloenzymes, favorisent un état compacté de la chromatine quand les HAT permettent une ouverture de la chromatine, propice à sa transcription (Millard et al., 2017; Olson et al., 2015). Plusieurs groupes ont montré que les inhibiteurs hydroxyamiques ciblent le site catalytique des HDAC de classe I, en particulier la poche contenant un atome de zinc et agissent comme des chélateurs. Le mécanisme exact par lequel le butyrate inhibe les HDAC n'est pas connu mais il est possible qu'il agisse comme un inhibiteur allostérique en bloquant l'accès à la poche catalytique à la manière de l'inositol phosphate (Lu et al., 2003; Watson et al., 2016).

Rôle des AGCC sur la physiologie humaine et l'immunité en particulier

Les AGCC agissent à différents niveaux cellulaires : métabolisme, récepteur, inhibition des K/HDAC. Il n'est donc pas surprenant qu'ils régulent un grand nombre de gènes et qu'ils produisent des effets cellulaires très divers, qu'il n'est question de décrire ici dans leur ensemble. Nous allons nous concentrer sur l'impact des AGCC sur la physiologie intestinale et l'immunité. Les AGCC favorisent par différents mécanismes la tolérance immunitaire et l'homéostasie intestinale, résumés schématiquement dans la Figure VI-8 (Brestoff and Artis, 2013; Louis et al., 2014; Thorburn et al., 2014). En 2009, un travail important a montré que les souris déficientes en GPR43 ne sont pas protégées des colites par les AGCC, alors que chez les souris non mutées les AGCC limitent l'inflammation (Maslowski et al., 2009).

Les AGCC agissent sur la barrière intestinale en favorisant son imperméabilité. Ils augmentent la production de peptides antimicrobiens, comme LL37, par les cellules épithéliales et diminuent les cytokines pro-inflammatoires (Huang et al., 1997; Raqib et al., 2006). Les AGCC inhibent l'activation de NFκB dans les cellules épithéliales (Ishiguro et al., 2014; Venkatraman et al., 2003). Ils régulent aussi l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les GPR (Macia et al., 2015). De plus, le butyrate, via GPR109a, induit la production d'IL18 dans l'épithélium et les

cellules dendritiques. Enfin, la supplémentation en acétate augmente le niveau d'IgA intestinaux en activant GPR43 (Wu et al., 2017a). Un premier mécanisme passe donc par les GPR.

Le butyrate agit sur la différenciation et le fonctionnement des cellules dendritiques. Le traitement de cellules dendritiques provenant de donneur humain avec du butyrate diminue leur capacité de présentation des antigènes tout en augmentant la production d'IL10 (Goverse et al., 2017; Liu et al., 2012). Des travaux indiquent qu'en présence de LPS, le butyrate peut aussi promouvoir la production d'IL23 par les cellules dendritiques ce qui provoque la différenciation de lymphocytes T naïfs en Th17, quand d'autres montrent que les cellules dendritiques traitées au butyrate induisent, au contraire, la différenciation en Tr1 producteurs d'IL10 (Berndt et al., 2012; Kaiser et al., 2017).

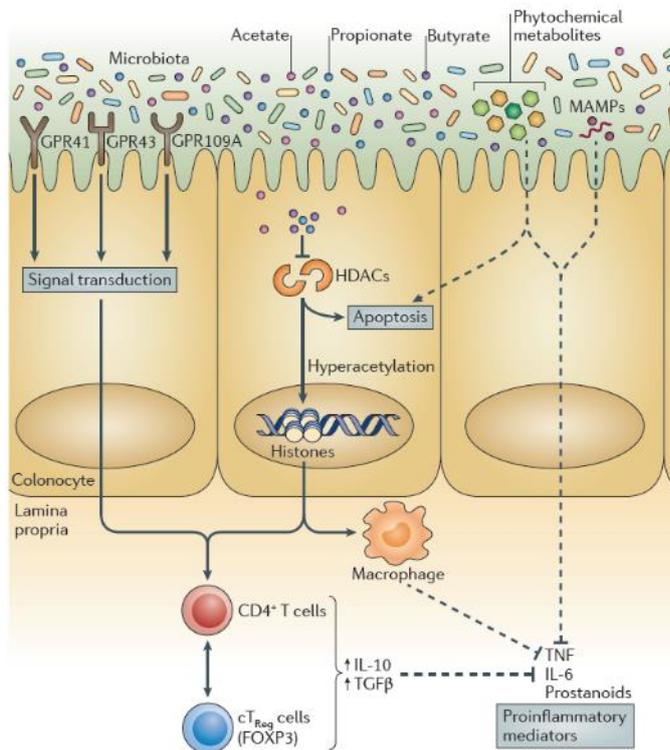


Figure VI-8 : Résumé simplifié de l'impact des AGCC produits par le microbiote sur l'immunité intestinale. Tiré de Louis 2014.

Les AGCC agissent aussi au niveau des lymphocytes en favorisant la différenciation en lymphocytes Treg dans l'intestin. En effet, le butyrate augmente l'acétylation du promoteur du facteur de transcription Foxp3 ce qui augmente son expression, essentielle à la différenciation des Treg (Chang et al., 2014; Furusawa et al., 2013). Un autre groupe a montré que le propionate pouvait induire les mêmes changements que le butyrate (Arpaia et al., 2013; Smith et al., 2013). Cependant, un travail légèrement postérieur indique au contraire que l'induction des Treg par les signaux du microbiote n'est pas corrélée avec la concentration des AGCC chez la souris. (Sefik et al., 2015)

D'autres équipes ont mis en évidence le rôle tenu par les cellules épithéliales, de médiateur des signaux du microbiote qui permet l'induction des lymphocytes Treg, à la fois via les AGCC, mais également aussi via d'autres molécules comme TGFβ1 (Atarashi et al., 2011b, 2013).

Les résultats obtenus dans les modèles *in vitro* et dans des modèles de souris sont à mettre en relation avec les données cliniques chez l'humain. Les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin présentent des dysbioses (Frank et al., 2007; Lepage et al., 2011; Machiels et al., 2014; Manichanh et al., 2006; Mondot et al., 2011;

De Preter et al., 2015; Treem et al., 1994; Walters et al., 2014). L'un des traits communs de ces maladies, est la diminution des bactéries productrices des AGCC. Des essais de supplémentation avec des AGCC ont montré qu'ils pouvaient diminuer l'inflammation dans certain cas de rectocolite hémorragiques (Hamer et al., 2008). Cependant les effets sont décevants, comparés à ceux obtenus *in vitro* et chez la souris.

Un nombre croissant d'équipes a démontré un effet protecteur des fibres dans de nombreuses pathologies, probablement dû, en partie aux AGCC : MICI, cancer colorectal, inflammation, allergie (Ignacio et al., 2016; Schroeder and Bäckhed, 2016; Tan et al., 2016a; Trompette et al., 2014). La supplémentation de l'alimentation par des fibres ou prébiotiques sont à la fois un enjeu de santé et un enjeu industriel.

VII. De l'ignorance immunologique au dialogue entre immunité et microbiote

Comme discuté un peu plus tôt dans ce chapitre, le microbiote intestinal produit un très grand nombre de molécules, qui peuvent se retrouver au contact des cellules épithéliales, échantillonnées par les dendrites des cellules dendritiques qui passent à travers l'épithélium. En dehors des AGCC, d'autres molécules bactériennes modulent la réponse immunitaire de l'hôte au niveau de l'intestin.

Les travaux pionniers de Kasper et Mazmanian menés dès 2005 ont montré que des molécules bactériennes de surface comme le polysaccharide A (PSA) de la bactérie commensale *Bacteroides fragilis* permettent la maturation et le développement d'un système immunitaire mature dans des souris axéniques. Les souris axéniques révèlent des défauts du système immunitaire tels qu'un nombre réduit de lymphocytes CD4, en particulier peu de Th17 et de Treg et des tissus lymphoïdes secondaires peu développés (Macpherson and Harris, 2004). Le PSA est un polymère qui induit *in vitro* et *in vivo* la prolifération des lymphocytes T (Mazmanian et al., 2005). Chez la souris, le PSA régule l'immunité de l'hôte dans un contexte d'une infection avec *Helicobacter hepaticus*. La molécule induit la différenciation de lymphocytes en Th1 (Mazmanian et al., 2008). Les souris axéniques ont une surreprésentation des Th2 en comparaison des Th1 par rapport aux souris conventionnelles. L'équilibre entre les deux populations de lymphocytes T est rétabli par la colonisation des souris axénique avec *B. fragilis*. De plus, cette équipe a montré que le PSA sécrété dans des vésicules extra-membranaires stimule la différenciation de Treg producteurs d'IL10, en activant TLR2 dans les cellules dendritiques (Round and Mazmanian, 2010; Shen et al., 2012). Un travail de crible a permis de trouver un groupe de gènes conservés chez les *Bacteroides* codant des polysaccharides nécessaires à la colonisation des cryptes intestinales, lesquelles constituent une niche bien particulière (Lee et al., 2013). Ces travaux, très complets, révèlent les mécanismes par lesquels des *Bacteroides*, appartenant à un phylum majeur du microbiote intestinal, parviennent à établir une tolérance immunitaire symbiotique.

Différentes équipes se sont intéressées aux mécanismes par lesquels les Firmicutes et en particulier les *Clostridiales* dialoguent avec le

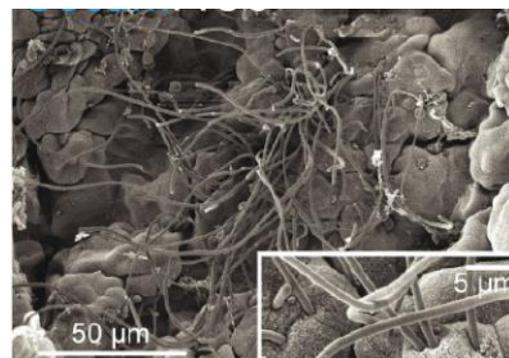


Figure VII-1 : Colonisation de SFB dans l'intestin d'une souris. Le cadre en bas à droite montre comment la bactérie s'attache dans l'épithélium. Tiré de Schnupf 2015

système immunitaire. Une bactérie filamenteuse segmentée, nommée SFB, adhère fortement à l'épithélium intestinal murin. Cette bactérie appartient au groupe des *Clostridium*, mais elle n'a pas encore reçu d'assignation taxonomique. La colonisation de souris axéniques par SFB conduit de manière, tout à fait unique, à l'augmentation des lymphocytes CD4 TH17 dans la *lamina propria* et dans les plaques de Peyer ainsi qu'à la production d'IgA (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009). En sa présence, les cellules épithéliales de l'intestin grêle secrètent des cytokines, des chimiokines, des peptides antimicrobiens ainsi que la protéine SAA (amyloïde sérique A). *In vitro*, SAA promeut la différenciation des CD4 en Th17, spécifiques de SFB. Les effets de SFB ne dépendent ni des TLR, ni des NOD ni du niveau d'ATP (Adénosine triphosphate). Chez la souris, l'accroissement de la population de Th17 ne conduit pas à une inflammation pathologique, mais à un niveau d'alerte physiologique du système immunitaire en recrutant des neutrophiles et des ILC3. La colonisation par SFB protège ainsi les animaux des infections par les entéropathogènes *C. rodentium* et *E. coli*.

Des bactéries commensales humaines adhèrent aux cellules épithéliales intestinales (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridiales*) et favorisent aussi la différenciation en Th17. L'adhésion est un point important dans le mécanisme qui provoque l'augmentation des Th17. Les SFB isolées de rat n'ont pas les capacités d'adhérence des SFB de souris lorsqu'elles sont implantées chez la souris et vis-versa. Ces travaux révèlent deux points particulièrement intéressants : d'une part la réponse de l'intestin à certaines bactéries est fortement compartimentée, d'autre part, la capacité d'immuno-modulation d'une bactérie peut être restreinte à une espèce témoignant de la forte coévolution hôte-bactérie (Atarashi et al., 2015; Lécuyer et al., 2014).

Les travaux de l'équipe de K. Honda ont montré que la colonisation par un mélange de *Clostridiales* est capable de provoquer la maturation du système immunitaire de souris axéniques. La colonisation augmente la population de Treg Foxp3 producteurs d'IL10 dans le côlon et en périphérie. Les souris chez qui l'on provoque une colite, sont protégées de l'inflammation. Ces publications sont originales, car elles pointent un rôle important des cellules épithéliales dans ce processus. Les bactéries secrètent des molécules qui augmentent la production par les colonocytes de molécules immuno-modulatrices comme IDO1, TGFB, MMP, etc. (Atarashi et al., 2011a, 2013). Ces effets sont

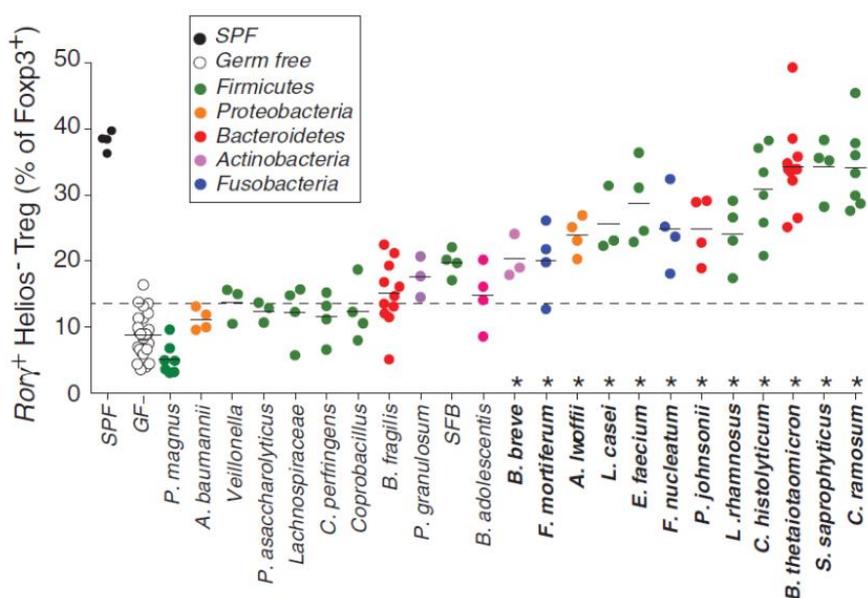


Figure VII-2 : Capacité de bactéries individuelles à promouvoir dans des souris axéniques l'expansion des Treg dans le côlon après 2 semaines de colonisation. Chaque point représente une souris. Les bactéries en gras ont une capacité significative à induire des Treg dans les souris colonisées. Souris axéniques (GF), souris conventionnelles sans pathogènes (SPF). Tiré de Sefik 2015.

indépendants de MYD88, de RIP2 et de Dectin1. La nature de ces molécules bactériennes n'a pas été identifiée, mais il semble qu'elles soient ni de nature protéique ni de nature nucléique. Elles sont également résistantes à la chaleur. Si les bactéries qui favorisent les Th17 adhèrent à l'épithélium, celles qui provoquent l'expansion des Treg ne le sont pas (Atarashi et al., 2015).

Une autre série de publications a mis en évidence que *Clostridium butyricum*, une bactérie probiotique vendue en Asie, qui est reconnue via TLR2 par les cellules dendritiques intestinales. L'activation de TLR2 active la voie ERK, aboutissant à la production de TGFB, essentiel pour les Treg. Le gavage de souris conventionnelles avec *C. butyricum* augmente le niveau de Treg dans le côlon (Hayashi et al., 2013; Kanai et al., 2015; Kashiwagi et al., 2015). D'autres *Clostridium* ont également la capacité d'induire une réponse anti-inflammatoire et de protéger les souris de colite. Les travaux sur *F. prausnitzii*, une bactérie abondante du microbiote intestinale, ont révélé qu'elle sécrète une molécule capable de diminuer le niveau d'inflammation *in vitro* et *in vivo* en bloquant l'activation de NFκB dans les cellules épithéliales et la production de cytokines inflammatoires (Martín et al., 2014; Quévrain et al., 2016; Sokol, 2008). Cette bactérie bloque l'expansion des Th17 et des Th1 dans différents modèles de colite (Breyner et al., 2017; Zhang et al., 2014).

Afin d'essayer de mieux comprendre les interactions entre les différentes bactéries intestinales et l'hôte, un microbiote minimale et défini, est utilisé chez la souris, la flore de Schaedler altérée (ASF). Elle contient huit bactéries : deux *Lactobacillus*, quatre *Clostridiales*, un *Parabacteroides* et un *Deferribacteres* (Brand et al., 2015). La colonisation de souris avec l'ASF provoque l'augmentation, l'activation et la génération *de novo* de Treg dans le côlon. Dans ce modèle, l'activation des Treg requière la présence de MYD88. L'homéostasie intestinale induite par la colonisation est dépendante de l'IL10 et d'un répertoire complet de TCR exprimé par les lymphocytes T (Geuking et al., 2011). Une publication récente indique que cette capacité à induire des lymphocytes Treg ne serait pas restreinte à un phylum spécifique, mais serait au contraire présente dans différents phyla (Figure VII-2). Dans ces travaux, il n'y a pas de corrélations entre l'induction de Treg et la production d'AGCC. Ces Treg induits dans le côlon expriment à la fois Foxp3 et RoRγt (Sefik et al., 2015).

Pour finir, il faut indiquer que certaines bactéries induisent des lymphocytes immunosuppresseurs moins bien caractérisés, les Tr1, qui n'expriment pas Foxp3 mais produisent de l'IL10. *Bifidobacterium breve* induit via TLR2 et MYD88 l'activation de cellules dendritiques tolérogènes qui produisent de l'IL10 et de l'IL27, qui induisent des Tr1 dans le côlon (Jeon et al., 2012). La stimulation des lymphocytes régulateurs, producteur d'IL10 via l'activation de TLR2 semble être un mécanisme commun par lequel de nombreuses bactéries participent à la tolérance immunitaire. Cette capacité immuno-régulatrice est partagée dans différents phyla, ce qui pourrait être la marque d'une forte pression de sélection.

Plusieurs notions émergent de l'ensemble de ces publications. Certains microbes comme SFB, commensaux chez un hôte en bonne santé, peuvent dans un contexte particulier devenir pathogènes. Le terme de pathobionte s'applique à des micro-organismes qui bien que commensaux

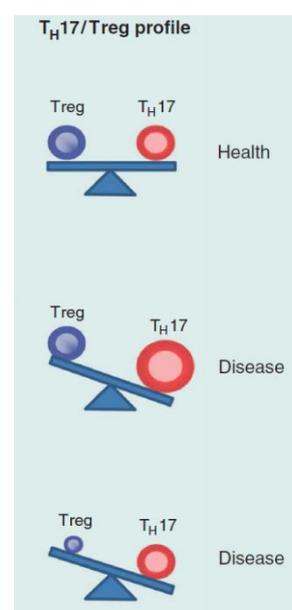


Figure VII-3 : Importance de l'équilibre Th17 et Treg dans l'homéostasie intestinale et en particulier dans la régulation la réponse immunitaire. Adapté de Lee 2011.

conservent un potentiel de pathogénicité qui s'exprime dans un contexte particulier. Or, il semble qu'une proportion importante de notre flore intestinale soit constituée de pathobiontes, proportion quantifiable, tant ce statut dépend du contexte de l'hôte et de l'environnement : infection, maladie auto-immune, immuno-dépression, malnutrition, obésité, MICI, cancer, etc. Il existe probablement un continuum entre la commensalité et la pathogénicité.

L'immuno-modulation induite par les bactéries commensales n'est pas univoque. Certaines contrôlent l'inflammation pour la maintenir à un niveau physiologique tandis que d'autres sont immuno-suppressives. Ces deux propriétés peuvent se révéler problématiques, soit en stimulant la réponse immunitaire à un niveau délétère soit en rendant le système immunitaire hypo-répondeur et permissif aux infections.

La façon dont le système immunitaire distingue des signaux provenant de commensaux de ceux provenant des pathogènes ne peut plus être expliquée uniquement par l'ignorance du système immunitaire reposant sur la ségrégation spatiale du microbiote qui limiterait les contacts. Tous les travaux montrent qu'il y a énormément d'échanges. Certains proposent que le système immunitaire, éduqué par le microbiote, apprend à reconnaître comme non-exogènes les signaux qui en sont issus (Lee and Mazmanian, 2010). Dans de nombreuses études, en particulier chez la souris, les mécanismes moléculaires qui permettent aux symbiotes de jouer sur le système immunitaire au niveau local et au niveau systémique ne sont pas connus précisément. Il faut aussi à prendre en compte le rôle de l'hôte. Le système immunitaire modifie et contrôle la composition du microbiote intestinal selon des mécanismes qui restent à explorer. Au travers des lymphocytes B qui produisent les IgA, des Treg, des ILC et des Th17, la présentation peptidique joue un rôle centrale dans l'éducation du système immunitaire dont on ne connaît pas encore tous les ressorts (Guo et al., 2015; Kawamoto et al., 2014; Lamas et al., 2016; Nishio et al., 2015).

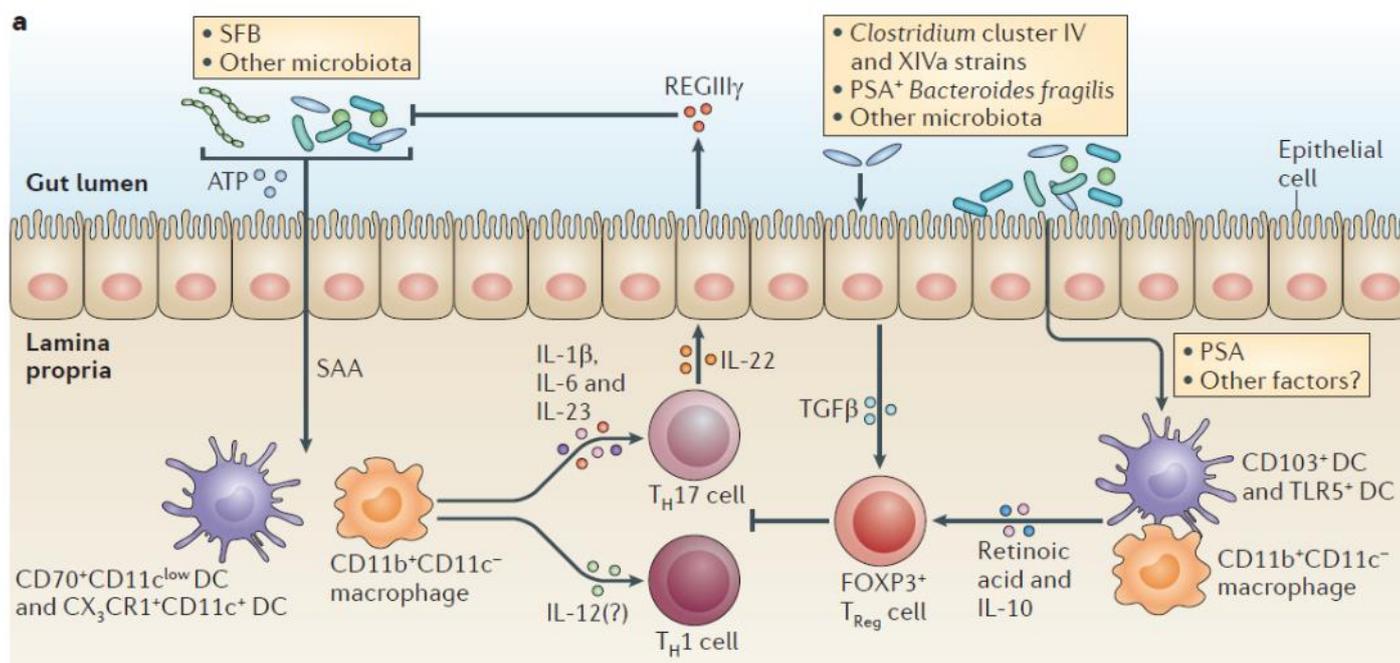


Figure VII-4 : Résumé des interactions entre certaines bactéries intestinales et le système immunitaire intestinal. Les cellules épithéliales, les cellules dendritiques (DC) et les macrophages induisent la différenciation en TH17, TH1 ou Treg en fonction du contexte moléculaire. Adapté de Kamada 2013.

Travail experimental

Article I : Le butyrate produit par le microbiote intestinal, inhibe l'expression de l'*indolamine 2, 3-dioxygénase 1 (IDO1)* via deux mécanismes dans les cellules épithéliales de l'intestin humain.

Introduction à l'article

L'indolamine 2,3 dioxygénase 1 (IDO1) participe par des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques à la régulation de l'immunité dans les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Fallarino et al., 2012). L'augmentation d'IDO1 dans les cellules dendritiques est corrélée à l'expansion de cellules anti-inflammatoires dans l'intestin (Fallarino et al., 2003; Matteoli et al., 2010). Au regard de la littérature existante sur les cellules professionnelles de l'immunité, peu de travaux se sont intéressés à la régulation d'IDO1 dans les cellules épithéliales de l'intestin. Des données cliniques indiquent que le niveau d'IDO1 est plus élevé dans l'épithélium intestinal chez les patients atteints de MICI sans toutefois, que son expression dans l'épithélium soit bien connue en dehors de pathologies inflammatoires ou cancéreuses (Barceló-Batllori et al., 2002; Ferdinande et al., 2008; Zhou et al., 2012). Un faisceau d'indices suggèrent qu'IDO1 pourrait jouer un rôle important dans la tolérance intestinale induite par le microbiote en régulant le système immunitaire au niveau des cellules épithéliales. Chez la souris l'expression d'*IDO1* dans l'intestin est dépendante de signaux provenant du microbiote et est indépendante de MYD88 (Larsson et al., 2012; Rhee et al., 2005b). De plus, les travaux d'Atarashi et Honda indiquent que certaines bactéries appartenant au groupe des *Clostridiales* augmentent *IDO1* dans les cellules épithéliales de la souris et que cet effet est corrélé à l'augmentation du nombre des lymphocytes T régulateurs intestinaux (Atarashi et al., 2011b).

Dans ce contexte, nous avons déterminés trois objectifs à cette étude. Le premier était d'établir parmi une centaine d'espèces, quelles bactéries intestinales sont capables de moduler, par la sécrétion de molécules, un système rapporteur du gène *IDO1* dans un modèle de cellules épithéliales intestinales humaines. Le second objectif était de déterminer les molécules bactériennes en jeu dans ces interactions. Enfin, notre dernière intention était de caractériser les mécanismes d'action de ces molécules sur *IDO1* dans des lignées cellulaires et dans des colonocytes primaires humains.

Ce premier article en cours de soumission, rapporte tout d'abord, qu'IDO1 est exprimé dans les colonocytes primaires humains au niveau des ARNm et au niveau protéique. Ces résultats justifient la pertinence d'étudier ce gène dans les cellules épithéliales intestinales. Parmi toutes les bactéries testées, nous avons découvert que seules certaines espèces appartenant aux groupes des *Clostridiales* et des *Fusobacterium*, impactent sur la régulation d'*IDO1* dans les HT29. Grâce à différentes techniques, nous avons pu mettre en évidence que ces bactéries inhibent *IDO1* en sécrétant du butyrate, un acide gras à chaîne courte. L'impact du butyrate a pu être confirmé sur dans des colonocytes humaines primaires. Le butyrate semble agir sur *IDO1* par ses propriétés d'inhibition des histones déacétylases et non en se liant aux récepteurs GPR connus de cet acide gras. Enfin, dans notre modèle cellulaire, le butyrate régule *IDO1* par deux mécanismes distincts. Il diminue le niveau de STAT1 et ce faisant son état de phosphorylation suite à une stimulation avec l'IFN γ . D'autre part, cette molécule agit sur le promoteur d'*IDO1* pour limiter la transcription de ce gène, de manière indépendante de la voie STAT1/IFN γ . Pour aller plus loin dans la compréhension de l'impact du

microbiote sur la régulation de l'immunité innée au niveau des cellules épithéliales, il serait intéressant d'étudier les conséquences fonctionnelles de la régulation d'*IDO1* dans des modèles plus complexes.

Article 1 en cours de soumission

Butyrate produced by commensal bacteria down-regulates *indolamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO-1)* expression *via* a dual mechanism in human intestinal epithelial cells.

Camille Martin-Gallausiaux^{1,2}, Pierre Larraufie^{1,3}, Anne Jarry⁴, Fabienne Béguet-Crespel¹, Ludovica Marinelli^{1,2}, Florence Ledue¹, Frank Reimann³, Hervé M. Blottière^{1,5} and Nicolas Lapaque^{1*}.

1.Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

2.Sorbonne Université, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France

3.University of Cambridge, Metabolic Research Laboratories and MRC Metabolic Diseases Unit, WT-MRC Institute of Metabolic Science, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK

4.INSERM UMR 1232, Université de Nantes, Nantes, France

5.MetaGenoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy en Josas, France

* Corresponding author: Dr Nicolas Lapaque

INRA-MICALIS UMR1319, Bat 442, Domaine de Vilvert 78350, Jouy-en-Josas, France.

e-mail: nicolas.lapaque@inra.fr

Abstract

Commensal bacteria are crucial for the development and maintenance of a healthy immune system therefore contributing to the global wellbeing of their host. A wide variety of metabolites produced by commensal bacteria are influencing host health but the characterisation of the multiple molecular mechanisms involved in host-microbiota interactions is still only partially unravelled. The intestinal epithelial cells (IEC) take a central part in this dialogue by providing not only a physical segregation from commensal bacteria but also by inducing the first microbial-derived immune signals. Amongst the effector molecules modulating the immune responses produced by IECs, indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO-1) has an important role in the gut homeostasis. *IDO-1* expression is dependent on the microbiota. To identify the metabolites regulating *IDO-1* expression in IECs, we screened bacterial supernatants derived from 135 commensal species on an *IDO-1* reporter system. We found that the short chain fatty acid (SCFA) butyrate is the main metabolite controlling *IDO-1* expression in IECs. This butyrate-driven effect was independent of the G-protein coupled receptors GPR41, GPR43 and GPR109a and of the transcription factors SP1, AP1 and PPAR γ present on *IDO-1* promoter. Our results showed that *IDO-1* down-regulation could be attributed to two independent mechanisms: a butyrate-dependent depletion of STAT1 and the histone deacetylase (HDAC) inhibitor property of SCFAs.

Introduction

The gut microbiome is a microbial ecosystem that exerts diverse functions often associated with beneficial physiological effects for its host. Among these essential functions, the intestinal microbiome provides an extended repertoire of molecules that influences the host health notably *via* the development and the maturation of its immune system, beginning at birth, and potentially during pregnancy¹⁻⁴. The molecular bases of the host-microbiota interactions are only just beginning to be unravelled and are mediated by a wide variety of metabolites produced by commensal bacteria⁵⁻⁹. Many bacteria-derived metabolites originate from dietary sources. Among them, an important role has been attributed to the metabolites derived from the bacterial fermentation of dietary fibres, namely the short chain fatty acids (SCFAs) linking host nutrition to immune development and functions^{10,11}. Human cells respond to SCFAs through a signalling activation cascade involving specific G-protein coupled receptors (GPR41, GPR43 and GPR109a) and through an epigenetic regulation of gene expression by the inhibition of lysine or histone deacetylases (HDACs)¹²⁻¹⁶.

Numerous studies suggest that the close intimacy between the mucosal microbial populations and the host intestinal cells is central for the fine regulation of the host physiology. Indeed, intestinal epithelial cells (IEC) provide a crucial physical barrier against harmful pathogens and are also key players in the initiation and maintenance of mucosal immune responses¹⁷. Accordingly, indigenous members of the microbiota have dramatic and specific impacts on the host immune system through their intimate interactions with the host epithelium^{12,18-21}.

Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO-1) is an enzyme that catalyses the cleavage of the indole-ring of the essential amino acid tryptophan leading to N-formyl-kynurenine and its derivatives production. IDO-mediated tryptophan starvation has been first described to restrict the growth of tryptophan-auxotroph pathogens²². In the last decades, a growing number of studies showed the importance of IDO-1 in controlling lymphocyte responses notably in the gastrointestinal tract²³. Interestingly, IDO is not only a tryptophan starvation-dependent suppressor of lymphocyte proliferation but is also involved in regulating T-cell subset differentiation, including anti-inflammatory regulatory T cells (Treg) and pro-inflammatory T helper 17 cells (Th17)²⁴. The gut is a major site of IDO-1 activity at steady state along with the skin. The intestinal IDO-1 expression is elevated both in patients suffering from gut inflammation including inflammatory bowel diseases (IBD) and in colitis mice models²⁵⁻³⁰. IDO-1 expression in human healthy IECs is controversial but has been reported in several studies to be increased in IBD^{28,29,31,32}. In the murine gut, its expression is dependent on the microbiota as IDO levels are markedly reduced in adult germ-free animals³³. Interestingly, IECs from mice colonized with 46 strains of *Clostridia* clusters IV and XIVa express high levels of *IDO-1* that positively correlate with a high number of Treg in the colon²¹. These observations prompted us to investigate the impact of individual cultivable commensal bacteria on *IDO-1* transcriptional expression. In the current study, we screened over 401 bacterial supernatants on *IDO-1* reporter system and found that butyrate was the main inhibitor of *IDO-1* expression. The *IDO-1* down-regulation was independent of GPR41, GPR43 and GPR109a, three known G-protein coupled receptors for SCFAs and of SP1, AP-1 and PPAR γ , three transcription factors targeted by butyrate and present on *IDO-1* promoter. Our results showed that butyrate regulated *IDO-1* expression *via* a dual mechanism. In a first mechanism, butyrate decreased STAT1 expression leading to the inhibition of the IFN γ -dependent phosphorylation of STAT1 and consequently the STAT1-driven transcriptional activity of *IDO-1*. In

addition, we described a new second mechanism in which butyrate impaired *IDO-1* transcription in a STAT1 independent manner that could be attributed to the HDAC inhibitor property of SCFAs.

Results

IDO-1 is expressed in epithelial cells of the human normal colonic mucosa

IDO-1 expression is highly documented in antigen presenting cells, i.e. dendritic cells (DC) and macrophages³⁴. However its expression in intestinal epithelial cells (IECs) has been scarcely studied in human. We assessed IDO-1 expression both by immunohistochemistry on paraffin sections of normal human colonic mucosa (n = 10) and at the mRNA level IDO-1 was expressed by epithelial cells with either a diffuse or heterogeneous staining in the colonic crypts (Figure 1A) in 8 cases or a faint expression in 2 cases. IDO-1 was also expressed in the *lamina propria*, in some subepithelial mononuclear cells and in some endothelial cells (Figure 1A). We confirmed this result at the mRNA level by real-time PCR. As shown in Figure 1B, epithelial cells isolated from the colonic mucosa after EDTA treatment were an important source of *IDO-1* mRNAs in the human colonic mucosa (n=4).

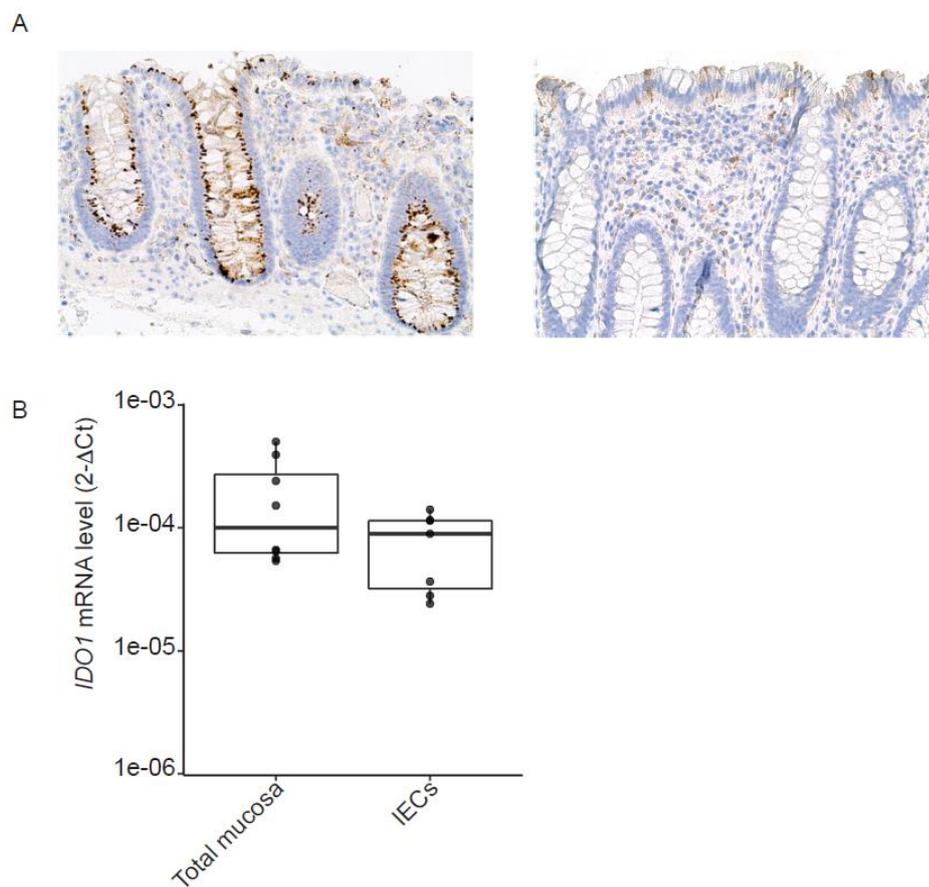


Figure 1: IDO-1 expression in human colonic epithelial cells. (A) Human colonic mucosa were stained for IDO-1. Representative immunohistochemical staining of IDO-1 showed that IDO-1 (brown) is expressed in epithelial cells (strong diffuse staining, left or heterogeneous staining, right) and also in a few *lamina propria* mononuclear cells (x200). (B). *IDO-1* gene expression was determined by real-time RT-PCR on total RNA extracted from preparations of isolated human colonic epithelial cells (IECs) and of whole mucosa microdissected from normal colon. Results of 4 independent human patients (2 samples/patient) were normalised to β -2 microglobulin (*B2M*) and expressed as $2^{-\Delta\text{Ct}}$ relative value.

Metabolites derived from commensal bacteria modulate *IDO-1* expression

In the gut, *IDO-1* expression is dependent on the microbiota since colonisation of mice with commensal intestinal bacteria induced high levels of *IDO-1* in IECs^{21,33}. In an attempt to decipher which commensal bacteria influence *IDO-1* expression, we performed a screening with an *IDO-1* reporter system expressed in the human epithelial cell line HT-29. As recently reported in animal studies and in functional metagenomic studies, bioactive compounds produced by commensal bacteria are likely to be small secreted molecules, we thus tested the bacterial supernatants of 135 members of the human microbiota that include 60% of species close to the human core microbiome on an *IDO-1* reporter system (Supplementary Table 1, to be found in the Annexes part at the end of the manuscript)^{7,8,35-37}. Bacteria were cultured in different media, in anaerobic or aerobic conditions. In this set-up, only few bacterial supernatants were activating *IDO-1* expression in HT-29 cells, including some *Lactobacillaceae* (Supplementary Figure 1). Interestingly, a global and dramatic down-regulation of *IDO-1* was observed in HT-29 challenged with supernatants of Firmicutes and Fusobacteria, while Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria and Verrucomicrobia barely modulate *IDO-1* expression (Figure 2A, Supplementary figure 1 below).

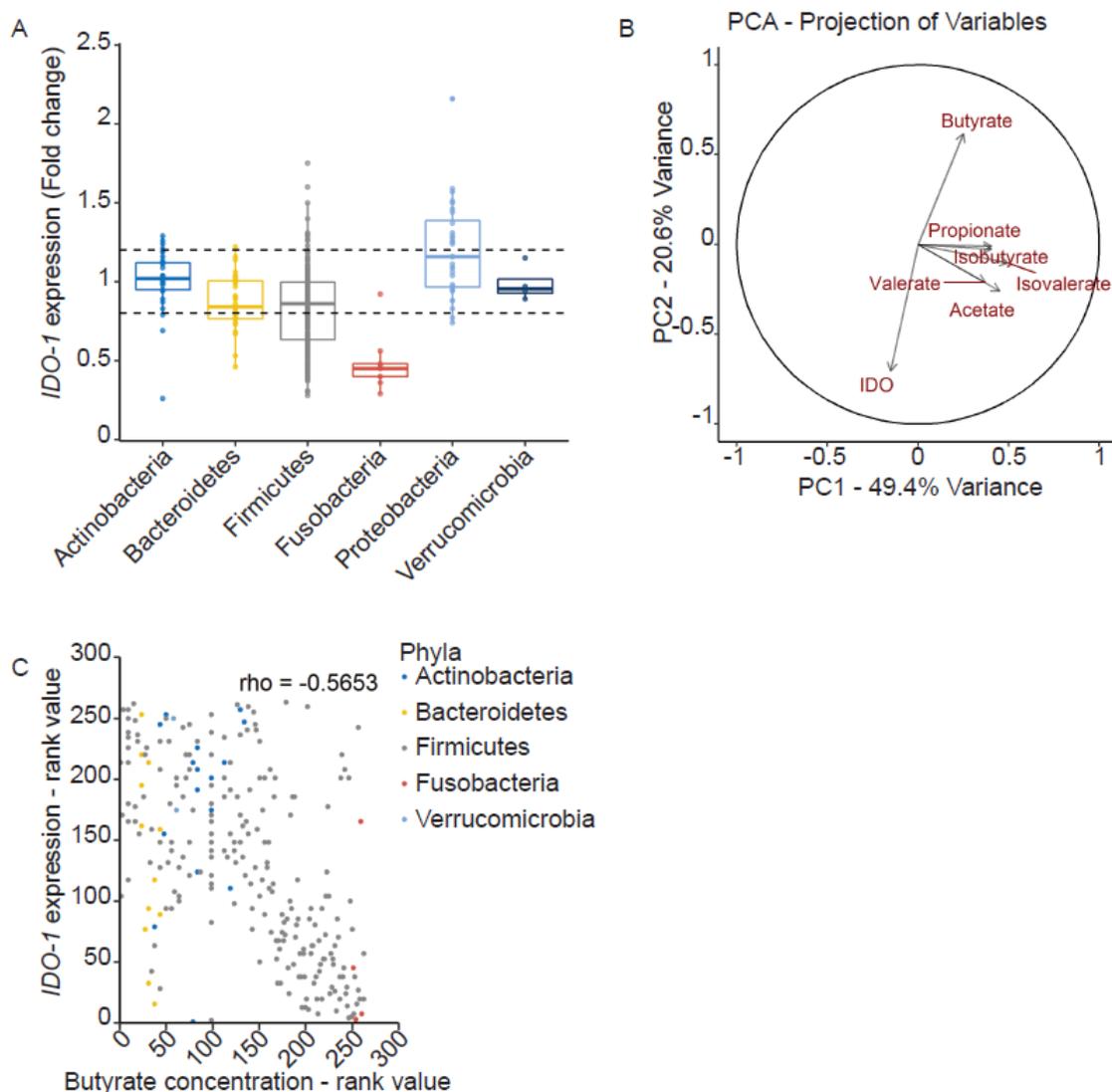


Figure 2: Correlation between bacterial metabolites production and *IDO-1* gene expression. (A) Effect of bacterial supernatants on *IDO-1* reporter system organised by phylum. Culture supernatants of a wide range of cultivable commensal bacteria were applied on the HT-29-*IDO-1* reporter system (10% vol/vol) for 24h. *IDO-1* expression was

measured by luciferase activity and expressed as fold increase towards its control: non inoculated growth medium used for each culture. *IDO-1* expression profiles upper and lower the dash lines were considered as significantly changed. (B) PCA analysis showing the correlation between the SCFAs concentrations produced by the commensal bacteria and *IDO-1* expression. (C). Representation of *IDO-1* expression correlated to butyrate concentration in

(10% vol/vol). *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as fold increase towards its control: bacterial growth medium used in each experiment. *IDO-1* expression profiles upper and lower the dash lines were considered as significantly changed. Actinobacteria in blue, Bacteroidetes in yellow, Firmicutes in grey, Fusobacteria in red and Verrucomicrobia in light blue.

Butyrate down-regulated *IDO-1* expression in epithelial cells

Among the *Firmicutes*, the most active genera on *IDO-1* expression were *Clostridium*, *Lachnoclostridium*, *Ruminoclostridium* and *Roseburia* (Supplementary Figure 1). All these genera in addition to the *Fusobacterium* genus share a common active role in the diet-derived fibre degradation leading to the production of short-chain fatty acids (SCFAs) by anaerobic fermentation³⁸. We thus hypothesized that the down-regulated pattern of *IDO-1* expression could be explained by the SCFAs concentration in the bacterial supernatants tested. We therefore quantified the concentrations of acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, valerate and isovalerate by GC-MS or HPLC in some bacterial supernatants (Supplementary Table 1). Principal component (PCA) and correlation analyses on SCFAs concentrations and *IDO-1* activity showed a negative correlation between butyrate concentration and *IDO-1* expression (Figure 2B and Supplementary Figure 2A). Impact of butyrate *IDO-1* was confirmed by a pairwise spearman correlation (Figure 2C).

We validated experimentally the observed correlations by testing the effect of a range of physiological intestinal concentration of SCFAs on *IDO-1* reporter system. Butyrate and to a lesser extend propionate, isobutyrate, isovalerate and valerate strongly down-regulated *IDO-1* expression (Figure 3A and Supplementary Figure 2B). Indeed, as shown in Figure 3A, a significant *IDO-1* down-regulation was observed at a concentration as low as 0.5 mM for butyrate and propionate. These concentrations were consistent with the final SCFAs concentrations on bacterial supernatants used in the screen thus reinforcing our hypothesis (Supplementary Table 1). Butyrate and propionate are found in the human gut lumen around 20mM³⁹. Acetate which is the more abundant SCFAs produce by gut bacteria had no impact on *IDO-1* expression. Moreover, we showed that butyrate and propionate also inhibited Interferon γ (IFN γ)-induced *IDO-1* expression in a dose-dependent manner in our reporter system (Figure 3B and Supplementary Figure 2C). This result was confirmed at the mRNA level by RT-PCR in IFN γ -treated HT-29 cells (Figure 3C). In addition, the inhibitory impact of butyrate and propionate on *IDO-1* expression was observed in the *IDO-1* reporter system expressed in Caco-2, another intestinal epithelial cell. (Figure 3D and Supplementary Figure 2D). More importantly, we showed that this phenotype is not restricted to cell-lines as *IDO-1* mRNA level was down-regulated by butyrate in human primary colonic culture when compared to non-treated cells (Figure 3E).

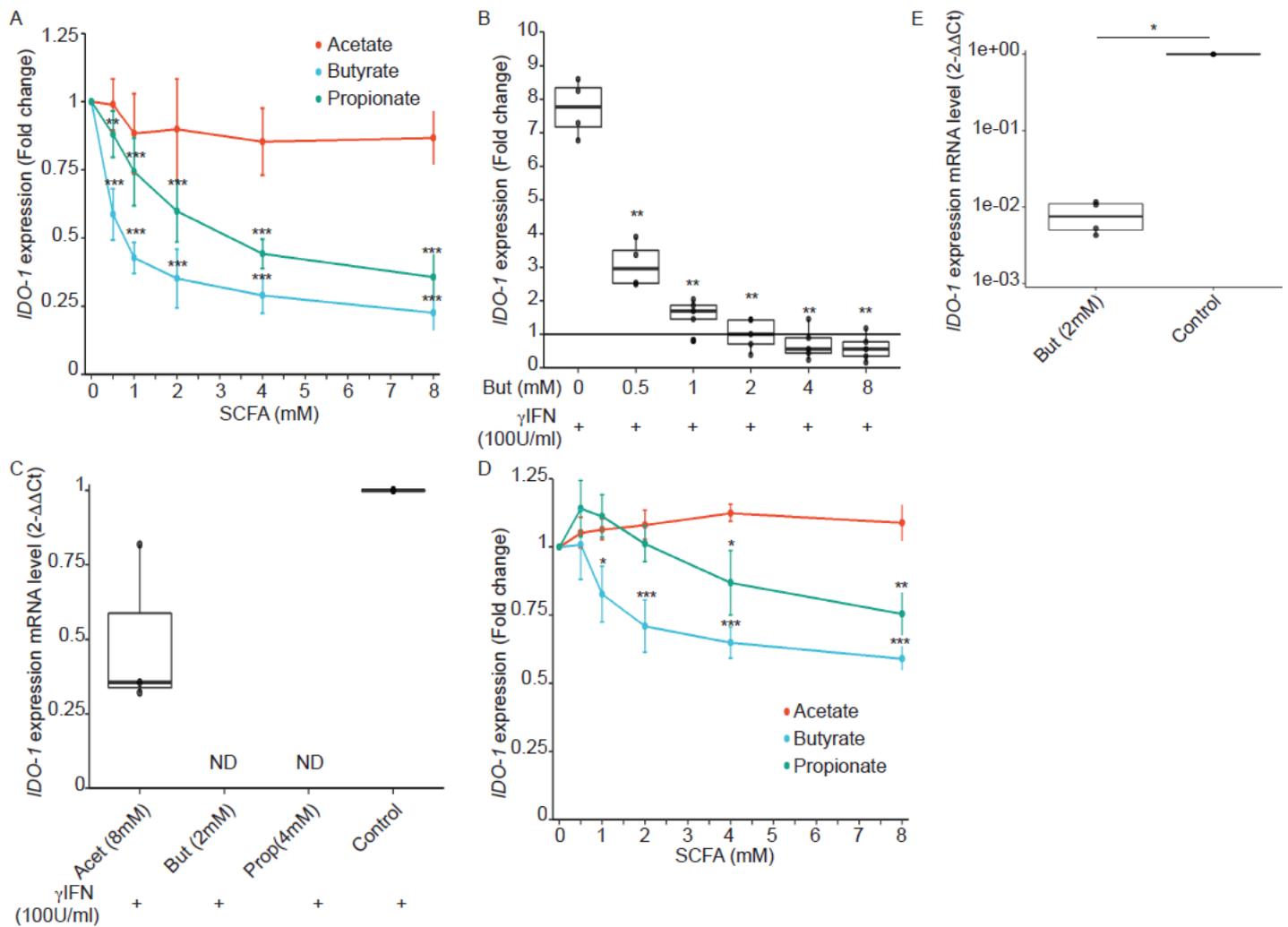


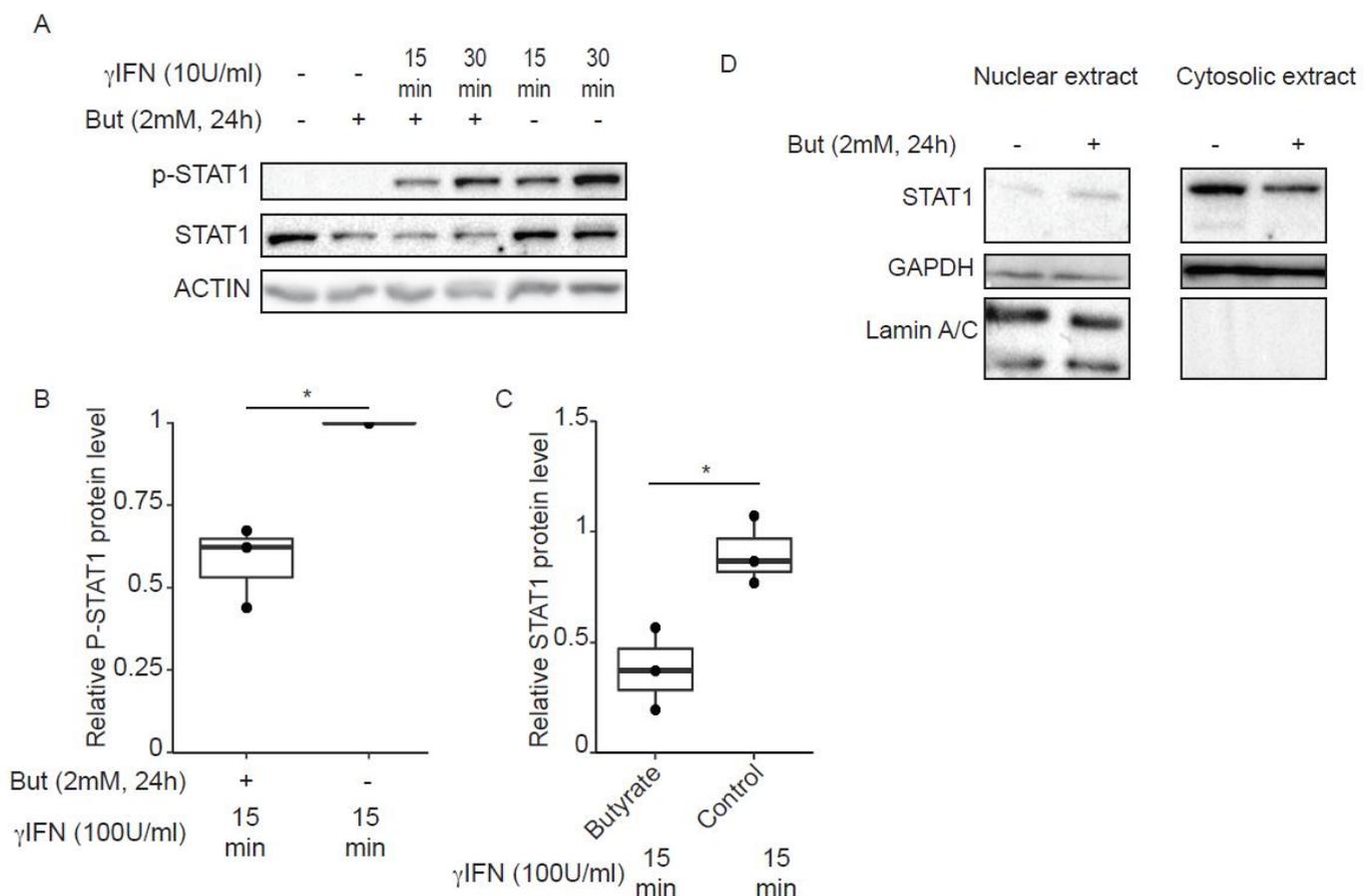
Figure 3: Impact of SCFAs on *IDO-1* expression. (A), HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated with a range of concentration of acetate, butyrate and propionate (0.5; 1; 2; 4; 8 mM) for 24h. *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as the mean \pm SD fold change towards un-stimulated cells (N>3). (B), HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated with IFN γ (100U/ml) and a range of concentration of butyrate (0.5-8mM). *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as the median \pm quartiles of fold change towards un-stimulated cells (N>3). (C) *IDO-1* gene expression on HT-29 exposed for 6h to IFN γ (100U/ml) +/- butyrate (2mM), propionate (4mM) or acetate (8mM) was determined by RT-qPCR. Results were normalised to *GAPDH* and expressed as 2- $\Delta\Delta$ Ct relative to control mean value; ND: not detected (N=3). (D) Caco2-*IDO-1* reporter cells were incubated with a range of concentration of acetate, propionate and butyrate (0.5; 1; 2; 4; 8 mM). *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as the mean \pm SD fold change towards un-stimulated cells (N>3). (E) *IDO-1* expression level on human colonic epithelial cells treated for 24h with butyrate compared to non-treated cells from the same patient was determined by RT-qPCR. Results are normalised to *RPS17* and expressed as 2- $\Delta\Delta$ Ct relative to control mean value (N=4). P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.

Butyrate inhibits IFN γ -induced *IDO-1* expression by STAT1 down-regulation

Several mechanisms of *IDO-1* induction have been reported. A classical cascade involves IFN γ -dependent phosphorylation and dimerization of Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) promoting *IDO-1* expression^{40,41}. Previous studies have demonstrated the inhibition of IFN γ -dependent phosphorylation of STAT1 by

butyrate, in a nasopharyngeal carcinoma model^{42,43}. We thus assayed by immunoblot analysis the impact of a 24h-treatment of butyrate on the IFN γ -induced phosphorylation of STAT1 in HT-29 cells. In line with other studies, we observed less Tyr 701 phosphorylated form of STAT1 in cells pre-treated with butyrate (Figure 4A and 4B). Interestingly, in contrast to previous studies, we observed that this phenotype was directly correlated to a down-regulation of the protein level of STAT1 itself mediated by butyrate as both total STAT1 and phosphorylated STAT1 levels were similarly diminished (Figure 4A-C). The butyrate-driven STAT1 down-regulation was observed on both IFN γ stimulated and non-stimulated cells (Figure 4A, 4C and Supplementary Figure 3A). Interestingly, we did not monitor any inhibition of *STAT1* gene expression by RT-qPCR at 6 and 24h post incubation with butyrate (Supplementary Figure 3B) suggesting post-transcriptional modifications of STAT1. To further determine whether STAT1 was translocated and trapped in the nucleus by butyrate treatment, nuclear STAT1 protein level was assessed by immunoblotting in butyrate and untreated HT-29 cells. As shown in figure 4D, we did not detect an accumulation of nuclear STAT1 in butyrate-treated cells. These findings showing that STAT1 was depleted by butyrate could therefore provide one mechanism explaining the inhibition of IFN γ -induced *IDO-1* in human intestinal epithelial cells.

Figure 4: Inhibition of IFN γ -induced *IDO-1* expression by butyrate is correlated with a decrease of STAT1 protein level. (A-C) HT-29 cells were cultured 24h with butyrate (But 2mM) prior IFN γ (100U/ml) stimulation for 15 or 30 min. The protein level of p-STAT1 Tyr701, STAT1 and Actin were determined by western-blot on total protein extracted. Densitometric quantifications of total P-STAT1 and STAT1 proteins, from 3 independent experiments, were normalised to Actin and expressed as fold change compared to IFN stimulated cells (B) and unstimulated cell (C) respectively of 3 independent experiments. Data are represented as median \pm quartiles. (D) HT-29 cells were



incubated 24h with medium or butyrate (But 2mM) prior cytoplasmic and nuclear extractions. The protein levels of STAT1, Laminin A/C and GAPDH were assessed in each fraction by western-blot. P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.

Butyrate inhibits *IDO-1* expression independently of STAT1 and STAT3.

To further decipher the mechanism of butyrate-driven *IDO-1* regulation observed in cells untreated with IFN γ , we studied STAT1 involvement in the *IDO-1* down-regulation observed in unstimulated IECs (Figure 3). The pivotal role of STAT1 was assayed using siRNA down-regulation. We observed no impact on butyrate-dependent inhibition of *IDO-1* in absence of STAT1 signalling. These results suggested that butyrate did not impact on basal P-STAT1 and that STAT1-independent mechanism was also involved in *IDO-1* down-regulation (Figure 5A, Supplementary Figure 4A).

Two alternative pathways of *IDO-1* induction have been reported, involving STAT3 and aryl hydroxycarbon (AHR) or an NF κ B-dependent pathway⁴⁴⁻⁴⁶. We showed that blocking STAT3 phosphorylation (Cucurbitacin I) or activating AhR pathway (TCDD) did not induce *IDO-1* or prevent butyrate inhibition in our model supporting that the STAT3/AHR pathway was not involved in this process (Figure 5B-C). In addition, we ruled out NF κ B activation as NF κ B inhibitor BAY 11-7082 did not impact on butyrate-driven *IDO-1* down-regulation (Figure 5D). Moreover immunoblotting assays on STAT3 level revealed, that in contrast to STAT1, STAT3 was not decreased following butyrate incubation for 24h in HT-29 (Supplementary 4B).

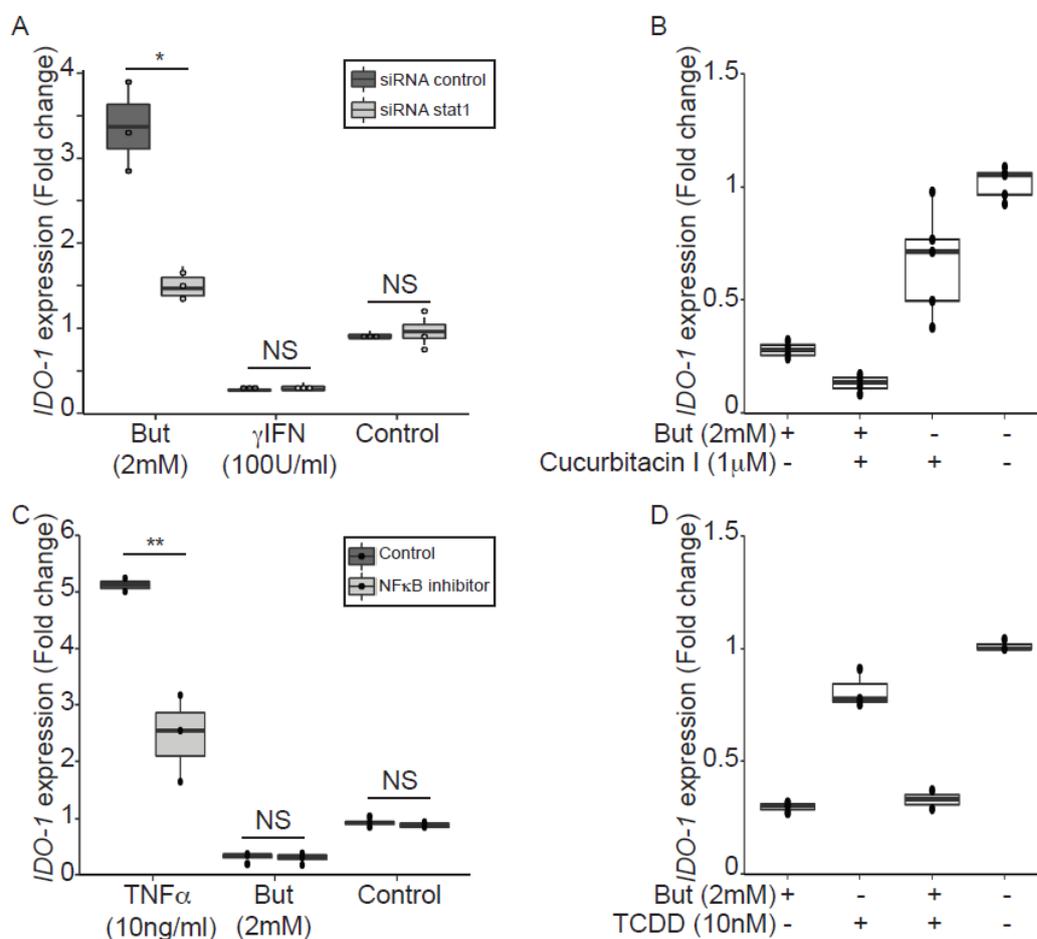


Figure 5: Butyrate inhibition of *IDO-1* promoter activity is STAT1 and STAT3 independent. (A) HT-29-*IDO-1* cells were transfected with STAT1 siRNA or control siRNA and incubated with butyrate (But 2mM) or IFN γ (100U/ml)

for 24h before measuring IDO-1 level. (B) HT-29-*IDO-1* cells were incubated for 2h with the STAT3 phosphorylation inhibitor (Cucurbitacin I, 1 μ M) prior to butyrate (But 2mM) treatment for total incubation time of 24h (N=4). (C) HT-29-*IDO-1* cells were incubated with AhR ligand (TCDD 10nM) +/- butyrate (But 2mM) for 24h. (D) HT-29-*IDO-1* cells were incubated for 1h with the N κ FB inhibitor, Bay117082 (Bay 40 μ M) prior stimulation with butyrate (But 2mM) or TNF α (10ng/ml) for 24h (N=3). *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as median \pm quartiles of fold change towards un-stimulated cells. Data represented at least 3 independent experiments. P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.

Butyrate-mediated impact on *IDO-1* is independent of the SCFAs receptors GPR41, GPR43 and GPR109a.

Our data suggest that butyrate down-regulated *IDO-1* expression in a STAT1 and STAT3-independent manner and, thus, might involve an additional mechanism. SCFAs impact human cells through two main mechanisms: inhibition of histone and lysine deacetylases (HDAC/KDAC) and activation of specific G-protein coupled receptors (GPR41, GPR109a: both G α /i coupled receptors and GPR43: G α /i and G α q coupled receptor)^{12-15,47}. The three G-protein coupled receptors were expressed in HT-29 and Caco-2 cells (supplementary Figure 5A-B). To test the potential role of these receptors, we first used selective agonists of GPR41 (1-MCPC and AR420626), GPR43 (Tiglic acid and 4-CMTB) and GPR109a (Niacin and MK1903). If the butyrate-driven down-regulation of *IDO-1* expression were mediated by the GPR-dependent signalling pathways, we would have expected that agonists of these receptors would mimic this phenotype. Interestingly, none of these agonists, alone or in combination, did impact *IDO-1* expression in the HT-29 reporter system (Figure 6A and supplementary Figure 5C). To further confirm this observation, we used inhibitors of the G α i and the G α q pathways: the pertussis toxin (Ptx) and phospholipase C β inhibitor (U73122) respectively. As shown in Figure 6B, none of these inhibitors impacted on the butyrate-dependent *IDO-1* down-regulation. Moreover, over-expression of GPR43 and GPR109a in HT-29 did not impact the butyrate-dependent inhibition of *IDO-1* expression (supplementary Figure 6). Altogether these results suggest that the SCFAs receptors GPR41, GPR43 and GPR109a were not involved in the observed butyrate-driven inhibition of *IDO-1* expression.

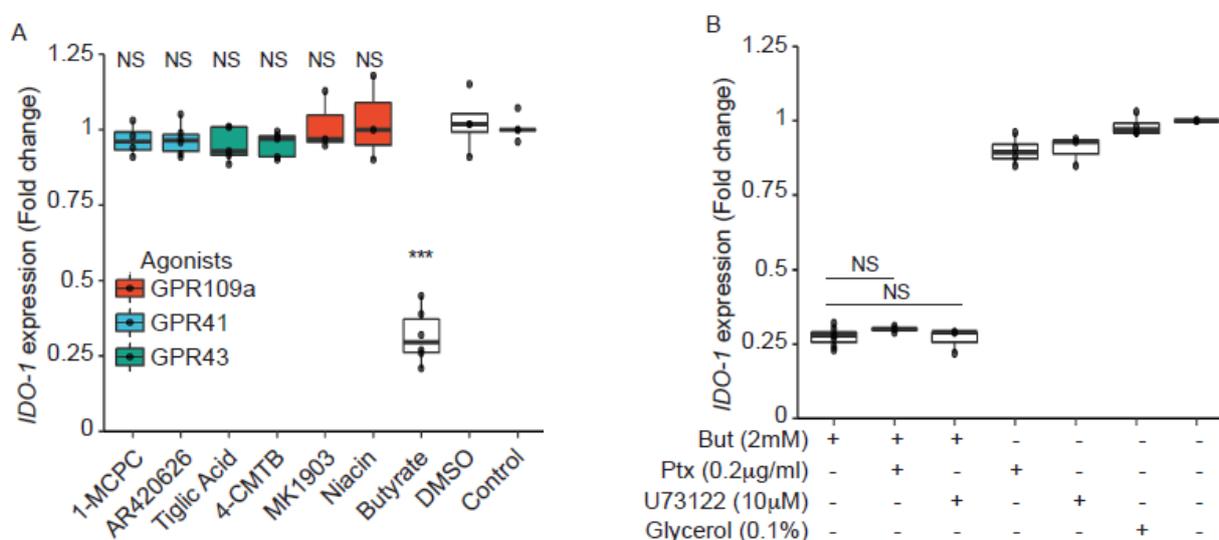


Figure 6: Butyrate mediated impact on *IDO-1* is independent of its receptors GPR41, GPR43 and GPR109a. (A) HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated for 24h with selective GPR agonists: GPR41: AR420626 (1 μ M) and 1-MCPC (1mM); GPR43: 4-CMTB (1 μ M) and Tiglic acid (1mM); GPR109a: Niacin (1mM) and MK1903 (1 μ M) or with

DMSO (vehicle), butyrate (But 2mM) or Control (RPMI). (B) HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated for 24h with 2mM butyrate +/- GPRs sub-unit inhibitors: Pertussis toxin (Ptx, 0.2µg/ml), U73122 (10µM) or with glycerol (vehicle). *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as median ± quartiles of fold change towards un-stimulated cells. Data represented at least 3 independent experiments. P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.

Butyrate down-regulates *IDO-1* expression via its HDAC inhibitor property in a AP-1, PPAR γ and SP1-independent manner

SCFAs, and butyrate in particular, are potent modulators of protein acetylation targeting histones and transcription factors that are well-documented regulatory mechanisms of gene transcription. Indeed, SCFAs impact human cells through their ability to inhibit lysine and histone deacetylases (HDAC) and are thus considered as members of the HDAC inhibitors (HDACi) family^{12-14,48}. As part of the aliphatic family of HDACi, butyrate targets HDAC class I (HDAC 1, 2, 3, 8) and IIa (HDAC 4, 5, 7, 9)⁴⁹. To assess if butyrate impacted *IDO-1* expression through its iHDAC property, we tested three HDACi targeting a wide range of HDAC. Two belonging to the hydroxamic acids family, structurally and metabolically unrelated to SCFAs: trichostatin A (TSA), vorinostat (SAHA) and one belonging to the fatty acid family: sodium valproate (VAP)⁴⁹. The effect of butyrate on *IDO-1* expression could be mimicked by the three HDACi tested suggesting that the *IDO-1* down-regulation observed with butyrate might be a consequence of its HDAC inhibitory properties (Figure 7A).

Regulation of genes transcription by butyrate involved a wide range of transcription factors. To delineate which transcription factors were targeted by butyrate that might directly impact *IDO-1* expression, we analysed the human *IDO-1* promoter sequence. Analysis revealed several transcription factors implicated in butyrate-regulated gene expression: several Specificity Protein-1 (SP1) binding GC-rich boxes and several AP-1 and PPAR γ responsive elements (Table 1)⁵⁰⁻⁵⁵. To delineate if butyrate affects *IDO-1* expression via SP1, we treated stimulated cells with mithramycin A that binds to GC-rich DNA sequences, thereby inhibiting SP1-dependent gene modulation^{56,57}. As shown in Figure 7A, incubation of butyrate or HDACi-stimulated cells with mithramycin did not impact on the *IDO-1* down-regulation, suggesting that SP1 was not involved in this process. As butyrate is a major activator of PPAR γ -dependent gene activation, we investigated its role in *IDO-1* down-regulation^{54,58}. We used two specific PPAR γ activators, pioglitazone and rosiglitazone, and did not detect any impact on *IDO-1* expression suggesting that the PPAR γ responsive elements in *IDO-1* promoter might not be functional (Figure 7B). We further tested whether PPAR γ was involved in the butyrate-dependent inhibition of *IDO-1* by using a specific PPAR γ inhibitor (GW9662). The specific PPAR γ inhibitor GW9662 did not impact on the butyrate-induced *IDO-1* down-regulation in HT-29 reporter system, confirming that the transcription factor PPAR γ was not involved in this process (Figure 7B). Finally, the implication of AP-1 motifs, present in *IDO-1* promoter was tested using an AP-1 chemical inhibitor (SR11302). Pre-treatment with AP-1 inhibitor did not significantly prevent the inhibition of *IDO-1* mediated by butyrate, suggesting that AP-1 was not involved as well (Figure 7C). Altogether, our findings suggest that butyrate down-

regulated *IDO-1*-expression by a second mechanism involving its iHDAC property, independently of the butyrate-targeted transcription factors: AP-1, PPAR γ and SP1.

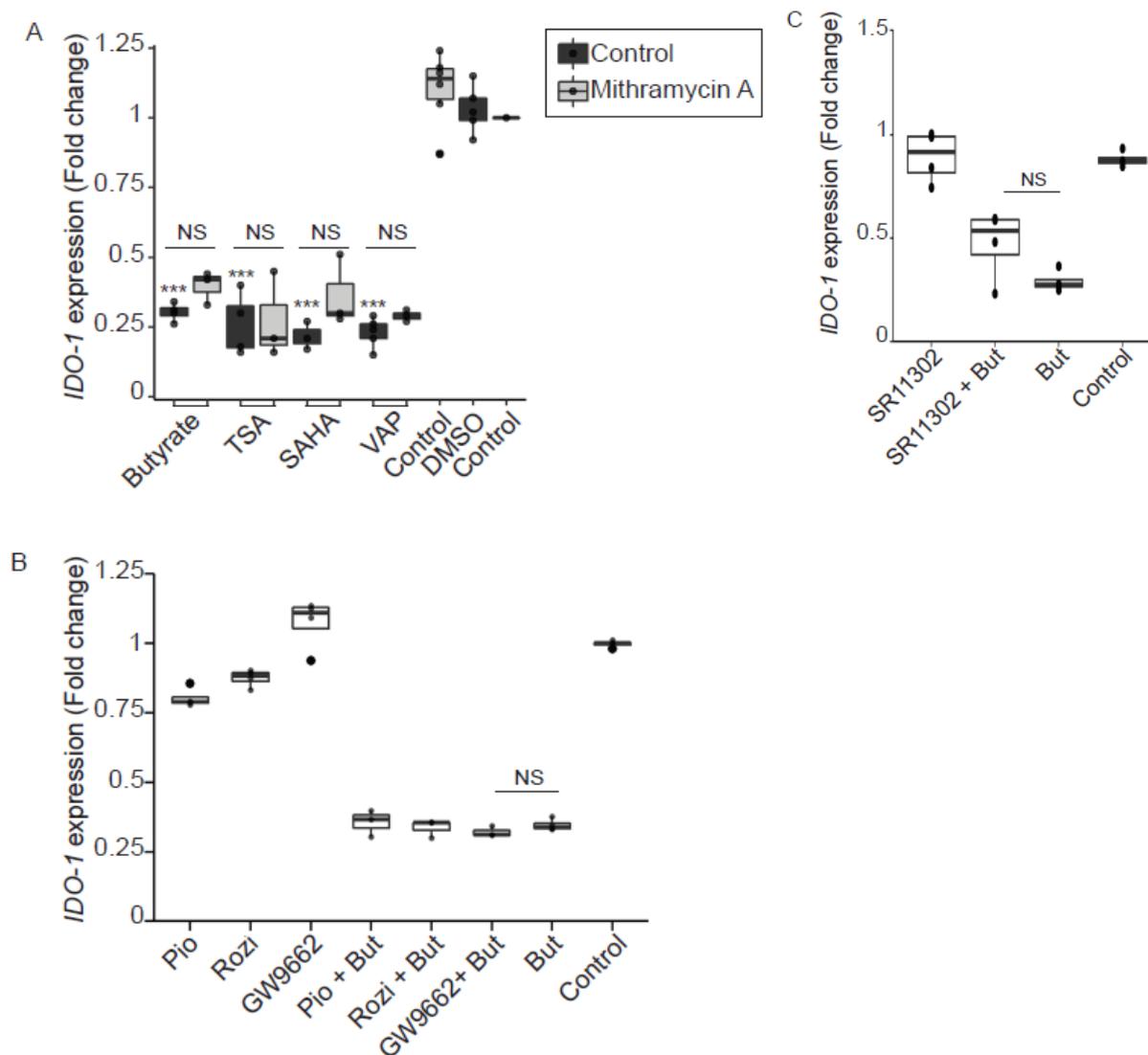


Figure 7: HDAC inhibitor mimicked the butyrate-dependent down-regulation of *IDO-1* expression in a SP1, PPAR γ and AP-1 independent manner. (A). HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated for 24h with butyrate (But 2mM), SAHA (5 μ M), Trichostatin A (TSA 1 μ M) or Valproic acid (VAP 5mM) \pm SP1 inhibitor (Mithramycin A; MitA 0.1 μ M). (B), HT-29-*IDO-1* reporter cells were stimulated for 24h with two PPAR γ activators: Pioglitazone (Pio 5 μ M); Rosiglitazone (Rosi, 10 μ M) or the specific PPAR γ inhibitor GW9662 (10 μ M) \pm butyrate (But 2mM). (C) HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated for 24h with butyrate (But 2mM) and/or the AP-1 inhibitor, SR11302 (10 μ M). *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as median \pm quartiles of fold change towards un-stimulated cells. Data represented at least 3 independent experiments. P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.

Discussion

The immune system is traditionally viewed as a highly elaborated defence system developed to fight intruders, especially rapidly evolving pathogens such as bacteria. However, accumulating studies highlight a widespread cooperation established between hosts and bacteria during millions of years that have shaped their own development⁵⁹. Intestinal commensal bacteria are crucial for the development and maintenance of a healthy immune system locally and have a homeostatic role beyond the gut, therefore contributing to the global wellbeing of their host. The particular abundance and combination of commensal bacteria may have dramatic and specific impacts on the host immune system through their intimate interaction with the host epithelium. Accordingly, the intestinal epithelial cells (IEC) play a central role in the dialogue established between the host and the microbiota by providing an active physical segregation of commensal bacteria and by initiating the first microbial-dependent signals. Indeed, IECs express receptors recognising microbial motifs that activate downstream signalling cascades thus promoting the production of bactericidal peptides and the recruitment and activation of innate and adaptive immune cells notably by the production of effector proteins and enzymes^{17,21,60}. Amongst the effector molecules modulating the immune responses produced by IECs, indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO-1) has an important role in the gut homeostasis^{23,32}. However, whether human IECs express *IDO-1* and how bacteria control *IDO-1* expression in IECs is still unclear. Here, we show that human normal colonic IECs express *IDO-1* at the mRNA and protein level and that epithelial *IDO-1* is modulated by short chain fatty acids (SCFAs), more specifically by butyrate. Indeed, we demonstrate herein that physiological concentrations of butyrate down-regulate *IDO-1* expression in HT-29 and Caco-2 reporter systems, but also at the mRNAs level in both the HT-29 cell line and in preparations of human primary colonic epithelial cells³⁹.

In a context of IFN γ stimulation, STAT1 is an essential mediator of *IDO-1* expression^{40,41,44,45}. Our results indicate that butyrate treated-IECs showed reduced STAT1 phosphorylation on the tyrosine 701, as described in other models^{42,43}. However, our results indicate that the reduced amount of phosphorylated STAT1 observed with butyrate is a consequence of a butyrate-driven STAT1 protein level reduction. STAT1 diminution was not a result of an increase of nuclear translocation. Interestingly, Patnala *et al.* showed that butyrate down-regulates basal *STAT1* expression in microglial cells⁶¹. However, in our experimental set-up, we did not observe any transcriptional inhibition of *STAT1* expression, suggesting a post-transcriptional modification of STAT1. Many post-translational modifications of STAT1 such as SUMOylation and ubiquitination have been identified leading to STAT1 degradation and consequently modifying STAT1 protein levels in cells⁶²⁻⁶⁴. Interestingly, butyrate has been described as a global enhancer of protein ubiquitination⁴³. We thus believe that a combination of post-translational modifications of STAT1 might occur explaining its down-regulation by butyrate. The precise mechanism and cellular actor implicated in STAT1 down-regulation need to be investigated further.

In addition to the butyrate-dependent down-regulation of STAT1 that impaired IFN γ -induced *IDO-1* expression, we demonstrated that STAT1 is dispensable for the basal *IDO-1* repression induced by butyrate suggesting that this SCFA repressed *IDO-1* expression by a second distinct mechanism. To decipher this STAT1-independent mechanism, we investigated the implication of butyrate specific G-protein coupled receptors (GPR41, GPR109a and GPR43). However, by using agonists of these receptors and G protein subunits inhibitors, we showed that this mechanism was not implicated in the inhibition of *IDO-1* mediated by butyrate. SCFAs impact the host biological responses by the direct regulation of gene transcription *via* their properties of lysine deacetylase inhibitors

that consequently favours acetylation of histones and transcription factors¹²⁻¹⁵. We showed that three HDAC inhibitors targeting a wide range of HDAC mimicked the effect of butyrate on *IDO-1* expression in un-stimulated cells suggesting that the *IDO-1* down-regulation observed was likely linked to the HDAC inhibitory properties of SCFAs. As regulation of genes transcription by iHDAC involved many transcription factors, we revealed, by analysing the sequence of the *IDO-1* promoter, the presence of responsive elements of three transcription factors potentially targeted by butyrate: SP1, AP-1 and PPAR γ ^{50-55,58}. In addition, by using specific inhibitors and agonists, we demonstrated that these three transcription factors were not involved in the STAT1-independent butyrate-driven inhibition of *IDO-1* expression.

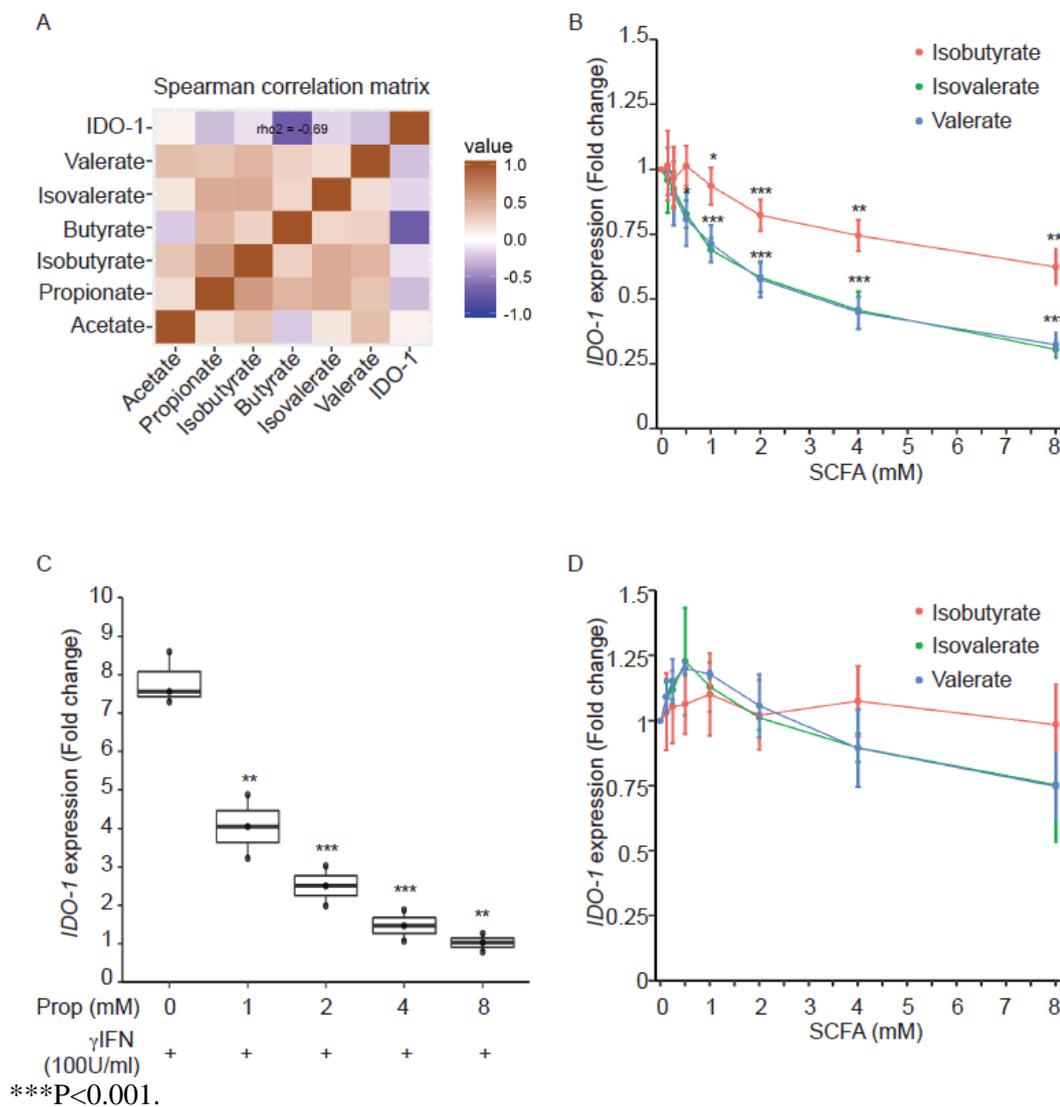
What would be the impact of *IDO-1* inhibition on human health is still an open question, as, depending on the disease context, its expression can have positive or negative outcomes. IDO-1 is highly expressed in human tumour cells and consequently creates an immunosuppressive microenvironment that has been associated with poor prognosis notably in colorectal cancer^{23,32,65}. *IDO-1* expression is high in inflammatory bowel disease notably in IECs and has often been associated with the severity of gastrointestinal diseases^{23,28,31,32}. However, *IDO-1*^{-/-} mice do not present any spontaneous colitis and its role in induced colitis models varies between studies according to the inducing agent and mouse strain used and probably the microbiota composition^{30,66-68}. IDO-1 regulates immune responses *via* the so-called “metabolic immune regulation” that suppress the Th1 and Th17 differentiation and enhancement of the *de novo* differentiation of regulatory T cells^{69,70}. However, a recent study suggests that the role of IDO-1 in the regulation of the immune response is more complex as it repressed the production of IL10, a major anti-inflammatory cytokine⁷¹. In addition to its local immunosuppressive effects, IDO-1 has been described as a main regulator of the intestinal B cell responses to commensal bacteria that drives microbiota composition and indirectly the microbiota-dependent barrier responses^{25,72}. Moreover, IDO-1 has been associated with epithelial cell growth^{68,73}. In this context, it has been hypothesized that IDO-1 function in IECs could be to counterbalance the tissue-damaging responses and to protect the epithelium from invading microbes. Altogether, these studies suggest that the role of IDO-1 in influencing gut inflammation is far more complex than expected and might depend on the cell types expressing this molecule. *IDO-1* down-regulation by microbiota-derived butyrate in IECs, as demonstrated in this paper, could be crucial for the initiation of appropriate immune responses depending on the context: inflammation, cancer or infections.

Here, we describe an important role for the SCFA butyrate in the regulation of *IDO-1* expression in IECs. Contrary to DCs where IDO-1 functions in diverse processes in health and disease have been well documented, its role in IECs is debated and unknown yet. We demonstrate here for the first time that butyrate represses *IDO-1* expression by two distinct mechanisms. First, butyrate treatment was able to reduce STAT1-dependent induction of *IDO-1*, a finding in line with previous results^{42,43}. In addition, we show that this reduction is correlated with the butyrate-driven decrease in STAT1 level. Second, butyrate regulation of *IDO-1* expression is independent of the IFN γ -signalling pathway and involves the HDAC inhibitory property of butyrate. As SCFAs are crucial for human physiology and health, our results strongly suggest that controlling *IDO-1* expression in IECs under steady state conditions can be part of the global mechanism of SCFAs to maintain immune homeostasis in the gut.

Supplementary figure legends:

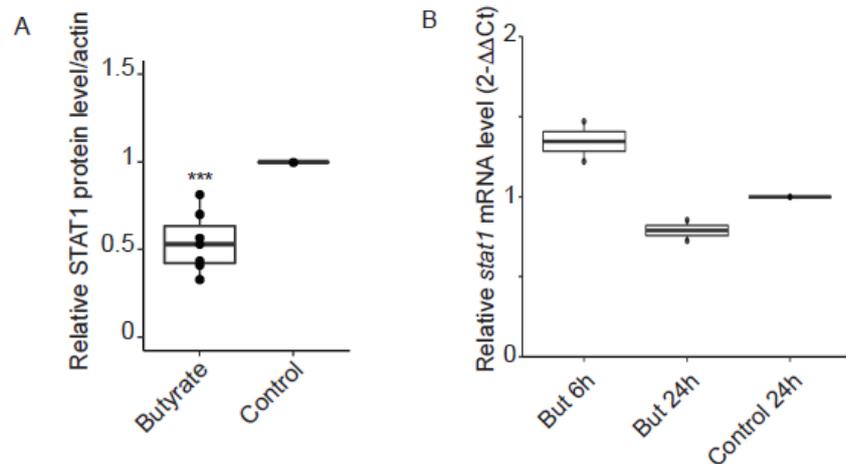
Supplementary figure 2:

Impact of SCFAs on *IDO-1* expression. (A) Spearman correlation matrix analyses showing the correlation between the SCFAs concentrations produced by the commensal bacteria and the *IDO-1* expression. (B) HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated with a range of concentration of isobutyrate, isovalerate and valerate (0.5; 1; 2; 4; 8 mM). (C) HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated with IFN γ (100U/ml) and a range of concentration of propionate (1-8mM). (D) Caco2-*IDO-1* reporter cells were stimulated with a range of concentration of isobutyrate, isovalerate and valerate (0.5; 1; 2; 4; 8 mM). *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as the mean \pm SD fold change towards un-stimulated cells (B and D) or as the median \pm quartiles of fold change towards un-stimulated cells (C). Data represented at least 3 independent experiments. P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.



Supplementary figure 3:

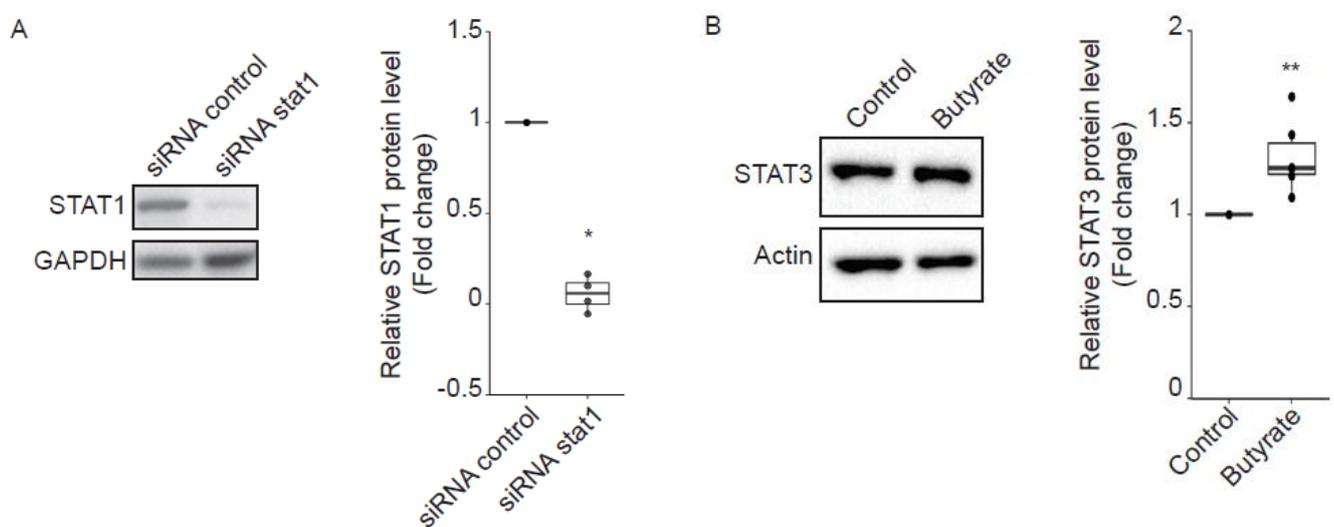
(A) Densitometric quantifications of the total STAT1 protein levels from HT29 ± butyrate (But 2mM) after 24h of incubation. Results were from at least 3 independent experiments, normalised to Actin and expressed as



fold change compared to un-stimulated cells (Control). (B) HT29 cells were incubated with butyrate for 6 or 24h and *STAT1* mRNA level was determined by RT-PCR, normalised by internal control (*GAPDH*) and express as 2-ΔCt toward non stimulated cells (N=3). P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.

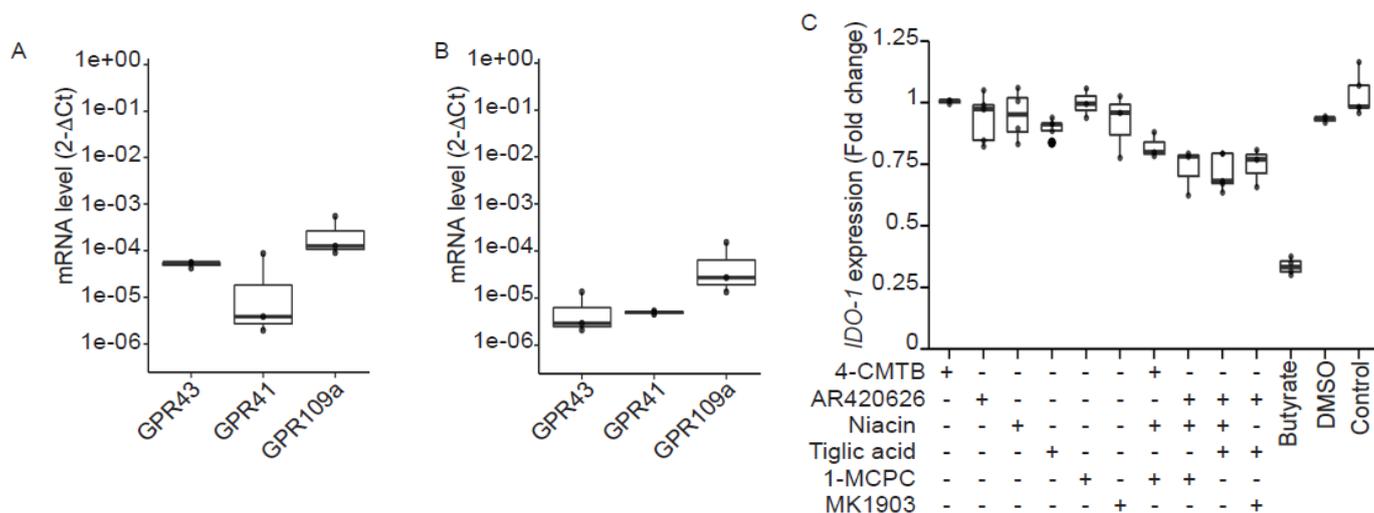
Supplementary Figure 4:

STAT1 siRNA efficiency. HT29 cells were transfected with *STAT1* siRNA or control siRNA and protein extracted on day 7 following seeding. STAT1 and GAPDH protein level were determined by western blot (left panel). Densitometric quantifications of STAT1 was normalised to GAPDH and expressed as the median ± quartiles compared to siRNA control-treated cells (N=4, right panel). (B) HT-29 cells were treated with butyrate (But 2mM) for 24h before proteins extraction. The level of STAT3 and Actin were determined by western-blot on total protein extracted (left panel). Densitometric quantification of STAT3 protein levels were normalised to Actin and expressed as fold change compared to un-stimulated cell. Data are represented as median ± quartiles (N=6) (right panel). P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.



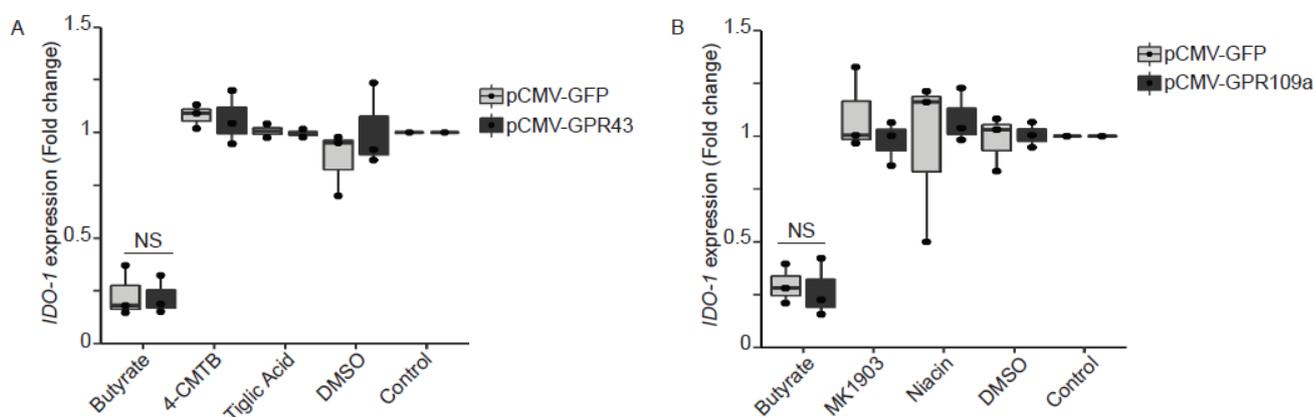
Supplementary figure 5:

Expression of the G-protein coupled receptors GPR41, GPR43 and GPR109a in HT-29 and Caco2. GPRs gene expression was determined by RT-PCR on mRNA extracted from HT-29 (A) and Caco2 (B) cells. Results are expressed as $2^{-\Delta Ct}$ relative to *GAPDH* (N=3). (C) HT-29-*IDO-1* reporter cells were incubated for 24h with GPR alone or in combination: GPR41: AR420626 (1 μ M) and 1-MCPC (1mM); GPR43: 4-CMTB (1 μ M) and Tiglic acid (1mM); GPR109a: Niacin (1mM) and MK1903 (1 μ M) or with DMSO (vehicle) or butyrate (But 2mM). Data are represented as mean \pm standard deviation of at least 3 independent experiments. *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as the median \pm quartiles of fold change towards un-stimulated cells (N=3). P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.



Supplementary figure 6:

GPR43 and GPR109a over-expression did not impact the butyrate-driven inhibition of *IDO-1* expression. HT-29-*IDO-1* reporter cells were transfected with pCMV-*GPR43* (A) and pCMV-*GPR109a* (B) prior to the incubation with 2mM butyrate or with the GPR agonists (GPR43 (A): 4-CMTB (1 μ M) and Tiglic acid (1mM) GPR109a (B): Niacine (1mM) and MK1903 (1 μ M)). *IDO-1* expression was measured by luciferase activity and expressed as the median \pm quartiles of fold change towards unstimulated cells (N=3). P value: *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001.



Materials and methods

IDO-1 expression in human normal colon at the protein and mRNA levels

Macroscopically and microscopically unaffected human normal colon was obtained from 10 patients undergoing surgery for colon cancer, at least at 10 cm downstream the tumour [7 men, 3 women; mean age 62 years ; left (7) or right colon (3)]. The tissue fragments were processed accordingly to the French guidelines for research on human tissues, including patients' consent. IDO-1 immunostaining was performed using a monoclonal antibody (clone 4D2, Serotec) and a standard streptavidin-biotin- peroxidase technique after antigen retrieval in citrate buffer pH6. Diaminobenzidine was used as a chromogen and nuclei were counterstained with hematoxylin. *IDO-1* mRNA levels were assessed on preparations of isolated colonic epithelial cells (IECs) after EDTA treatment and on whole mucosa microdissected from the normal colon as previously described (n=4)⁷⁴. Samples were prepared by beads-beating mechanical lysis using Fastprep (MP Biomedicals) and centrifuged at 8,000g for 10 min at 4°C. RNA extraction and qPCR were performed as described below (see "Real Time PCR").

Cell Culture of human intestinal cell lines and primary colonocytes

The human epithelial cell lines HT-29 and Caco-2 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). HT-29 cells were grown in RPMI 1640 and Caco-2 in DMEM supplemented with 10% and 20% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS) respectively, 2mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin, 50 U/mL streptomycin in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. All culture media and supplements were supplied by ThermoFischer. Mycoplasma contamination was regularly tested using MycoAlert (Lonza) and Plasmotest (Invivogen).

Human primary colonic cell culture were performed as described⁷⁵. Briefly, PBS-washed colonic tissues were digested with 0.5mg/ml of collagenase type XI. The crypts were plated onto Matrigel coated plates and cultured for 24h in DMEM 24mM glucose supplemented with 10% FCS, 2mM L-Glutamine, 50 U/mL penicillin, 50 U/mL streptomycin and Y-27632 (Tocris). The day after plating, media was rinsed with fresh media and replaced with culture media with or without butyrate 2mM. Human tissues were obtained from the Human Research Tissue Bank at the Addenbrooke's hospital, Cambridge under the license 09/H0308/24.

Luciferase Reporter and cell viability Assays

A 1.6-Kb section of the human *IDO-1* promoter was cloned using KpnI and NheI restrictions sites (Primers used were Fw: AAAGGTACCGGGTAGGATAGATTTAGTGAG; Rv: AAAAAGCTAGCCATTCTTGTAGTCTGCTCC) into the pGL4.14 (Promega) luciferase plasmid and used to establish the stable HT-29 *IDO-1* reporter cell-line after antibiotic selection (hygromycin, 600 µg/mL, InvivoGen) and validated with IFN γ (100U/mL, Peprotech) and IL1 β (10ng/mL, Peprotech). For each experiment, HT-29-*IDO-1* reporter cells were seeded at 3x10⁴ cells per well in 96-well plates 24h prior to incubation with bacterial supernatants or reagents. The cells were stimulated for 24h with 10 µL of bacterial supernatants in a total culture volume of 100 µL per well (i.e., 10% vol/vol) prior to the luciferase assay. The luciferase activity was quantified as relative luminescence units by a microplate reader (Infinite200, Tecan) and the Neolite Luminescence Reporter Assay System (Perkin-Elmer) according to the manufacturers' instructions. The *IDO-1* activity was normalized to the controls, i.e., the un-stimulated cells or cells in presence of non-inoculated bacteria culture medium. Experiments were performed in triplicates for at least three biological

independent assays. Cell viability was monitored by MTS measurement using the CellTiter 96 Aqueous One solution (Promega) according to the manufacturer's recommendations.

Culture of commensal bacteria, preparation of supernatants and SCFAs concentration assessment.

135 human intestinal commensal bacterial strains which include 111 different species from the in-house INRA-Micalis collection or from DSMZ were grown. Anaerobic culture conditions were done using the Hungate method⁷⁶. Screened species and strains, corresponding growth media, optical densities (OD), short chain fatty acids (SCFAs) concentrations are listed in Supplementary Table 1. Composition of home-made growth media is listed in Supplementary Table 1. Bacterial cultures were cultured to reach the maximum OD and centrifuged at 3,000 g for 10 to 20 min. Cultures were controlled using Gram staining method, aerobic growth test and fresh observation on microscope. Bacterial supernatants were then collected and filtered on a 0.22µm PES filters and conserved at -80°C. Non-inoculated bacteria culture medium served as control. Concentrations of SCFAs produced by cultured bacteria were measured by HPLC and gas chromatography as described^{77,78}.

Reagents and cytokines

All agonists, drugs and inhibitors were dissolved in glycerol, DMSO or water. Sodium salt of SCFAs were from Sigma and used in a range of concentrations from 0.5 to 8mM. GPRs agonists: GPR41: 4-CMTB (1µM Tocris) and Tiglic acid (1-10mM Sigma); GPR43: AR420626 (1µM Cayman) and 1-MCPC (1mM Sigma); GPR109a: Niacine (1mM-10mM, Sigma) and MK1903 (1µM Tocris Tocris). GPRs sub-unit inhibitors used were: Pertussis toxin (Ptx 0.2µg/ml) and U73122 (10 µM) from Sigma. HDAC inhibitors: Trichostatin A (TSA 1µM Sigma), SAHA (5µM Sigma) and valproic acid (VPA 5mM Sigma). SP1 inhibitor Mithramycin A (0.1µM Sigma). PPARγ activators: Pioglitazone (5µM), Rosiglitazone (10µM) and PPARγ inhibitor G9662 (100µM), from Cayman. NF-κB inhibitor BAY 11-7082 (40µM). AP-1 inhibitor SR-11302 (10µM Tocris). STAT3/Jak2 inhibitor Cucurbitacin I (1µM) from Tocris. IFNγ (100U/ml) and TNFα (10ng/ml) were from Peprotech. Final concentration of DMSO had no detectable effect on cells viability or responses.

Plasmids and transfection

Human GPR43 and GPR109a were cloned after EcoRI and XhoI digestion in pCMV-eGFP-N1 vector. Oligonucleotides used for amplification of GPR43 were *aaaactcgagatgctgccggactgga* and *aaaagaattctactctgtagtagaagtccga*. Oligonucleotides used for amplification of GPR109a were *aaaactcgagatgaatcgccaccatctgcaggat* and *aaaagaattcttaaggagaggtggccaga*. HT-29 cells were seeded at 3.10⁴ density per well in 96-well plates and transiently transfected with Lipofectamine 2000 (Thermofischer). 24h after transfection, incubation with reagents was done for an additional 24h prior luciferase activity measurement.

siRNA assays

HT29 cells were seeded at 4.10⁵ cells per well in a 6 wells plates on day 1 and siRNA were transfected with DharmaFect I at final concentrations of 1 and 25nM on day 2 and 3, following the manufacturer's instructions (Dharmacon). Incubation with drugs was done on day 6 and *IDO-1* activity was assessed on day 7. siRNA SMARTpool ON-TARGETplus STAT1 siRNA (L-003543-00-0005) and ON-TARGETplus Non-targeting Pool (D-001810-10-05) were from Dharmacon.

Real-Time PCR

Cells were seeded in 6-well culture plates at densities of 0.5 to 1.10^6 cells per well and cultured for 24h before stimulation. After a stimulation time of 6 or 24h, total RNA was extracted using RNeasy mini-Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). qPCRs were carried out using an ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) or StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFischer Scientific) with Taqman gene expression assay probes : *GAPDH* Hs02758991_g1, *IDO-1* Hs00984148_m1, *GPR43* Hs00271142_s1, *GPR41* Hs02519193_g1, *GPR109a* Hs02341584_s1, *RBPI* Hs01011512_g1, *Actinbeta* Hs99999903_m1, *STAT1* s01013996_m1, *B2M* Hs99999907_m1. *GAPDH*, *Actin*, *RBPI* and *B2M* were used for internal normalisation. Samples were tested in experimental duplicates and at least in biological triplicates. For primary cells treated with butyrate and control, cDNAs were pre-amplified (10 cycles) using the TaqMan PreAmp Master Mix Kit following the manufacturer's recommendations.

Western blot analysis

HT-29 cells were seeded at densities of 5×10^5 cells per well in 24-well-plates for 24h prior stimulation. Cells were washed twice and lysed in buffer (1% NP40, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCL pH8, 5mM EDTA, 1 x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1X x Phos STOP phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche). Nucleus were eliminated by centrifugation for 10 minutes 4°C at 17500g. Protein extracts were run in SDS-PAGE gels and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked overnight in TBS 0.1% tween 4% skim milk or BSA (Sigma). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C (*STAT1* 1:1000 (D1K9Y), *STAT1*-phospho TYR 701 1:1000 (58D6), *STAT3* 1:1000 (124H6), *Lamin A/C* 1:2000 (4C11) all from Cell signalling; *Actin* 1:2000 (AC-40) from Sigma, *GAPDH* 1:2000 from Santa Cruz). Secondary (Goat anti-Rabbit IgG HRP (P0448) and Goat anti-mouse HRP (P0447) from Dako) antibodies were successively added for 1h before detection with the Clarity Western ECL Substrate using the Chemidoc MP System (Bio-Rad). Quantifications were performed using the image Lab software (Bio-Rad). Proteins levels were internally normalised with *GAPDH* or *Actin* before comparison with experimental controls.

Cytoplasmic and nuclear proteins extraction

HT-29 cells were seeded at densities of 5×10^5 cells per well in 24-well-plates for 24h prior stimulation with butyrate. Cells were detached using trypsin prior cytoplasmic and nuclear proteins extraction using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific). *Lamin A/C* and *GAPDH* were used as nuclear and cytoplasmic protein loading controls respectively.

Promoter analysis

In silico analysis of the promoter sequence upstream of the transcription start of *IDO-1* was performed using Genomatix MatInspector software (core similarity = 1; matrix similarity >0.8).

Statistical Analysis

Data were analysed using R and RStudio software. Function for PCA analysis: `prcomp`. Correlation matrix was done with `Hmisc` package. Graphics were produced with `ggplot2` package and Prism GraphPad software. Statistical analysis was done with Student two-sided test or Wilcoxon rank test.

References

- 1 Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. & Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews* **90**, 859-904, doi:10.1152/physrev.00045.2009 (2010).
- 2 Ivanov, II & Honda, K. Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell host & microbe* **12**, 496-508 (2012).
- 3 Gomez de Agüero, M. *et al.* The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* **351**, 1296-1302, doi:10.1126/science.aad2571 (2016).
- 4 Rakoff-Nahoum, S. *et al.* Analysis of gene-environment interactions in postnatal development of the mammalian intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 1929-1936, doi:10.1073/pnas.1424886112 (2015).
- 5 Quevrain, E. *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* **65**, 415-425, doi:10.1136/gutjnl-2014-307649 (2016).
- 6 Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, 451-455, doi:10.1038/nature12726 (2013).
- 7 Mazmanian, S. K., Round, J. L. & Kasper, D. L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* **453**, 620-625 (2008).
- 8 Cohen, L. J. *et al.* Functional metagenomic discovery of bacterial effectors in the human microbiome and isolation of commendamide, a GPCR G2A/132 agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E4825-4834, doi:10.1073/pnas.1508737112 (2015).
- 9 Shen, Y. *et al.* Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell host & microbe* **12**, 509-520 (2012).
- 10 Blacher, E., Levy, M., Tatirovsky, E. & Elinav, E. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *Journal of immunology* **198**, 572-580, doi:10.4049/jimmunol.1601247 (2017).
- 11 Louis, P., Hold, G. L. & Flint, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews. Microbiology* **12**, 661-672, doi:10.1038/nrmicro3344 (2014).
- 12 Schilderink, R., Verseijden, C. & de Jonge, W. J. Dietary inhibitors of histone deacetylases in intestinal immunity and homeostasis. *Frontiers in immunology* **4**, 226, doi:10.3389/fimmu.2013.00226 (2013).
- 13 Candido, E. P., Reeves, R. & Davie, J. R. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* **14**, 105-113 (1978).
- 14 Sealy, L. & Chalkley, R. The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* **14**, 115-121 (1978).
- 15 Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. T., Archer, S. Y. & Hodin, R. A. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* **132**, 1012-1017 (2002).
- 16 Fellows, R. *et al.* Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nature communications* **9**, 105, doi:10.1038/s41467-017-02651-5 (2018).
- 17 Kagnoff, M. F. The intestinal epithelium is an integral component of a communications network. *The Journal of clinical investigation* **124**, 2841-2843, doi:10.1172/JCI75225 (2014).

- 18 Gaboriau-Routhiau, V. *et al.* The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* **31**, 677-689, doi:10.1016/j.immuni.2009.08.020 (2009).
- 19 Ivanov, II *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498 (2009).
- 20 Atarashi, K. *et al.* Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* **163**, 367-380, doi:10.1016/j.cell.2015.08.058 (2015).
- 21 Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337-341 (2011).
- 22 Schmidt, S. V. & Schultze, J. L. New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Frontiers in immunology* **5**, 384, doi:10.3389/fimmu.2014.00384 (2014).
- 23 Ciorba, M. A. Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol* **29**, 146-152, doi:10.1097/MOG.0b013e32835c9cb3 (2013).
- 24 Fallarino, F. *et al.* T cell apoptosis by kynurenines. *Advances in experimental medicine and biology* **527**, 183-190 (2003).
- 25 Harrington, L. *et al.* Deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances commensal-induced antibody responses and protects against Citrobacter rodentium-induced colitis. *Infection and immunity* **76**, 3045-3053, doi:10.1128/IAI.00193-08 (2008).
- 26 Wolf, A. M. *et al.* Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* **113**, 47-55, doi:10.1016/j.clim.2004.05.004 (2004).
- 27 Mizoguchi, E. *et al.* Colonic epithelial functional phenotype varies with type and phase of experimental colitis. *Gastroenterology* **125**, 148-161 (2003).
- 28 Barcelo-Batllori, S. *et al.* Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases. *Proteomics* **2**, 551-560, doi:10.1002/1615-9861(200205)2:5<551::AID-PROT551>3.0.CO;2-O (2002).
- 29 Zhou, L., Chen, H., Wen, Q. & Zhang, Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **24**, 695-701, doi:10.1097/MEG.0b013e328351c1c2 (2012).
- 30 Gurtner, G. J., Newberry, R. D., Schloemann, S. R., McDonald, K. G. & Stenson, W. F. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* **125**, 1762-1773 (2003).
- 31 Ferdinande, L. *et al.* Inflamed intestinal mucosa features a specific epithelial expression pattern of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Immunopathol Pharmacol* **21**, 289-295, doi:10.1177/039463200802100205 (2008).
- 32 Cherayil, B. J. Indoleamine 2,3-dioxygenase in intestinal immunity and inflammation. *Inflammatory bowel diseases* **15**, 1391-1396, doi:10.1002/ibd.20910 (2009).
- 33 Rhee, S. J., Walker, W. A. & Cherayil, B. J. Developmentally regulated intestinal expression of IFN-gamma and its target genes and the age-specific response to enteric Salmonella infection. *Journal of immunology* **175**, 1127-1136 (2005).
- 34 Matteoli, G. *et al.* Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* **59**, 595-604 (2010).
- 35 Sokol, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16731-16736 (2008).
- 36 Lakhdari, O. *et al.* Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF-kappaB modulation in the human gut. *PloS one* **5** (2010).
- 37 Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65 (2010).
- 38 Vital, M., Howe, A. C. & Tiedje, J. M. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *mBio* **5**, e00889, doi:10.1128/mBio.00889-14 (2014).
- 39 Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. & Macfarlane, G. T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**, 1221-1227 (1987).

- 40 Chon, S. Y., Hassanain, H. H. & Gupta, S. L. Cooperative role of interferon regulatory factor 1
and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human
indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *The Journal of biological chemistry* **271**, 17247-17252 (1996).
- 41 Rothfuchs, A. G. *et al.* STAT1 regulates IFN-alpha beta- and IFN-gamma-dependent control of
infection with Chlamydia pneumoniae by nonhemopoietic cells. *Journal of immunology* **176**,
6982-6990 (2006).
- 42 He, Y. W. *et al.* Sodium butyrate inhibits interferon-gamma induced indoleamine 2,3-dioxygenase
expression via STAT1 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sci* **93**, 509-515,
doi:10.1016/j.lfs.2013.07.028 (2013).
- 43 Jiang, G. M. *et al.* Sodium butyrate down-regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase at the
transcriptional and post-transcriptional levels. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1840-1846,
doi:10.1016/j.biocel.2010.07.020 (2010).
- 44 Litzenburger, U. M. *et al.* Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an
autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget* **5**, 1038-1051,
doi:10.18632/oncotarget.1637 (2014).
- 45 Yu, J. *et al.* Noncanonical NF-kappaB activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in
myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Journal of immunology* **193**, 2574-2586,
doi:10.4049/jimmunol.1400833 (2014).
- 46 Li, Q., Harden, J. L., Anderson, C. D. & Egilmez, N. K. Tolerogenic Phenotype of IFN-gamma-
Induced IDO+ Dendritic Cells Is Maintained via an Autocrine IDO-Kynurenine/AhR-IDO Loop.
Journal of immunology **197**, 962-970, doi:10.4049/jimmunol.1502615 (2016).
- 47 Tolhurst, G. *et al.* Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-
protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **61**, 364-371, doi:10.2337/db11-1019 (2012).
- 48 Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Backhed, F. From Dietary Fiber to Host
Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **165**, 1332-1345,
doi:10.1016/j.cell.2016.05.041 (2016).
- 49 Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M. & Steinkuhler, C. HDACs, histone
deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* **17**,
195-211, doi:10.1038/sj.cr.7310149 (2007).
- 50 Davie, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **133**, 2485S-2493S
(2003).
- 51 Nakano, K. *et al.* Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-
negative human colon cancer cell line. *The Journal of biological chemistry* **272**, 22199-22206
(1997).
- 52 Nepelska, M. *et al.* Butyrate produced by commensal bacteria potentiates phorbol esters induced
AP-1 response in human intestinal epithelial cells. *PloS one* **7**, e52869,
doi:10.1371/journal.pone.0052869 (2012).
- 53 Yu, D. C., Waby, J. S., Chirakkal, H., Staton, C. A. & Corfe, B. M. Butyrate suppresses
expression of neuropilin I in colorectal cell lines through inhibition of Sp1 transactivation. *Mol
Cancer* **9**, 276, doi:10.1186/1476-4598-9-276 (2010).
- 54 Alex, S. *et al.* Short-chain fatty acids stimulate angiopoietin-like 4 synthesis in human colon
adenocarcinoma cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell
Biol* **33**, 1303-1316, doi:10.1128/MCB.00858-12 (2013).
- 55 Thakur, B. K., Dasgupta, N., Ta, A. & Das, S. Physiological TLR5 expression in the intestine is
regulated by differential DNA binding of Sp1/Sp3 through simultaneous Sp1 dephosphorylation
and Sp3 phosphorylation by two different PKC isoforms. *Nucleic Acids Res* **44**, 5658-5672,
doi:10.1093/nar/gkw189 (2016).
- 56 Wilson, A. J. *et al.* Apoptotic sensitivity of colon cancer cells to histone deacetylase inhibitors is
mediated by an Sp1/Sp3-activated transcriptional program involving immediate-early gene
induction. *Cancer Res* **70**, 609-620, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2327 (2010).
- 57 Blume, S. W. *et al.* Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional
activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *The Journal of clinical
investigation* **88**, 1613-1621, doi:10.1172/JCI115474 (1991).

- 58 Nepelska, M. *et al.* Commensal gut bacteria modulate phosphorylation-dependent PPARgamma transcriptional activity in human intestinal epithelial cells. *Scientific reports* **7**, 43199, doi:10.1038/srep43199 (2017).
- 59 Smith, K., McCoy, K. D. & Macpherson, A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in immunology* **19**, 59-69, doi:10.1016/j.smim.2006.10.002 (2007).
- 60 Honda, K. & Littman, D. R. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol* **30**, 759-795 (2012).
- 61 Patnala, R., Arumugam, T. V., Gupta, N. & Dheen, S. T. HDAC Inhibitor Sodium Butyrate-Mediated Epigenetic Regulation Enhances Neuroprotective Function of Microglia During Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol*, doi:10.1007/s12035-016-0149-z (2016).
- 62 Yuan, C., Qi, J., Zhao, X. & Gao, C. Smurf1 protein negatively regulates interferon-gamma signaling through promoting STAT1 protein ubiquitination and degradation. *The Journal of biological chemistry* **287**, 17006-17015, doi:10.1074/jbc.M112.341198 (2012).
- 63 Tanaka, T., Soriano, M. A. & Grusby, M. J. SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity* **22**, 729-736, doi:10.1016/j.immuni.2005.04.008 (2005).
- 64 Maarifi, G. *et al.* Small Ubiquitin-like Modifier Alters IFN Response. *Journal of immunology* **195**, 2312-2324, doi:10.4049/jimmunol.1500035 (2015).
- 65 Brandacher, G. *et al.* Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* **12**, 1144-1151, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1966 (2006).
- 66 Takamatsu, M. *et al.* IDO1 plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice. *Journal of immunology* **191**, 3057-3064, doi:10.4049/jimmunol.1203306 (2013).
- 67 Shon, W. J., Lee, Y. K., Shin, J. H., Choi, E. Y. & Shin, D. M. Severity of DSS-induced colitis is reduced in Idol1-deficient mice with down-regulation of TLR-MyD88-NF-kB transcriptional networks. *Scientific reports* **5**, 17305, doi:10.1038/srep17305 (2015).
- 68 Ciorba, M. A. *et al.* Induction of IDO-1 by immunostimulatory DNA limits severity of experimental colitis. *Journal of immunology* **184**, 3907-3916, doi:10.4049/jimmunol.0900291 (2010).
- 69 Pallotta, M. T. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature immunology* **12**, 870-878, doi:10.1038/ni.2077 (2011).
- 70 Fallarino, F., Grohmann, U. & Puccetti, P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *European journal of immunology* **42**, 1932-1937, doi:10.1002/eji.201242572 (2012).
- 71 Metghalchi, S. *et al.* Indoleamine 2,3-Dioxygenase Fine-Tunes Immune Homeostasis in Atherosclerosis and Colitis through Repression of Interleukin-10 Production. *Cell metabolism* **22**, 460-471, doi:10.1016/j.cmet.2015.07.004 (2015).
- 72 Zelante, T. *et al.* Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **39**, 372-385, doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003 (2013).
- 73 Thaker, A. I. *et al.* IDO1 metabolites activate beta-catenin signaling to promote cancer cell proliferation and colon tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* **145**, 416-425 e411-414, doi:10.1053/j.gastro.2013.05.002 (2013).
- 74 Jarry, A. *et al.* Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *The Journal of clinical investigation* **118**, 1132-1142, doi:10.1172/JCI32140 (2008).
- 75 Habib, A. M., Richards, P., Rogers, G. J., Reimann, F. & Gribble, F. M. Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia* **56**, 1413-1416, doi:10.1007/s00125-013-2887-z (2013).
- 76 Hungate, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev* **14**, 1-49 (1950).

- 77 Lakhdari, O. *et al.* Identification of NF-kappaB modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 282356, doi:10.1155/2011/282356 (2011).
- 78 Bourriaud, C. *et al.* Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol* **99**, 201-212, doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02605.x (2005).

Acknowledgements:

The authors are grateful to Drs Véronique Douard (INRA UMR1319) and Marion Espeli (INSERM UMR-S996) for helpful discussions and critical comments on the manuscript. The authors are grateful to members of the team for helpful discussions. The authors are grateful to Agnès David (INRA, UMR 1280 PHAN, Nantes, France) for SCFA analysis. This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), by grants funded by EU-FP7 METACARDIS (HEALTH-F4-2012-305312), by the ANR FunMetagen (ANR-11-BSV6-0013). CMG was the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Éducation Nationale (UPMC-Sorbonne University). The Human Research Tissue Bank is supported by the NIHR Cambridge Biomedical Research Centre.

Authors Contribution

Conceived and designed the experiments: CMG, NL; performed most of the experiments: CMG; performed some experiments: PL, AJ, FBC, LM, FL, NL; analysed the data: CMG, AJ, NL; contributed materials: FR; wrote the paper: CMG, NL; edited and revised the manuscript: AJ, PL, FR, HMB.

Disclosures:

The authors disclose no conflict of interest.

Article II : Le butyrate sécrété par les bactéries du microbiote augmente l'expression du *Transforming growth factor beta 1 (TGFB1)* par le facteur de transcription SP1 dans les cellules épithéliales de l'intestin humain.

Introduction à article

Le Transforming Growth Factor beta 1 (TGFB1) est une cytokine majeure de l'immunité innée et adaptative. La présence de TGFB1 dans l'environnement, est nécessaire à la différenciation de lymphocytes T régulateurs qui, en contrôlant la réponse inflammatoire, participent à la tolérance du microbiote par le système immunitaire (Bauché and Marie, 2017; Li and Flavell, 2008). Les cellules épithéliales et dendritiques sont des sources importantes de TGFB1 dans l'intestin cependant, l'impact des bactéries du microbiote intestinal sur TGFB1 est encore mal connu. Une comparaison entre souris axéniques et souris conventionnelles révèle que TGFB1 est plus exprimé en présence du microbiote (Larsson et al., 2012). En outre, dans deux études successives, le groupe d'Atarashi et Honda a démontré que la colonisation de souris axéniques avec certaines bactéries, appartenant au groupe des *Clostridiales*, induit l'augmentation de la protéine TGFB1 dans les cellules épithéliales de l'intestin (Atarashi et al., 2011a, 2013). Ils ont mis en évidence l'activité tolérogène des *Clostridiales* qui en augmentant TGFB1, stimulent la différenciation des lymphocytes T naïfs en T régulateurs. Dans ce modèle, les *Clostridiales* sécrètent des molécules de nature non protéique et non nucléique et dont le mécanisme d'action est indépendant de MYD88, CARD9 et RIP2.

C'est dans cette optique que nous avons cherché dans un premier temps de déterminer quelles bactéries intestinales sont capables de moduler *TGFB1* via la sécrétion de molécules, dans un système rapporteur dans des cellules épithéliales intestinales humaines (HT29). L'objectif ensuite était d'identifier les molécules immuno-modulatrices. Notre troisième objectif était enfin, de détailler les mécanismes par lesquels ces molécules agissent sur *TGFB1*.

Ce deuxième article, soumis fin Mars à Scientific Reports, démontre les *Clostridiales* et des *Fusobacterium* sont les seuls groupes de bactéries à activer *TGFB1* dans des HT29. Ces bactéries sécrètent du butyrate un acide gras à chaîne courte, qui stimule TGFB1 indépendamment des GPR41, 43 et 109a ainsi que du transporteur MCT1. Nos résultats suggèrent que ce sont les propriétés d'inhibition des histones et lysines déacétylases qui augmente la transcription de *TGFB1*. Grâce à l'utilisation d'inhibiteur et des mutations ponctuelles dans le promoteur minimum de *TGFB1* indiquent que le facteur de transcription SP1 est clef pour l'action des inhibiteurs d'histone et lysines déacétylases. Enfin, nous avons montré que l'activation de *TGFB1* par une sélection de *Clostridiales* repose effectivement sur un mécanisme dépendant de SP1.

Les travaux publiés dans cet article proposent un mécanisme par lequel certaines bactéries du microbiote intestinale stimule la sécrétion de TGFB1, favorisant ainsi un environnement anti-inflammatoire favorable au maintien de l'homéostasie intestinale.

Article 2 soumis à Scientific Reports

Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells.

Camille Martin-Gallausiaux^{1,2}, Fabienne Béguet-Crespel¹, Ludovica Marinelli^{1,2}, Alexandre Jamet¹, Florence Ledue¹, Hervé M. Blottière^{1,3} and Nicolas Lapaque^{1*}.

1. Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France;

2. Sorbonne Université, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France.

3. MetaGenoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy en Josas, France.

* Corresponding author: Dr Nicolas Lapaque

INRA-MICALIS UMR1319, Bat 442, Domaine de Vilvert 78350, Jouy-en-Josas, France.

e-mail: nicolas.lapaque@inra.fr

Abstract

The intestinal microbiota contributes to the global wellbeing of their host by their fundamental role in the induction and maintenance of a healthy immune system. Commensal bacteria shape the mucosal immune system by influencing the proportion and the activation state of anti-inflammatory regulatory T cells (Treg) by metabolites that are still only partially unravelled. Microbiota members such as *Clostridiales* provide a transforming growth factor β (TGF β)-rich environment that promotes the accumulation of Treg cells in the gut.

The intestinal epithelial cells (IECs) take a central part in this process, as they are a major source of TGF β 1 upon bacterial colonisation. In this study, we investigated which gut commensal bacteria were able to regulate the *TGFBI* human promoter in IECs using supernatants from cultured bacteria. We reported that Firmicutes and Fusobacteria supernatants were the most potent *TGFBI* modulators in HT-29 cells. Furthermore, we demonstrated that butyrate was the main metabolite in bacterial supernatants accounting for TGF β 1 increase. This butyrate-driven effect was independent of the G-protein coupled receptors GPR41, GPR43 and GPR109a, the transporter MCT1 as well as the transcription factors NF- κ B and AP-1 present on *TGFBI* promoter. Interestingly, HDAC inhibitors were inducing a similar *TGFBI* increase suggesting that butyrate acted through its HDAC inhibitor properties. Finally, our results showed that SP1 was the main transcription factor mediating the HDAC inhibitor effect of butyrate on *TGFBI* expression. This is, to our knowledge, the first characterisation of the mechanisms underlying *TGFBI* regulation in IEC by commensal bacteria derived butyrate.

Introduction

Humans are colonized by bacteria, archaea, eukaryotes and viruses, which are collectively called the microbiota. These organisms exert diverse functions often associated with beneficial physiological effects for the host. Numerous studies suggest that indigenous members of the microbiota are central for the fine regulation of the host immune system through their intimate interaction with the host epithelium¹⁻⁵. The composition of the host intestinal microbiota shapes the mucosal and the systemic immune responses in part by influencing the proportion and the activation state of T cell subsets. Among them the intestinal Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) play a central role in maintaining immunological homeostasis and their proportion is highly related to the microbiota composition^{4,6-9}. Two studies showed that complex mixtures of *Clostridiales* bacteria from clusters IV and XIVa or a single *Clostridium* species cluster I, provide a transforming growth factors β 1 (TGF β 1)-rich environment that promotes the accumulation of induced Treg cells (iTreg)^{4,9}. Interestingly, in inflammatory bowel diseases (IBD) known to be linked to commensal bacteria composition, *Clostridiales* clusters IV and XIVa are significantly less abundant and the pathology have been reported to be associated with an impairment of TGF β signalling in numerous immune cell types including T cells¹⁰⁻¹⁶.

The molecular mechanisms of Treg cell generation by the microbiota have only been partially unravelled^{4,6-9}. Several groups have shown that short chain fatty acids (SCFAs), such as butyrate, that derived from the bacterial fermentation of dietary fibres promote Treg cell generation^{6,8}. Butyrate acts as an inhibitor of histone deacetylases (iHDACs) and consequently enhances histone H3 acetylation in the regulatory elements of the *Foxp3* locus. However, *in vitro* Treg generation is not induced directly by SCFAs alone and requires TGF β 1 stimulation^{6,8}. Moreover, TGF β 1 is essential for Treg differentiation by butyrate-producing bacteria *in vivo*⁴.

In the gut, dendritic cells (DC) and intestinal epithelial cells (IEC) are the major cellular sources of TGF β 1^{4,9,17-19}. Interestingly, germ-free mice colonisation by certain members of the microbiota leads to enhanced TGF β 1 expression in IECs and the almost complete restoration of colonic Treg level^{4,9,20,21}. A recent study demonstrated that *Clostridium butyricum* increased iTreg generation *via* a Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent induction of TGF β 1 by DCs. This was the first demonstration of a mechanism deployed by a member of the gut microbiota to activate TGF β 1 secretion leading to Treg cells generation⁹.

The *TGFB1* auto-induction loop is well documented. Addition of TGF β 1 activates TGF β 1 receptor leading to a SMAD and MAPK-dependent downstream signalling²². However, there are only few mechanical insights on *TGFB1* regulation by exogenous signals. Indeed, TGF β 1 induction by commensal bacteria is promoting the proliferation, polarization and differentiation of T lymphocytes but the involved molecules or pathways are still unknown⁴. We thus decided to investigate the impact of individual cultivable commensal bacteria on *TGFB1* transcriptional expression in a human IEC model and to further characterise the underlying molecular mechanisms.

In the current study, we screened bacterial supernatants derived from over 120 commensal species on a *TGFB1* reporter system and showed that butyrate was the main microbiota-derived metabolite inducing *TGFB1* expression in the human intestinal epithelial cell-line HT-29. We showed that the *TGFB1* induction by butyrate was independent of the SCFA G-protein coupled receptors (GPR41, GPR43 and GPR109a), and of the SCFA transporter

monocarboxylate transporter 1 (MCT1). Moreover, the *TGFBI* up-regulation could be attributed to the HDAC inhibitory properties of SCFAs. Finally, by using specific inhibitors and point mutations of the promoter region of *TGFBI*, we excluded NF κ B and AP1 as regulatory elements and showed that the SP1 transcription factor was involved in the butyrate-driven activation of *TGFBI* expression.

Results

Metabolites derived from commensal bacteria modulate TGF β 1 expression

TGF β 1 expression is severely decreased in the colon of germ-free mice compared to colonised mice suggesting a crucial role of the microbiota in this process⁴. The impact of bacterial metabolites is particularly drastic on TGF β 1 production by IEC although no mechanism has been described at the moment. Thus, to decipher which commensal bacteria regulate *TGFBI* expression; we have studied the activity of more than a hundred bacterial species, including 60% of the bacteria belonging to the human core microbiota, on a *TGFBI* reporter system expressed in the human IEC line HT-29²³. Previous publications have reported that active biological compounds produced by bacteria in the gut are likely to be small diffusible molecules, thus we tested bacterial supernatants on a HT-29-TGF_{prom} reporter system (Figure 1A)^{11,24-26}. Our results showed that species belonging to the Firmicutes and Fusobacteria phyla were the main *TGFBI* inducers while some members of Actinobacteria were inhibitors. At the genus level, *Clostridiales* and *Fusobacterium* were highly increasing *TGFBI* expression. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were decreasing *TGFBI* activity however, these effects were not found in all the tested species (Supplementary 1, to be found in the Annexes part at the end of the manuscript).

Butyrate activates *TGFBI* expression in epithelial cell line

A common characteristic of the main *TGFBI* inducers, *Clostridiales* and *Fusobacterium*, is their capacity to degrade complex dietary fibres by anaerobic fermentation²⁷. As SCFAs are major end-products of this anaerobic fermentation with important impacts on human health, we thus quantified the concentrations of acetate, butyrate, propionate, valerate as well as isobutyrate and isovalerate in bacterial supernatants (Supplementary table 1). Global correlation analysis by principal component (PCA) of all the SCFAs concentrations and *TGFBI* expression showed that butyrate was the only SCFA for which the concentration correlated to *TGFBI* activity (Figure 1B). In addition, this association was confirmed by a Spearman pairwise correlation between butyrate and *TGFBI*, on ranked data (Figure 1C).

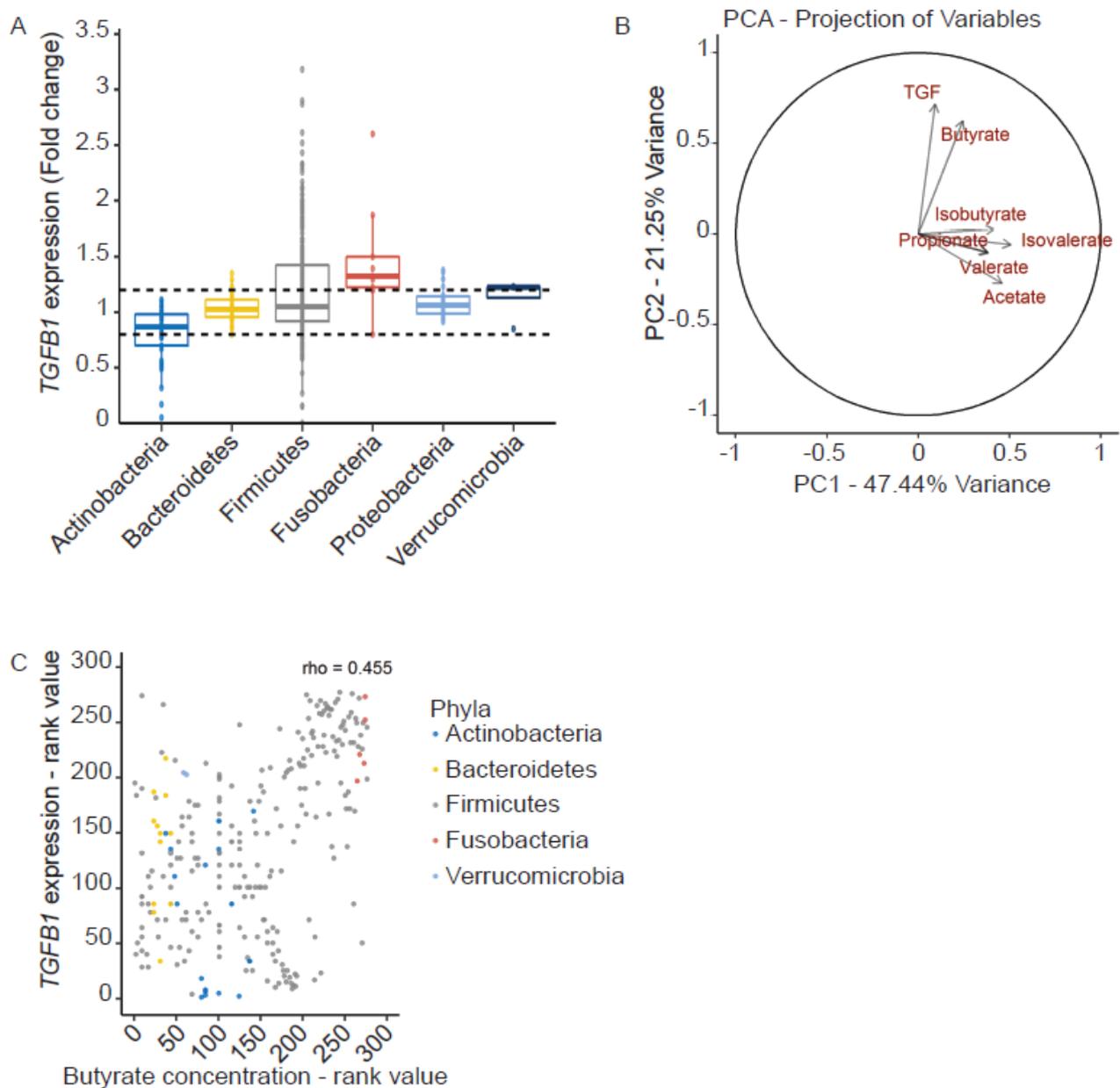


Figure 1: Correlation between bacterial metabolites production and *TGFB1* gene expression.

(A) Effect of bacterial supernatants on HT-29-TGF_{prom} reporter system organised by phylum. Culture supernatants of a wide range of commensal bacteria were applied on the HT-29-TGF_{-2688/+528} reporter system (10% vol/vol). *TGFB1* expression was measured by luciferase activity and expressed as fold change towards its control: bacterial growth medium used in each experiment and bacterial culture. Dash lines draw upper and lower zones where *TGFB1* was considered as significantly changed. (B) PCA analysis showing the correlation between the SCFA concentrations produced by the commensal bacteria and the *TGFB1* expression. (C) Representation of *TGFB1* expression correlated to butyrate concentration in different bacterial cultures ordered ranked values (Spearman correlation, $r=0.455$, $p\text{-value}=1.302e-15$). Actinobacteria in blue, Bacteroidetes in yellow, Firmicutes in grey, Fusobacteria in red and Verrucomicrobia in light blue.

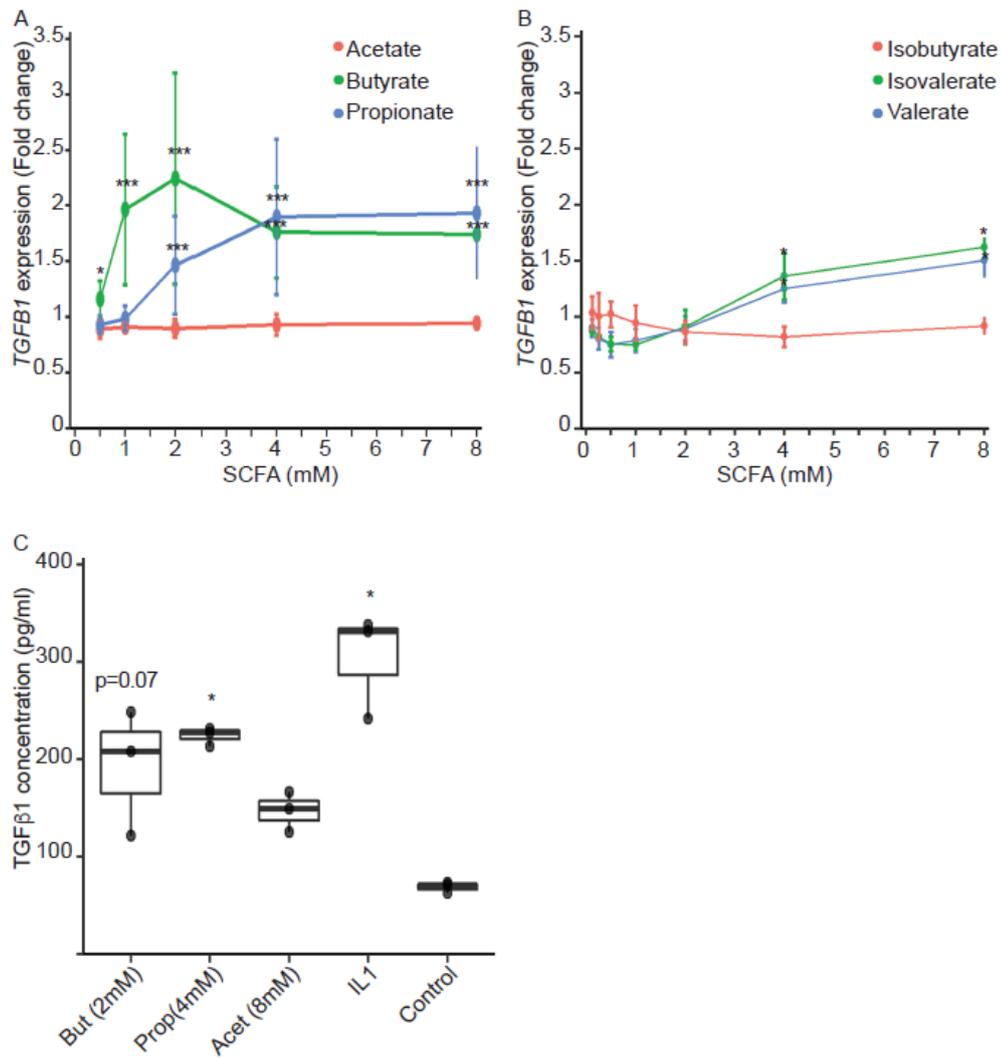


Figure 2: Impact of SCFAs on *TGFβ1* expression. (A) HT-29-TGF_{prom} reporter cells were incubated for 24h with a range of concentrations of acetate, propionate and butyrate (0.5, 1, 2, 4, 8 mM). (B) HT-29-TGF_{prom} reporter cells were incubated for 24h with a range of concentrations of isobutyrate, isovalerate and valerate (0.5, 1, 2, 4, 8 mM). *TGFβ1* expression was measured by luciferase activity and expressed as the mean ± SD of fold change towards unstimulated cells, N ≥ 3, (C) HT-29 cells were incubated for 24h with IL1β (10ng/ml), butyrate 2mM, propionate 4mM or acetate 8mM. TGFβ1 active and latent levels were measured by ELISA and expressed as median ± quartiles, expressed in pg/ml. N=3, t-test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

We confirmed experimentally the observed correlation by testing a large range of physiological concentrations of SCFAs on HT-29-TGF_{prom} reporter cells. As shown in Figure 2A, butyrate was a potent *TGFβ1* inducer with a significant impact at concentration starting at 1mM. Interestingly, other SCFAs such as propionate, valerate and isovalerate activated *TGFβ1* but to a lesser extent (Figure 2A and 2B). The most abundant SCFA produced by gut bacteria, acetate, had no impact on *TGFβ1* expression. Moreover, we demonstrated that SCFAs not only increased *TGFβ1* gene activity but also enhance TGFβ1 protein level as assayed by ELISA (Figure 2C).

Butyrate-driven activation of *TGFBI* is independent of the SCFA receptors GPR41, GPR43, GPR109a and the SCFA transporter MCT1.

SCFAs induce numerous signalling pathways through their binding to three different G-protein coupled receptors (GPR): GPR41, GPR43 and GPR109a. These receptors display affinities for SCFAs leading to cellular signals²⁸⁻³⁰. The three GPRs were found expressed in HT-29 cell line (Supplementary Figure 2A). To investigate the potential role of these receptors on *TGFBI* expression, we tested specific agonists of GPR41 (1-MCPC and AR420626), GPR43 (Tiglic acid and 4-CMTB) and GPR109a (Niacin and MK1903) on HT-29-TGF_{prom} reporter system. None of the agonists was able to mimic the effect of butyrate on *TGFBI* expression suggesting that these GPRs were not involved in this process (Figure 3A). Upon ligand binding, GPRs signal through two G-protein subunits activation: G α /i (for GPR41, GPR43 and GPR109a) and G α /q (for GPR43). To confirm our observation, we used Gi/o and Gq inhibitors, the pertussis toxin (Ptx) and phospholipase C β inhibitor (U73122) respectively. Interestingly, none of the inhibitors was able to block the butyrate-dependent up-regulation of *TGFBI* expression (Figure 3B). Moreover, over-expression of GPR43 and GPR109a in HT-29-TGF_{prom} reporter cells did not impact the butyrate-dependent activation of *TGFBI* expression, strengthening the hypothesis of a GPR-independent mechanism (supplementary Figure 2B and 2C).

Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) has been described as the main butyrate transporter in the colon and is largely expressed in HT-29 cells (Supplementary Figure 2A)^{31,32}. We thus investigated if butyrate uptake by monocarboxylate transporter 1 (MCT1) was involved in *TGFBI* up-regulation. Incubation of HT-29-TGF_{prom} cells with two different MCT1 inhibitors, pCMB and AR-C15858, had no impact on the butyrate-induced activation of *TGFBI*, suggesting that MCT1 was not involved in the butyrate-driven up-regulation of *TGFBI* (Figure 3C).

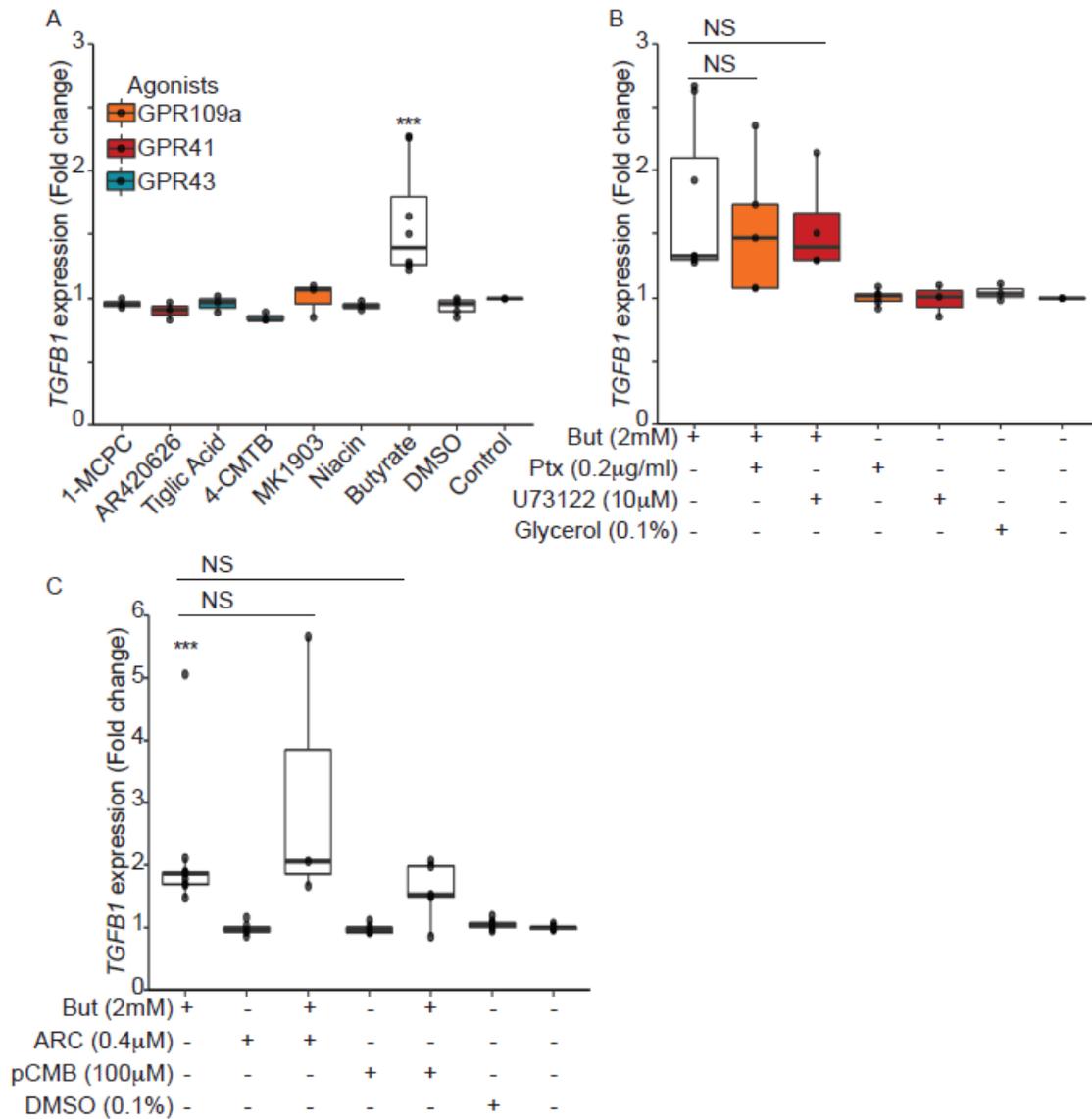


Figure 3: Butyrate mediated impact on *TGFBI* is independent of GPR41, GPR43, GPR109a receptors and MCT1 transporter. (A) HT-29-TGF_{prom} reporter cells were incubated for 24h with selective GPR agonists: GPR41: AR420626 (1μM) and 1-MCPC (1mM); GPR43: 4-CMTB (1μM) and Tiglic acid (1mM); GPR109a: Niacin (1mM) and MK1903 (1μM) or with DMSO (vehicle) or butyrate (2mM). (B) HT-29-TGF_{prom} reporter cells were incubated with GPRs sub-unit inhibitors: Pertussis toxin 2h before (Ptx, 0.2μg/ml) and U73122 (10μM) prior butyrate 2mM stimulation and left for a total 24h of incubation. (C), HT-29-TGF_{prom} reporter cells were incubated for 24h with selective MCT1 inhibitors: pCMB (100μM) and AR-C155858 (400nM). *TGFBI* expression was measured by luciferase activity and expressed as median ± quartiles of fold change towards un-stimulated cells. N ≥ 3, Wilcoxon test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Butyrate induces *TGFBI* expression via its HDAC inhibitor property

It is well established that SCFAs, and butyrate in particular, rely on their lysine and histone deacetylase inhibition (HDACi) property to modulate histone acetylation, transcription factor acetylation and binding, and consequently gene expression^{5,33-35}. Butyrate targets class I and class II HDAC and thus modulates the expression of a wide range of genes³⁶. To assess if butyrate HDACi property was involved in *TGFBI* up-regulation, we tested two

HDACi targeting zinc dependent class I and II HDAC families. We treated HT-29-TGF_{prom} reporter cells with trichostatin A (TSA) and vorinostat (SAHA) both sharing a hydroxynamic acid structure, different from butyrate which belongs to the aliphatic family^{33,36}. Interestingly, both TSA and SAHA mimicked butyrate effect by increasing *TGFBI* activity, suggesting that the butyrate-driven up-regulation of *TGFBI* might be a consequence of its HDAC inhibitory properties (Figure 4).

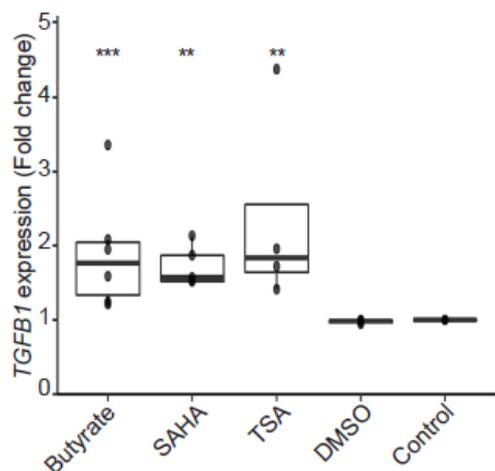


Figure 4: HDAC inhibitor mimicked the butyrate-dependent activation of *TGFBI* expression. HT-29-TGF_{prom} reporter cells were incubated with butyrate (2mM), SAHA (5 μ M), trichostatin A, (TSA, 1 μ M) or controls (DMSO and RPMI). *TGFBI* expression was measured by luciferase activity and expressed as fold increase towards the control: un-stimulated cells. Data are represented as median \pm quartiles of fold change towards un-stimulated cells. $N \geq 4$, Wilcoxon test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

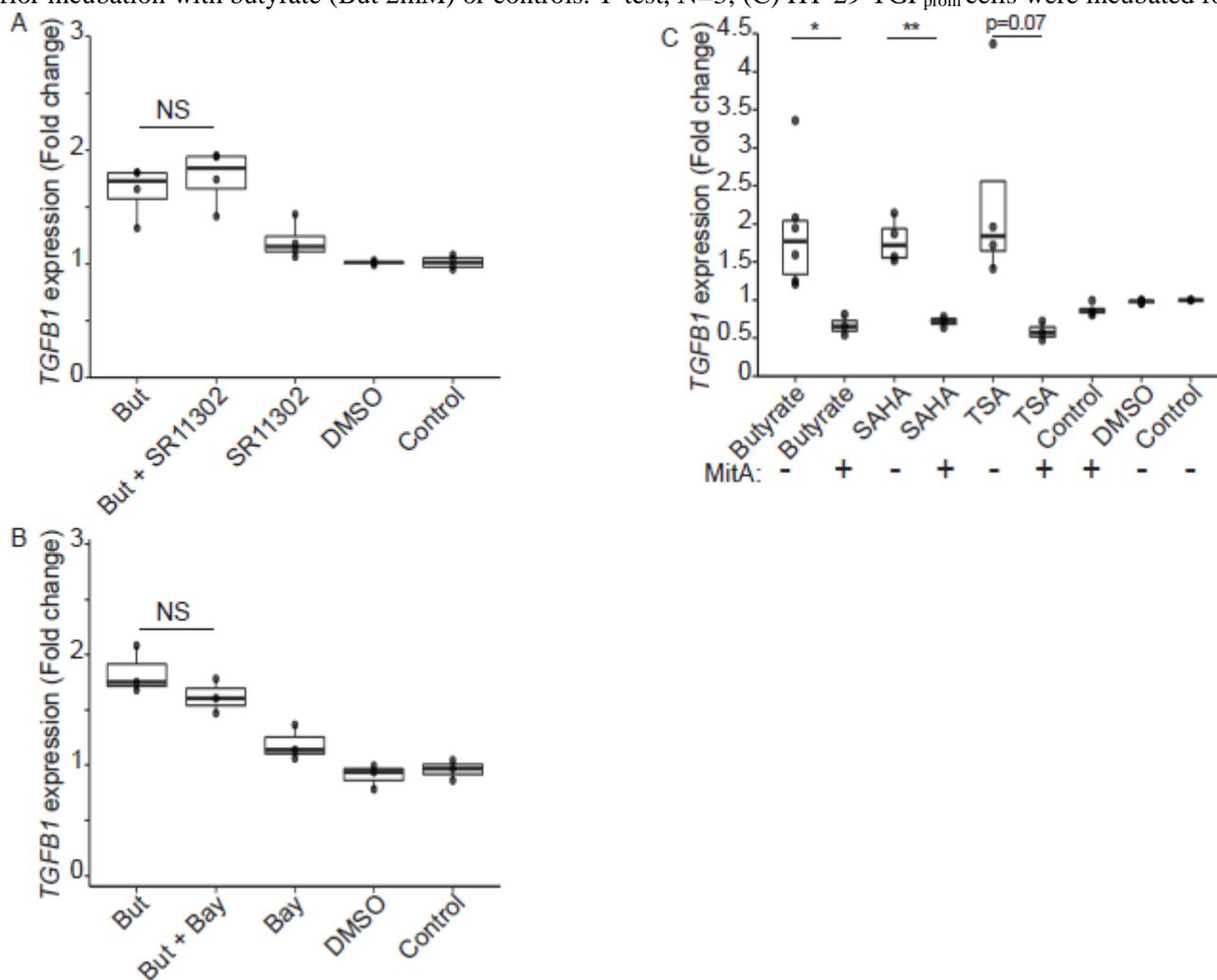
Butyrate-induced *TGFBI* expression is independent of NF- κ B and AP-1 and relies on SP1.

Regulation of gene transcription by butyrate involves a wide range of transcription factors. To delineate which transcription factors (TF) are targeted by butyrate and might directly impact *TGFBI* expression, we analysed the human *TGFBI* promoter sequence. As expected from previous publications, we found several binding sites for transcription factors implicated in HDACi and butyrate-regulated gene expression including Specificity Protein-1 (SP1) binding GC-rich boxes, Activator protein 1 (AP-1) and NF- κ B responsive elements (Table 1)³⁷⁻⁴⁵. Previous work reported that some of these binding sites were functional. Indeed an AP-1 and a SP1 binding sites have been described as main regulators of the *TGFBI* gene activity in different cell types at steady state and upon infection^{46,47}. NF- κ B was shown to increase *TGFBI* expression in cooperation with AP-1⁴⁸.

To investigate which transcription factor controls the butyrate-induced up-regulation of *TGFBI*, we first treated HT-29-TGF_{prom} reporter cells with an AP-1 specific inhibitor (SR11302) in presence or absence of butyrate (Figure 5A). The AP-1 inhibitor was not able to block the butyrate-induced *TGFBI* increase suggesting that this transcription factor was not involved. Then, we treated HT-29-TGF_{prom} reporter cells with an NF- κ B inhibitor (BAY 117082) prior to butyrate stimulation (Figure 5B). We observed that NF- κ B inhibition did not impact significantly butyrate enhancement of *TGFBI*. Interestingly, butyrate did not activate the NF- κ B pathway in an HT-29 NF- κ B reporter system confirming that this transcription factor had no role in butyrate-dependent *TGFBI* induction (Supplementary Figure 3A). To explore SP1 implication in the induction of *TGFBI* in our model, we incubated HT-29-TGF_{prom} reporter cells with butyrate or HDACi in presence of mithramycin A, a competitive SP1/SP3 inhibitor. Binding inhibition to GC rich sequence by mithramycin A drastically inhibited *TGFBI* up-regulation by butyrate (Figure 5C).

We also observed a diminution of the butyrate-dependent activation of *TGFB1* by inhibiting SP1 expression by siRNA thus strengthening our previous result (Supplementary Figure 3B). These results suggest that the induction of *TGFB1* expression by butyrate is mediated through SP1 binding to GC rich response element. Furthermore, TSA and SAHA impacts on *TGFB1* expression were also abrogated by SP1 knockdown or mithramycin A competition (Figure 5C and Supplementary Figure 3B).

Figure 5: Butyrate activated *TGFB1* expression in a NF- κ B-independent, AP1-independent-manner. (A) HT-29-TGF_{prom} reporter cells were stimulated for 24h with SR11302 (10 μ M) a specific AP-1 inhibitor in presence or absence of butyrate (But 2mM). Wilcoxon test, N=4; (B) HT-29-TGF_{prom} cells were incubated with BAY11-7082 40 μ M 2h prior incubation with butyrate (But 2mM) or controls. T-test, N=3; (C) HT-29-TGF_{prom} cells were incubated for 24h



with mithramycin A (100nM) and butyrate or HDACi, t-test, N \geq 3. *TGFB1* expression was measured by luciferase activity and expressed as fold increase towards un-stimulated cells. Data are represented as median \pm quartiles of fold change. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

We further characterised which region of *TGFB1* promoter was responsible for the butyrate dependent activation of *TGFB1*. Two truncated *TGFB1* promoter constructs were generated and stably transfected into HT-29 cells. HT-29-TGF_{-1362/+11} and HT-29-TGF_{-453/+11} reporter cells were treated with butyrate and HDAC inhibitors (Figure 6A and 6B). The effect of butyrate and HDACi on luciferase expression was observed in both constructs suggesting a cis-regulatory element activity present in the core promoter, close to the 5' UTR region (Figure 6B).

As shown in Figure 6A, several functional AP-1 (-416, -370) and SP1 (-216) responsive elements have been identified in the *TGFBI* core promoter^{46,47}. To assess the role of the AP-1 (-416, -370) and SP1 (-216) binding sites, we stably transfected HT-29 cells with the TGF_{-453/+11} reporter system with a double mutations of the AP-1 motifs or a single mutation on the SP1 motif (HT-29-TGF_{-453/+11}AP1 and HT-29-TGF_{-453/+11}SP1 respectively, Figure 6A). Mutations of the AP-1 motifs did not prevent the activation by butyrate and others HDACi confirming our results with AP-1 inhibitor (Supplementary Figure 4). Mutation of one SP1 binding site was sufficient to severely reduce the *TGFBI* promoter activation by butyrate and HDACi, confirming that SP1 is involved in this process (Figure 6B). Altogether our results showed that butyrate and HDACi induce *TGFBI* up-regulation independently of NF-κB and AP-1 and through the -216 SP1 site.

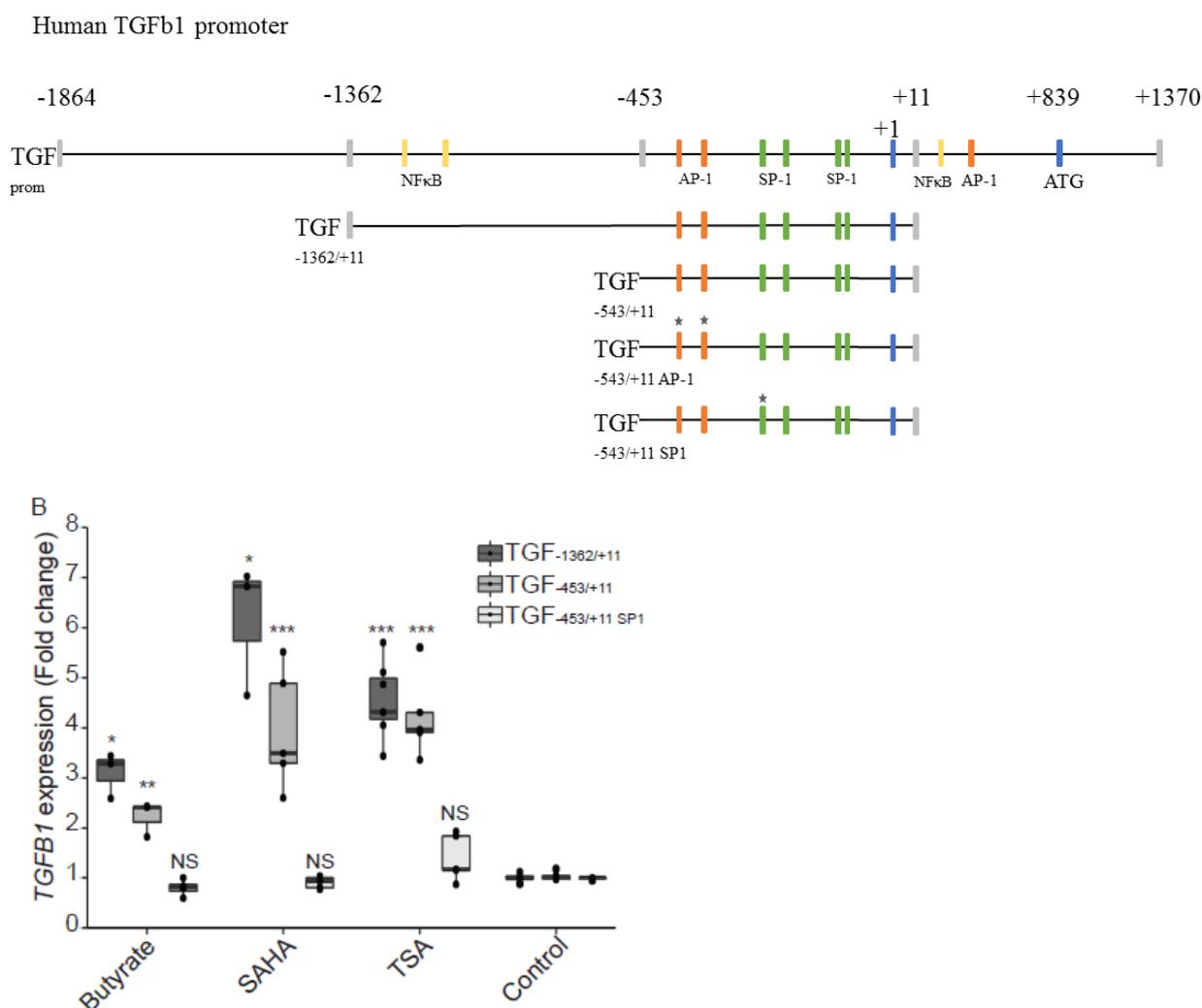


Figure 6: *TGFBI* up-regulation by butyrate and HDACi is SP1-dependent (A) Schematic representation of the human *TGFBI* promoter with a selection of binding motifs^{37,38,46,47}. The translation (ATG) and transcription start sites (+1) were defined by^{65,66}. Mutations of AP-1 and SP1 boxes on HT-29-TGF_{-453/+11} are represented. (B) HT-29-TGF_{-1362/+11}, HT-29-TGF_{-453/+11}, HT-29-TGF_{-453/+11}SP1 reporter cells were stimulated for 24h with butyrate (4mM), TSA (1μM) or SAHA (5μM). *TGFBI* expression was measured by luciferase activity and expressed as fold increase towards un-stimulated cells. Data are represented as median ± quartiles of fold change. N ≥ 3, t-test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Bacterial induction of *TGFBI* is butyrate and SP1-dependent

The main purpose of this study was to investigate the molecular mechanism by which commensal bacteria induce *TGFBI* expression in epithelial cells. We thus incubated a selection of *TGFBI*-inducing bacterial supernatants on HT-29-TGF_{prom} cells in presence of SP1/SP3 inhibitor (mithramycin A). As shown in Figure 7, inhibition of SP1/SP3 binding motifs had a similar impact on butyrate and bacterial-induced up-regulation of *TGFBI*. The commensal bacteria selected throughout our screen due to their ability to increase *TGFBI*, were all butyrate-producing bacteria. Our results demonstrate the crucial role of SP1 in the *TGFBI* expression induced by butyrate from commensal bacteria.

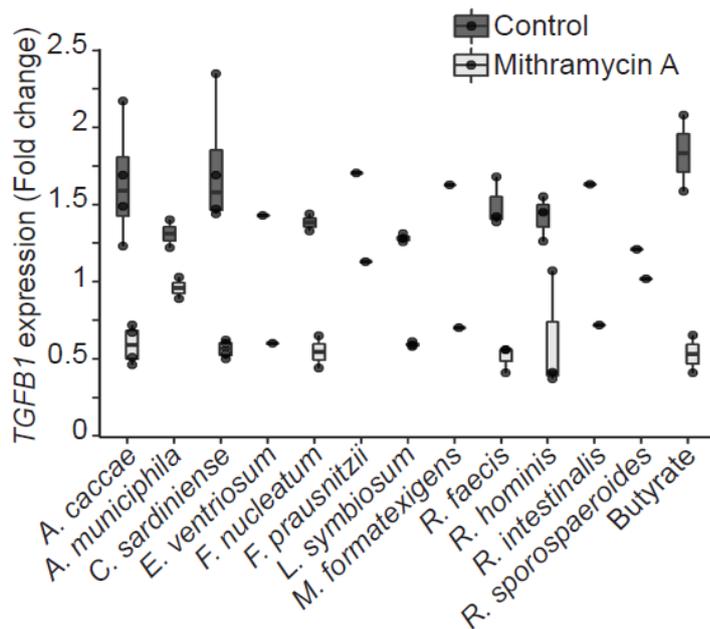


Figure 7: SP1-inhibitor mithramycin inhibited *TGFBI* induction by the butyrate-producing bacteria. HT-29-TGF_{prom} cells were incubated for 24h with bacterial supernatants (10% (v/v)) or butyrate (But 2mM) ± mithramycin A (100nM). *TGFBI* expression was measured by luciferase activity and expressed as fold increase towards unstimulated cells. Data are represented as median ± quartiles of fold change.

Discussion

TGF β 1 is a pleiotropic cytokine highly conserved among metazoan and secreted in its latent form. Produced by many cell and tissue types, TGF β 1 is involved in various biological functions including pluripotency, tissue morphogenesis, cellular differentiation and regeneration⁴⁹. As a crucial cytokine of tissue homeostasis, TGF β misregulations are involved in many pathologies such as cancer, fibrosis, asthma, infections and inflammatory diseases. More specifically, TGF β 1, the most abundant TGF β isoform, plays complex roles in the gut immune response regulation⁵⁰.

Several studies highlighted the importance of TGF β 1 as a negative regulator of mucosal inflammatory responses and showed that defects in its expression or signalling lead to colitis^{4,9,13-15}. In human, *SMAD3* an intracellular molecule involved in the TGF β signalling pathway is among the loci associated with high IBD susceptibility^{22,51}. Moreover, defective TGF β 1 signalling in IBD patients has been associated with high *SMAD7* expression, an inhibitor of *SMAD2/3* phosphorylation. *SMAD7* deleterious effects can be reversed by treatment with a *SMAD7* antisense nucleotide¹³⁻¹⁵. Many studies demonstrated the involvement of gut microbiota in the development of the local and systemic immune system notably by the modification of regulatory T cell (Treg) differentiation^{4,6-9}. In the gut, dendritic cells (DC) and intestinal epithelial cells (IECs) are the major cellular sources of TGF β 1 induced by the microbiota that is essential for the generation of Treg cells^{4,9,17,20}. Although IECs are not the main TGF β 1 producers *per se*, yet they are an important source of this cytokine when considering the huge number of cells they represent in the gut¹⁹. Moreover, IECs are at the interface between the microbiota and the *lamina propria* and are thus more likely to be influenced by commensal bacteria in particular in making the gut a TGF β 1-rich environment^{17,52}.

Here, we demonstrated that, amongst the microbial metabolites produced by the commensal bacteria tested, short chain fatty acids (SCFAs), and more specifically butyrate, had a major impact on human *TGFBI* expression in IECs (Figure 1). We showed that physiological concentrations of butyrate up-regulated the expression of *TGFBI* in HT-29 (Figure 2). Our findings confirmed previous studies showing that butyrate is a potent *TGFBI* inducer in diverse cell types including IECs^{4,53-55}. We investigated the mechanism of butyrate-driven *TGFBI* induction. In assays using GPRs ligands, G-protein sub-units inhibitors and GPR over-expression, we established that butyrate impact on *TGFBI* was independent of GPR43, GPR41 and GPR109a. Similarly, inhibition of the MCT1 transporter did not abrogate butyrate effect, pointing out that butyrate uptake by MCT1 was dispensable (Figure 3). Yet, MCT1 belongs to a large family of transporter (MCTs) mediating monocarboxylate uptake from gut lumen to cell cytoplasm. Among MCTs, MCT1 is the most expressed in the human large intestine but we cannot exclude that other expressed isoforms such as MCT4 may be involved in butyrate transport^{56,57}. It is also possible that butyrate enters the cell *via* passive transport or diffusion^{31,32,56,57}. SCFAs, particularly butyrate, impact the host biological responses by the direct regulation of gene transcription *via* their properties of histone deacetylase inhibitors (HDACi) that consequently favours acetylation of histones^{5,34,35,58}. We demonstrate that two HDAC inhibitors structurally and metabolically unrelated to SCFAs were inducing *TGFBI* expression similarly to butyrate. Thus it is likely that the butyrate-induced *TGFBI* up-regulation was a consequence of its HDAC inhibitory properties. To our knowledge up-regulation of *TGFBI* expression by HDACi has never been reported, especially in IECs.

Regulation of gene transcription by HDACi involves a wide range of transcription factors that can bind *TGFBI* promoter and that includes NF- κ B, AP-1 and SP1^{40,42-45}. Several responsive elements of these transcription factors were shown to be involved in *TGFBI* induction by different stimuli. Indeed, it has been described that immune signals such as IL1 β , TNF α and Toll-like receptors ligands can activate *TGFBI* transcription through NF- κ B activation^{9,48}. Two AP-1 motifs were shown to be functional in hepatic and mesangial cells and confirmed in our study by using phorbol ester^{46,47,59}(Supplementary Figure 4). Moreover, previous publications demonstrated that the Specific protein 1 (SP1) binding motifs are particularly enriched in *TGFBI* promoter and that one of them modulates *TGFBI* expression in various models, at steady state and upon infection. We investigated the role of these transcription factors in *TGFBI* up-regulation by butyrate. NF- κ B and AP-1 inhibitors did not impact on butyrate-driven up-regulation of *TGFBI* suggesting that these two transcription factors were not involved. These results were confirmed by the fact that butyrate did not activate a NF- κ B reporter system in HT-29 and that a *TGFBI* promoter construct mutated for the 2 functional AP-1 motifs responded to butyrate similarly to the wild-type *TGFBI* promoter. *TGFBI* promoter has a high number of GC-rich motifs that are potential targets for the transcription factors SP1 and SP3. By using a SP1/SP3 inhibitor and inhibiting SP1 expression by siRNA, we showed a pivotal role of SP1 in the butyrate and HDACi induction of *TGFBI* expression (Figure 6 and Supplementary Figure 3B). Furthermore by mutating the functional SP1 motif in the core promoter of *TGFBI* (*TGF*_{-453/+11SP1}) neither butyrate nor HDACi were able to modulate *TGFBI* expression anymore. This result confirmed that butyrate was enhancing *TGFBI* transcription via SP1 binding on the core promoter. Eventually we confirmed that SP1 binding to *TGFBI* promoter was also essential for bacterial supernatant mediated induction of *TGFBI*.

Recently, Yoshimori's group demonstrated that *Clostridium butyricum* increases TGFBI via a specific mechanism involving Toll-like receptor-2 (TLR2)-dependent signalling and a SMAD auto-induction loop in dendritic cells (DC) present in the *lamina propria*⁹. This TLR2-dependent generation of tolerogenic DC favours regulatory T-cells induction which is similar to what was reported for *Bacteroides fragilis* suggesting a more general mechanism used by several commensal bacteria^{60,61}. Kenya Honda's laboratory also reported that a mixture of *Clostridiales* bacteria from phylogenetic clusters IV and XIVa is sufficient to restore colonic Treg in germ-free mice and this phenotype was dependent on the TGFBI produced by IECs^{4,21}. Strikingly, the immunosuppressive property of these *Clostridiales* was independent of several known bacterial associated pattern recognition receptors-related signalling pathways such as MYD88 and was related to SCFA production suggesting a mechanism independent to the pathway reported by Yoshimura's group. From these results, it can be hypothesized that *TGFBI* gene expression can be regulated by cell-type specific transcription factors and signalling pathways.

Here, we describe for the first time the mechanism by which the butyrate-producer of the gut microbiota impacts on the *TGFBI* gene regulation in intestinal epithelial cells that implicates HDACi and the transcription factor SP1. Long co-evolution of microbiota and host cells appears to have resulted in multiple mechanisms to increase *TGFBI* expression by IECs and DCs with an overlapping finality, the generation of protective Tregs. Our study supports this hypothesis and contributes to the understanding of the mechanisms developed by the gut microbiota and especially butyrate-producing bacteria to promote local and systemic immune tolerance.

Materials and methods

Cell Culture

The human epithelial cell lines HT-29 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). HT29 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin, 50 U/mL streptomycin in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. All culture media and supplements were supplied by Sigma-Aldrich. Mycoplasma contamination was regularly tested using MycoAlert (Lonza) and Plasmotest (Invivogen).

Plasmids and reporter cell-lines

A 3.2Kb (-1864/+1370 section, TGF_{prom} and a 1.3Kb (-1362/+11 section, TGF_{-1362/+11}) of the human TGFβ1 promoter were cloned into the pGL4.14 (Promega) luciferase plasmid. The TGF_{-453/+11} construct and its derived mutants (TGF_{-453/+11SP1} and TGF_{-453/+11AP1}) were a kind gift of C. Weigert and transferred into pGL4.14 backbone⁴⁶. These constructs were used to establishing the stable HT-29-TGF_{-2688/+528}, HT-29-TGF_{-1362/+11}, HT-29-TGF_{-453/+11}, HT-29-TGF_{-453/+11SP1} and HT-29-TGF_{-453/+11AP1} reporter cell-lines after antibiotic selection (hygromycin, 600 μg/mL, InvivoGen). HT-29-NFκB cell line was stably transfected with pNiFty2-SEAP (Invivogen) and has been describe previously²⁵.

Human *Ffar2* (GPR43) and *Hcar2* (GPR109a) were cloned after EcoRI and XhoI digestion in pCMV-eGFP-N1 vector (Addgene). Oligonucleotides used for amplification of *FFAR2* were *aaaactcgagatgctgccgactggaa* and *aaaagaattctactctgtagtagaagtccga*. Oligonucleotides used for amplification of *HCAR2* were *aaaactcgagatgaatcggcaccatctgcaggat* and *aaaagaattcttaaggagaggttgggccaga*.

Luciferase Reporter and cell viability Assays

For each experiment, cells were seeded at 3.10⁴ cells per well in 96-well plates 24 h prior to incubation with bacterial supernatants or reagents. The cells were stimulated for 24 h with bacterial supernatants, SCFA or controls (TNFα, IL1β, PMA and RPMI) in a total culture volume of 100 μL per well prior to the luciferase assay. The luciferase activity was quantified as relative luminescence units by a microplate reader (Infinite200, Tecan) and the Neolite Luminescence Reporter Assay System (Perkin-Elmer) according to the manufacturer's instructions. Secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) was revealed with the Quanti-Blue reagent (Invivogen) using microplate reader (655nm Infinite 200, Tecan). The *TGFBI* and NF-κB activities were normalized to the controls, i.e., the unstimulated cells or cells in presence of non-inoculated bacteria culture medium. Experiments were performed in triplicates for at least three independent assays. Cell viability was monitored by MTS measurement using the CellTiter 96 Aqueous One solution (Promega) according to the manufacturer's recommendations.

Culture of commensal Strains, preparation of bacterial supernatants and SCFA concentration assessment.

135 human intestinal commensal bacterial strains which include 111 different species from the in-house INRA-Micalis collection or from DSMZ were grown. Anaerobic culture conditions were done using the Hungate method⁶². Screened species and strains, corresponding growth media, optical densities (OD), short chain fatty acids (SCFAs) concentrations are listed in Supplementary Table 1. Composition of home-made growth media is listed in Supplementary Table 1. Bacterial cultures were cultured to reach the maximum OD and centrifuged at 3,000 g for

10 to 20 min. Cultures were controlled using Gram staining method, aerobic growth test and fresh observation on microscope. Bacterial supernatants were then collected and filtered on a 0.22µm PES filters and conserved at -80°C. Non-inoculated bacteria culture medium served as control. Concentrations of SCFAs produced by cultured bacteria were measured by HPLC and gas chromatography as described^{63,64}.

ELISA

HT-29 cells were seeded at 1×10^6 cells per well in 6 well-plates 24h prior incubation with Serum-free medium and drugs. Supernatants were collected 24h later and immediately assessed by ELISA following manufacturer instructions using the TGFβ1 DuoSet kit (R&D systems).

Reagents and cytokines

All agonists, drugs and inhibitors were dissolved in glycerol, DMSO or water following the manufacturer's recommendations. SCFAs were from Sigma-Aldrich and used in a range of concentrations from 0.5 to 8mM. GPRs agonists used were: GPR41: 4-CMTB (1µM, Tocris 4642) and Tiglic acid (1-10mM, Sigma); GPR43: AR420626 (1µM, Cayman) and MCPC (1mM, Sigma); GPR109a: Niacine (1mM-10mM, Sigma) and MK1903 (1µM, Tocris). GPRs sub-unit inhibitors used were: Pertussis toxin (Ptx, 0.2µg/ml, Sigma) and U73122 (Sigma 10 µM). MCT inhibitors used were: AR-C155858 (0.4µM, Tocris), p-Chloromercuribenzoate acid (pCMB, 100µM, Sigma). HDAC inhibitors used were: Trichostatin A (TSA, 1µM, Sigma), SAHA (5µM, Sigma). SP1 competitive inhibitor used was the Mithramycin A (0.1µM) from Sigma. IL1β (10ng/ml) and TNFα (10ng/ml) were from Peprotech. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100nM) was from Sigma.

siRNA assays

4.10^5 HT29- TGF_{-2688/+528} cells were seeded in 12-well plates and transient transfections were done on day 2 and day with 2.5µL of DharmaFECT 1 (Dharmacon) and 25nM of ON-TARGETplus smart Pool siRNA SP1 (L-026959-00-0005, NM_001251825.1) or Negative Control (D-001810-10-05). On day 4 cells were plated to 2.10^3 on 96 wells, on day 5 incubation with reagents was done and incubated for an additional 24h prior luciferase activity measurement.

Real-Time PCR

HT-29 cells were seeded in 6 well culture plates at densities of 1.10^6 per well 24h before stimulation and total RNA was extracted using RNeasy mini-Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations with Dnase I treatment (R&D). cDNA was synthesized from 2µg of RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and 100ng were used to conduct qPCRs on ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) or StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFischer Scientific). The following Taqman Gene expression assay probes were used: *GAPDH* Hs02758991_g1, *GPR43* Hs00271142_s1, *GPR41* Hs02519193_g1, *GPR109a* Hs02341584_s1, *SMCT1* Hs00377618_m1, and *MCT1* Hs01585687_m1. *GAPDH* was used for normalization. Samples were tested in experimental duplicates and at least biological triplicates.

Promoter analysis

To search for potential transcription factor binding sites on HT-29-TGF_{-2688/+528}, we used the MatInspector software tool (Genomatix, Munich, Germany) and Jaspar database.

Statistical analysis and Graphics

Data were analysed using R and RStudio software. PCA analysis was done with prcomp package and correlation matrix was done with Hmisc package. Graphics were produced with ggplot2 package. Statistical test used were two-tailed, T test or Wilcoxon rank test on medians with a confidence level of 95 %. P value: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, NS: non-significant. Data come from at least 3 independent biological experimentations.

References:

- 1 Gaboriau-Routhiau, V. *et al.* The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* **31**, 677-689, doi:10.1016/j.immuni.2009.08.020 (2009).
- 2 Ivanov, II *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498 (2009).
- 3 Atarashi, K. *et al.* Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* **163**, 367-380, doi:10.1016/j.cell.2015.08.058 (2015).
- 4 Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337-341 (2011).
- 5 Schilderink, R., Verseijden, C. & de Jonge, W. J. Dietary inhibitors of histone deacetylases in intestinal immunity and homeostasis. *Frontiers in immunology* **4**, 226, doi:10.3389/fimmu.2013.00226 (2013).
- 6 Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446-450, doi:10.1038/nature12721 (2013).
- 7 Smith, P. M. *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341**, 569-573, doi:10.1126/science.1241165 (2013).
- 8 Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, 451-455, doi:10.1038/nature12726 (2013).
- 9 Kashiwagi, I. *et al.* Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF-beta Autoinduction in Clostridium butyricum-Activated Dendritic Cells. *Immunity* **43**, 65-79, doi:10.1016/j.immuni.2015.06.010 (2015).
- 10 Frank, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13780-13785 (2007).
- 11 Sokol, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16731-16736 (2008).
- 12 Sokol, H. *et al.* Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases* **15**, 1183-1189 (2009).
- 13 Marafini, I., Zorzi, F., Codazza, S., Pallone, F. & Monteleone, G. TGF-Beta signaling manipulation as potential therapy for IBD. *Curr Drug Targets* **14**, 1400-1404 (2013).
- 14 Ardizzone, S., Bevivino, G. & Monteleone, G. Mongersen, an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in patients with active Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol* **9**, 527-532, doi:10.1177/1756283X16636781 (2016).
- 15 Monteleone, G. *et al.* Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation* **108**, 601-609, doi:10.1172/JCI12821 (2001).
- 16 Andoh, A. *et al.* Faecal microbiota profile of Crohn's disease determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Aliment Pharmacol Ther* **29**, 75-82 (2009).
- 17 Iliev, I. D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M. & Rescigno, M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal immunology* **2**, 340-350 (2009).

- 18 Iliev, I. D. *et al.* Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic
dendritic cells. *Gut* **58**, 1481-1489 (2009).
- 19 Di Sabatino, A. *et al.* Blockade of transforming growth factor beta upregulates T-box transcription
factor T-bet, and increases T helper cell type 1 cytokine and matrix metalloproteinase-3
production in the human gut mucosa. *Gut* **57**, 605-612, doi:10.1136/gut.2007.130922 (2008).
- 20 Geuking, M. B. *et al.* Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell
responses. *Immunity* **34**, 794-806 (2011).
- 21 Atarashi, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the
human microbiota. *Nature* **500**, 232-236, doi:10.1038/nature12331 (2013).
- 22 Li, M. O. & Flavell, R. A. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* **134**, 392-404,
doi:10.1016/j.cell.2008.07.025 (2008).
- 23 Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.
Nature **464**, 59-65 (2010).
- 24 Mazmanian, S. K., Round, J. L. & Kasper, D. L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal
inflammatory disease. *Nature* **453**, 620-625 (2008).
- 25 Lakhdari, O. *et al.* Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher
microbiota-driven NF-kappaB modulation in the human gut. *PLoS one* **5** (2010).
- 26 Cohen, L. J. *et al.* Functional metagenomic discovery of bacterial effectors in the human
microbiome and isolation of commendamide, a GPCR G2A/132 agonist. *Proceedings of the
National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E4825-4834,
doi:10.1073/pnas.1508737112 (2015).
- 27 Vital, M., Howe, A. C. & Tiedje, J. M. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by
analyzing (meta)genomic data. *mBio* **5**, e00889, doi:10.1128/mBio.00889-14 (2014).
- 28 Le Poul, E. *et al.* Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and
their role in polymorphonuclear cell activation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 25481-
25489, doi:10.1074/jbc.M301403200 (2003).
- 29 Brown, A. J. *et al.* The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by
propionate and other short chain carboxylic acids. *The Journal of biological chemistry* **278**,
11312-11319, doi:10.1074/jbc.M211609200 (2003).
- 30 Thangaraju, M. *et al.* GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation
product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res* **69**, 2826-2832,
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4466 (2009).
- 31 Cuff, M., Dyer, J., Jones, M. & Shirazi-Beechey, S. The human colonic monocarboxylate
transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis. *Gastroenterology*
128, 676-686 (2005).
- 32 Thibault, R. *et al.* Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a
transport deficiency. *Inflammatory bowel diseases* **16**, 684-695, doi:10.1002/ibd.21108 (2010).
- 33 Dokmanovic, M., Clarke, C. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitors: overview and
perspectives. *Mol Cancer Res* **5**, 981-989, doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0324 (2007).
- 34 Candido, E. P., Reeves, R. & Davie, J. R. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in
cultured cells. *Cell* **14**, 105-113 (1978).
- 35 Sealy, L. & Chalkley, R. The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* **14**, 115-121
(1978).
- 36 Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M. & Steinkuhler, C. HDACs, histone
deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* **17**,
195-211, doi:10.1038/sj.cr.7310149 (2007).
- 37 Kim, S. J. *et al.* Activation of the second promoter of the transforming growth factor-beta 1 gene
by transforming growth factor-beta 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences.
The Journal of biological chemistry **264**, 19373-19378 (1989).
- 38 Kim, S. J., Glick, A., Sporn, M. B. & Roberts, A. B. Characterization of the promoter region of
the human transforming growth factor-beta 1 gene. *The Journal of biological chemistry* **264**, 402-
408 (1989).

- 39 Geiser, A. G. *et al.* Regulation of the transforming growth factor-beta 1 and -beta 3 promoters by transcription factor Sp1. *Gene* **129**, 223-228 (1993).
- 40 Davie, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **133**, 2485S-2493S (2003).
- 41 Nakano, K. *et al.* Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *The Journal of biological chemistry* **272**, 22199-22206 (1997).
- 42 Nepelska, M. *et al.* Butyrate produced by commensal bacteria potentiates phorbol esters induced AP-1 response in human intestinal epithelial cells. *PLoS one* **7**, e52869, doi:10.1371/journal.pone.0052869 (2012).
- 43 Yu, D. C., Waby, J. S., Chirakkal, H., Staton, C. A. & Corfe, B. M. Butyrate suppresses expression of neuropilin I in colorectal cell lines through inhibition of Sp1 transactivation. *Mol Cancer* **9**, 276, doi:10.1186/1476-4598-9-276 (2010).
- 44 Thakur, B. K., Dasgupta, N., Ta, A. & Das, S. Physiological TLR5 expression in the intestine is regulated by differential DNA binding of Sp1/Sp3 through simultaneous Sp1 dephosphorylation and Sp3 phosphorylation by two different PKC isoforms. *Nucleic Acids Res* **44**, 5658-5672, doi:10.1093/nar/gkw189 (2016).
- 45 Inan, M. S. *et al.* The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118**, 724-734 (2000).
- 46 Weigert, C. *et al.* AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF-beta1 promoter in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **11**, 2007-2016 (2000).
- 47 Presser, L. D., McRae, S. & Waris, G. Activation of TGF-beta1 promoter by hepatitis C virus-induced AP-1 and Sp1: role of TGF-beta1 in hepatic stellate cell activation and invasion. *PLoS one* **8**, e56367, doi:10.1371/journal.pone.0056367 (2013).
- 48 Lee, K. Y. *et al.* NF-kappaB and activator protein 1 response elements and the role of histone modifications in IL-1beta-induced TGF-beta1 gene transcription. *Journal of immunology* **176**, 603-615 (2006).
- 49 Weiss, A. & Attisano, L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **2**, 47-63, doi:10.1002/wdev.86 (2013).
- 50 Ihara, S., Hirata, Y. & Koike, K. TGF-beta in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J Gastroenterol*, doi:10.1007/s00535-017-1350-1 (2017).
- 51 Lees, C. W., Barrett, J. C., Parkes, M. & Satsangi, J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* **60**, 1739-1753, doi:10.1136/gut.2009.199679 (2011).
- 52 Kagnoff, M. F. The intestinal epithelium is an integral component of a communications network. *The Journal of clinical investigation* **124**, 2841-2843, doi:10.1172/JCI75225 (2014).
- 53 Staiano-Coico, L. *et al.* TGF-alpha and TGF-beta expression during sodium-N-butyrate-induced differentiation of human keratinocytes: evidence for subpopulation-specific up-regulation of TGF-beta mRNA in suprabasal cells. *Exp Cell Res* **191**, 286-291 (1990).
- 54 Nathan, D. F., Burkhart, S. R. & Morin, M. J. Increased cell surface EGF receptor expression during the butyrate-induced differentiation of human HCT-116 colon tumor cell clones. *Exp Cell Res* **190**, 76-84 (1990).
- 55 Schroder, O., Hess, S., Caspary, W. F. & Stein, J. Mediation of differentiating effects of butyrate on the intestinal cell line Caco-2 by transforming growth factor-beta 1. *Eur J Nutr* **38**, 45-50 (1999).
- 56 Gill, R. K. *et al.* Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C846-852, doi:10.1152/ajpcell.00112.2005 (2005).
- 57 Hadjiagapiou, C., Schmidt, L., Dudeja, P. K., Layden, T. J. & Ramaswamy, K. Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **279**, G775-780 (2000).

- 58 Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. T., Archer, S. Y. & Hodin, R. A. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* **132**, 1012-1017 (2002).
- 59 Birchenall-Roberts, M. C. *et al.* Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by v-src gene products is mediated through the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* **10**, 4978-4983 (1990).
- 60 Round, J. L. *et al.* The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* **332**, 974-977 (2011).
- 61 Round, J. L. & Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 12204-12209 (2010).
- 62 Hungate, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev* **14**, 1-49 (1950).
- 63 Lakhdari, O. *et al.* Identification of NF-kappaB modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 282356, doi:10.1155/2011/282356 (2011).
- 64 Bourriaud, C. *et al.* Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol* **99**, 201-212, doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02605.x (2005).
- 65 Derynck, R. *et al.* Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**, 701-705 (1985).
- 66 Shah, R., Rahaman, B., Hurley, C. K. & Posch, P. E. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. *Hum Genet* **119**, 61-74, doi:10.1007/s00439-005-0112-y (2006).

Acknowledgements

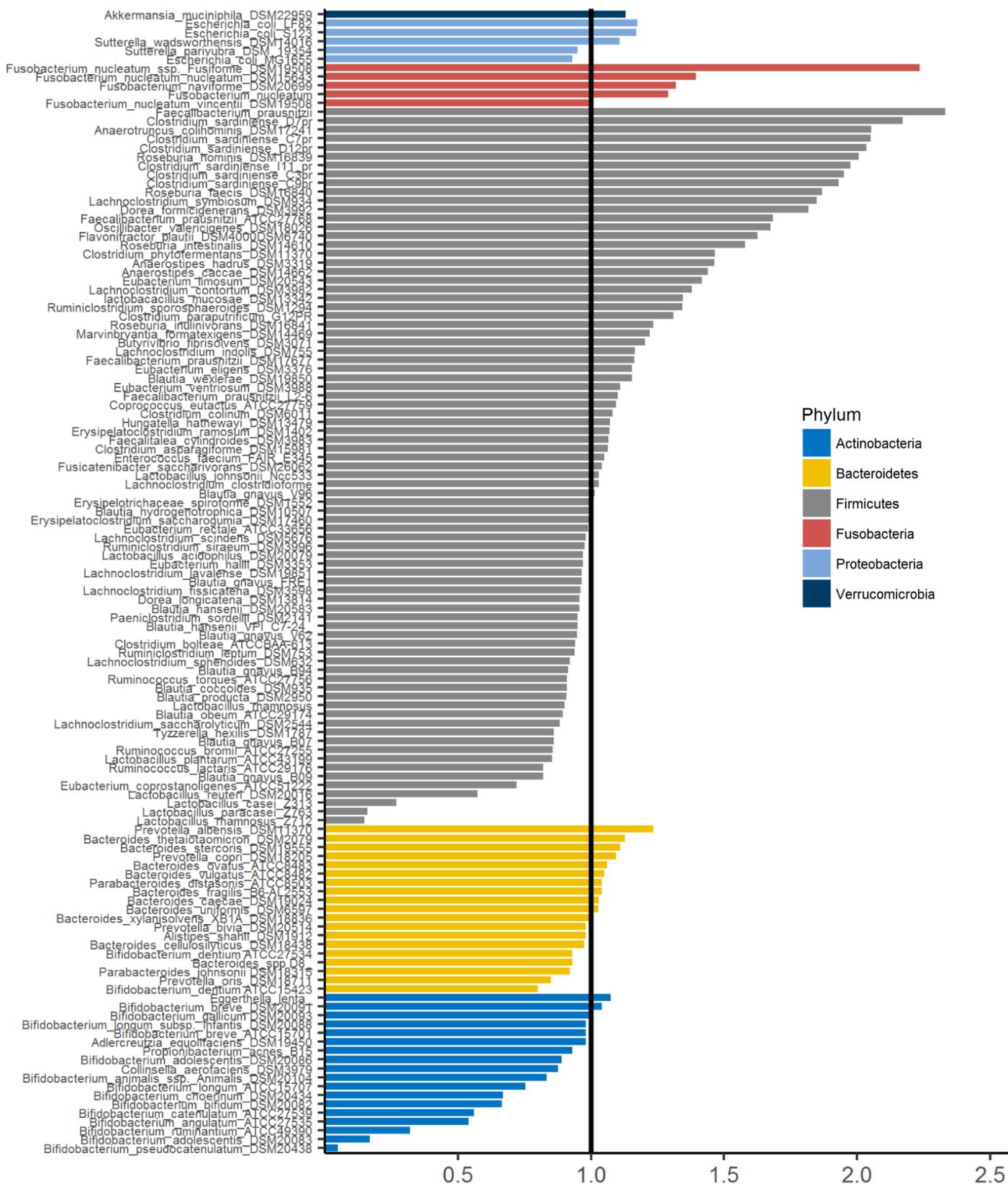
The authors are grateful to Drs Véronique Douard (INRA UMR1319) and Marion Espeli (INSERM UMR-S996) and Pierre Larraufie for helpful discussions and critical comments on the manuscript. The authors are grateful to members of the team for helpful discussions. The authors are grateful to Dr Cora Weigert (University of Tübingen) for sharing the TGF promoter constructs. This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), by grants funded by EU-FP7 METACARDIS (HEALTH-F4-2012-305312), by the ANR FunMetagen (ANR-11-BSV6-0013). CMG was the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Éducation Nationale (Sorbonne Université).

Authors Contribution

Conceived and designed the experiments: CMG, NL; performed most of the experiments: CMG; performed some experiments: FBC, LM, AG, FL, AJ, NL; analysed the data: CMG, NL; wrote the paper: CMG, NL; edited and revised the manuscript: HMB.

Supplementary

Supplementary figure 1:



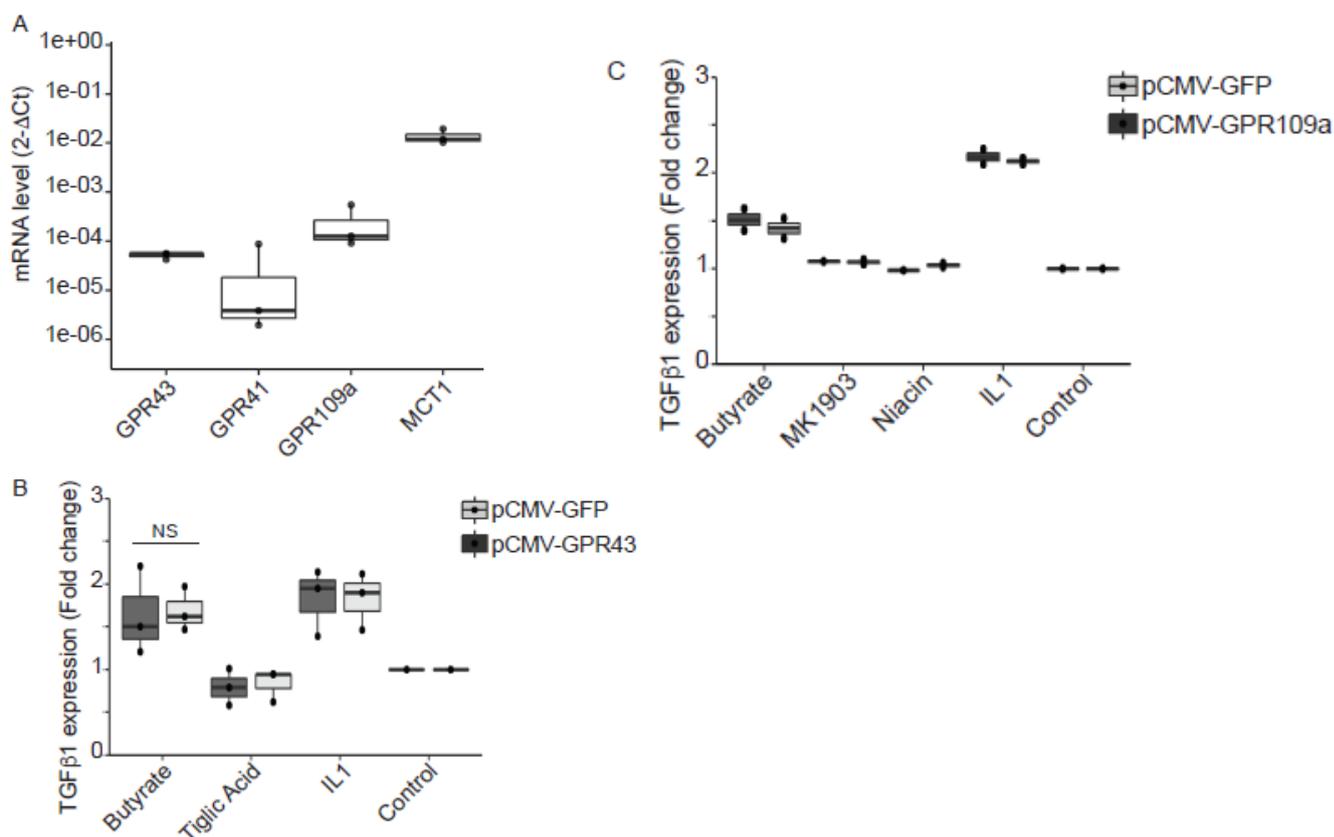
Impact of commensal bacteria on *TGFBI* expression in HT-29.

Culture supernatants of a wide range of cultivable commensal bacteria were applied on the HT-29-TGF_{prom} reporter system (10% vol/vol). *TGFBI* expression was measured by luciferase activity and expressed as fold change

towards its control: bacterial growth medium used in each experiment and for each bacterial culture. Dash lines draw upper and lower zones where *TGFB1* expression was considered as significantly changed. Actinobacteria in blue, Bacteroidetes in yellow, Firmicutes in grey, Fusobacteria in red and Verrucomicrobia in light blue.

Supplementary figure 2:

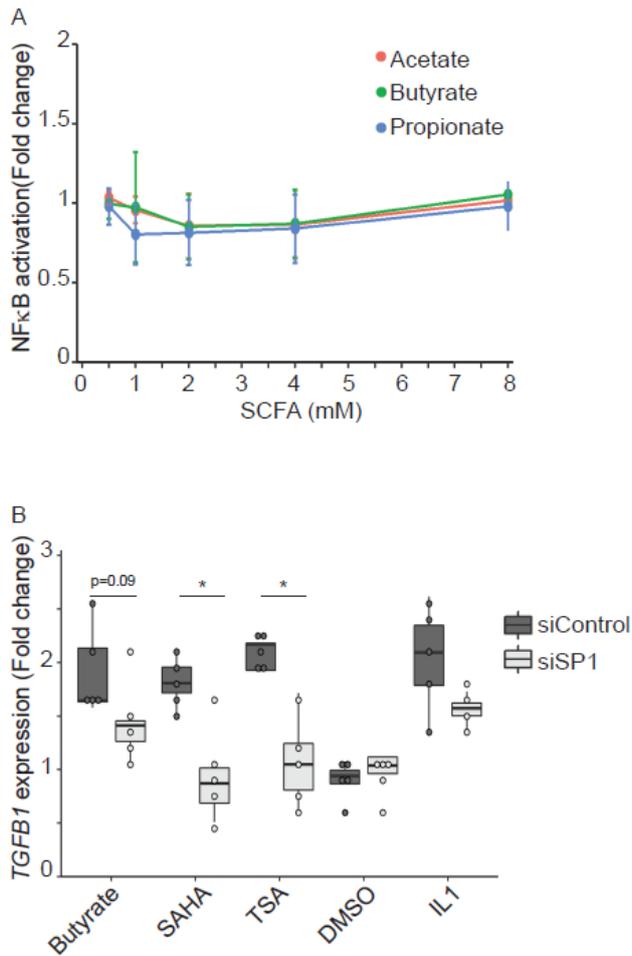
Butyrate mediated impact on *TGFB1* is independent of its receptors GPR41, GPR43, GPR109a. (A). Expression of the G-protein coupled receptors *GPR41*, *GPR43*, *GPR109a* and *MCT1* in HT-29. Gene expression was determined by quantitative real-time PCR on total RNA extracted from HT-29.



HT-29-TGF_{prom} reporter cells were transfected with pCMV-FFAR2 (GPR43), N=3 (B) and pCMV-HACR2, (GPR109a) N=2 (C) prior to the incubation for 24h with IL1 β (10ng/ml), butyrate (2mM) or with the GPR agonists (B) Tiglic acid (10mM) (C): Niacine (10mM) and MK1903 (1 μ M). *TGFB1* expression was measured by luciferase activity and expressed as median \pm quartiles of fold change towards un-stimulated cells, t-test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Supplementary Figure 3:

- (A) HT-29-NF κ B reporter cells were incubated for 24h with different concentrations of butyrate. NF- κ B activation was measured by SEAP secretion and expressed as fold increase towards un-stimulated cells, N=3.
- (B) HT-29-TGF_{prom} reporter cells were transfected with SP1 siRNA or control siRNA and incubated with butyrate (2mM), TSA (1 μ M), SAHA (5 μ M) or IL1 β (100U/ml) for 24h. *TGFB1* expression was measured by luciferase activity and expressed as median \pm quartiles of fold change towards un-stimulated cells. Wilcoxon test, N=5, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.



Supplementary Figure 4:

HT-29-TGF_{-453/+11} cells with double AP-1 mutations were treated with Butyrate (4mM), TSA (1μM), IL1β (10ng/ml) or PMA (100nM) for 24h. *TGFβ1* expression was measured by luciferase activity and expressed as median ± quartiles of fold change towards un-stimulated cells. Wilcoxon test, N=4, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

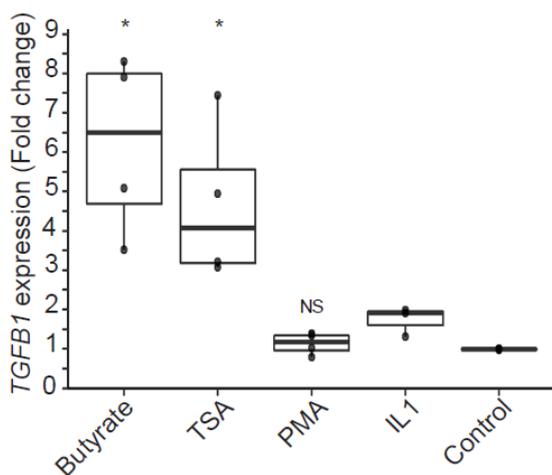


Table 1: Selection of transcription factor binding motifs in human TGFBI promoter including localisation of AP-1 and SP1 mutations.

Transcription Factor	Positions	Mutations	References
AP-1	-820; -418; -371; +159	-416/-415; -371/-370	Kim <i>et al.</i> , 1989, Lee <i>et al.</i> 2006, Weigert <i>et al.</i> 2000.
SP1	-236; -220; -120; -108; -79; -43; +175	-216/-215	Kim <i>et al.</i> , 1989, Lee <i>et al.</i> 2006, Weigert <i>et al.</i> 2000.
NF- κ B	-1267; -1174; +52		Lee <i>et al.</i> 2006.

Travaux non publiés : Importance de NFκB dans l'homéostasie intestinale

La troisième et dernière partie du travail expérimental concerne l'étude des capacités des bactéries du microbiote intestinal à réguler NFκB, indépendamment de la voie des TLR et de MYD88. En effet, les études ce sont principalement concentrées sur la reconnaissance des bactéries intestinales ou des molécules qu'elles libèrent dans le milieu extracellulaire, par des récepteurs TLR (Lakhdari et al., 2011; Round et al., 2011b). Les bactéries commensales, Gram+ et Gram-, sont la source d'un grand nombre de molécules nécessaires pour que le système immunitaire soit capable de répondre de manière différenciée aux organismes commensaux et aux pathogènes. De plus, la stimulation de NFκB par les bactéries favorise l'intégrité de la barrière intestinale ainsi que l'imperméabilité de la muqueuse. Les effets protecteurs de NFκB en réponse au microbiote ne sont pas uniquement dépendants des TLR ainsi que le montrent, par exemple, les travaux sur les récepteurs NOD1 (Philpott et al., 2014). De plus, le travail de Vlantis *et al* met en évidence un rôle protecteur dans un modèle de colite, de l'activation de NFκB par des bactéries, via des voies de signalisation encore non identifiées (Vlantis et al., 2015). Nous avons basé ce travail sur l'hypothèse qu'il reste à découvrir de nouveaux mécanismes d'activation de NFκB par le microbiote intestinale dans les cellules épithéliales.

Nous avons choisi de présenter l'ensemble du travail sur NFκB dans une ébauche d'article, bien qu'il soit envisagé de publier les différents volets séparément par la suite. Des expériences complémentaires sont en cours afin de confirmer les mécanismes mis au jour, de préciser leurs rôles dans la physiologie intestinale et d'aller plus loin dans la caractérisation des molécules bactériennes.

NFκB complex is a crucial player in the gut homeostasis

Introduction

The intestinal epithelial cells (IEC) are overlaying the intestinal mucosa and, constitute a physical and chemical interface with the gut lumen environment. Under the thick layer of mucus, colonocytes are confronted to a permanent and intense flux of a myriad of molecules produced by microorganisms. Firstly, exogenous signals are sensed by IECs that generate a cascade of cellular reaction, some of them modulating the mucosal immune system. The rich ecosystem of commensal organisms residing in the healthy colon exchange metabolic substrates and diverse compounds with the host. These relations of symbiosis are needed for the development, the education and the maintenance of the local and systemic immune system as well as the gut global homeostasis (Blander et al., 2017; Hooper et al., 2012). Gut microbiota is also essential to prevent opportunist pathogens to colonise this niche. These beneficial relationships are possible, thanks to the dual capacities of the host immune system to tolerate the microbiota and defends itself against pathogens (Messer et al., 2017). Since IECs are at the host-microbiota interface, they play a pivotal function in the balance of immune system toward the tolerance of microbes. Motifs recognition by PRR (Pattern recognition receptor) sets the cellular inflammatory or anti-inflammatory responses that are released to the immune environment (Marques and Boneca, 2011). Several studies using mice models have pointed out that IECs are a central gear in the delicate regulation of the immune system (Abreu, 2010; Hooper, 2015; Peterson and Artis, 2014).

As every healthy human intestine is the habitat of thousands of different species of bacteria, disentangling the role of specific genus or species is difficult when taken as a whole (Rajilić-Stojanović and de Vos, 2014). Reducing the complexity is a necessity to understand which bacterium is interacting with IECs and what is its impact on innate immune response. There are intrinsic limitations in this approach as in the gut, each commensal not only interact with the host by also with others microbes, yet starting with a very narrow view might help depicting a larger picture (Lagkouvardos et al., 2017). Thus, deciphering the molecular basis of host-microbes immune interactions may help to understand how changes in the gut microbiota composition can alleviate or worsen human diseases.

In the following work, we focused on the regulation of the NFκB complex on human IECs, a key actor of the innate immune response. This transcription factor controls the expression of a wide range of genes, involved in inflammatory responses, barrier functions, cell survival and proliferation after tissue damages. Hypo-activation and hyper-activation in IECs are both detrimental depending on the activation pathway and the context (Eckmann et al., 2008; Zaph et al., 2007; Zilberman-Rudenko et al., 2016). NFκB promotes intestinal homeostasis by inducing protecting cytokines, such as TSLP or TGFβ. Moreover, IKKγ/NEMO, one of the three main NFκB activator, is crucial to regulate the TNF-induced apoptosis in the gut (Vlantis et al., 2016). In parallel, the same group has pointed out that TRAF6 expression in IECs is necessary to protect mice during colitis from over-inflammation resulting from abnormal sensibility to the microbiota. Interestingly, microbial molecules triggered TRAF6 by a MYD88 and a TRIF-independent pathway suggesting that TLRs were not involved in the protecting effect (Vlantis et al., 2015). Thus, we evaluated the impact of molecules produced in the supernatants of a range of commensal bacteria on NFκB, with a special attention to the MYD88 and TLR independent pathways. In a healthy mucosa, the small diffusible compounds emitted by gut bacteria are thought to reach more easily the epithelium than whole bacterium and therefore are potential immune regulators. Until now this vast reservoir of bioactive compounds stays largely uncharacterised

(Donia and Fischbach, 2015). Herein we reported that the supernatant of Firmicutes, Fusobacteria and Verrucomicrobia phyla triggered NFκB activity in HT29 cell line. By siRNA, chemical inhibitor and CrispR/Cas9 mediated genes deletion on HEK and HT29 cell lines, we evidenced 3 groups of bacteria inducing NFκB by distinct pathways. The first group, formed by *Clostridiales* bacteria, was NOD1 dependent. In the second group, composed of *Fusobacterium*, NFκB activation was mediated by TIFA. Eventually, in the third group, *Akkermansia muciniphila* activity was dependent on both NOD1 and TIFA pathways. All together these finding suggest that *Fusobacterium* and *A. muciniphila* released molecules sharing common features with the bacterial metabolite heptose-1,7-bisphosphate (HBP) described to induced the formation of the TIFAsome complex. More investigations will be needed to further determine the chemical structure of the active compounds produced by these bacteria and the physiological impact of TIFA activation on IECs. To our knowledge, this is the first report of activation of the TIFA pathway by molecules derived from commensal bacteria supernatants.

Results and discussion

Soluble molecules from commensal bacteria induced NFκB activity in IECs

We screened over 400 bacterial supernatants on an NFκB reporter system in HT29 cell line, derived from 112 bacterial species. Within this selection, around 60% of the most prevalent species belonging to the human core microbiota was tested (44 of the 75 members) (Balzola et al., 2010). Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia were the most potent NFκB inducers in our settings (Figure 1A). None of the non-inoculated growth media had any activity on our report system.

Within the Gram⁺ Firmicutes phylum, only a dozen of species were increasing NFκB activity with a fold change >1.5. Firmicutes are one of the two major phyla of the gut microbiota. All the Fusobacteria supernatants were strong activators of NFκB. In addition, *Akkermansia muciniphila*, belonging to Verrucomicrobia induced a robust activity. Verrucomicrobia and Fusobacteria are minor phyla in the human gut microbiota, both are Gram⁻ bacteria. *Akkermansia muciniphila* being the only isolated species in the human gut, belonging to the Verrucomicrobia phylum. We tested few members of the Proteobacteria, as they are in very low abundance in a human healthy gut microbiota. *E. coli* strains supernatant demonstrated a strong activation of NFκB. Species belonging to Bacteroidetes (Gram⁻) and Actinobacteria (Gram⁺) were poor inducers of NFκB.

Interestingly, bacteria belonging to diverse phyla were triggering NFκB, suggesting either a unique highly conserved molecule express by various bacteria or several specific compounds. We observed that Proteobacteria and Firmicutes had diverse activities, ranging from no activity to potent stimulation (Figure 1B). Because of the heterogeneity, we hypothesised that several specific soluble compounds were accounting for enhancing NFκB.

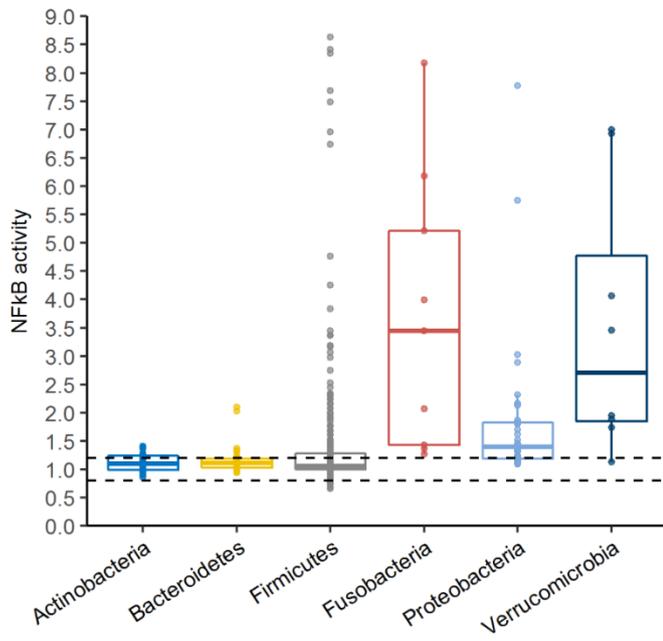
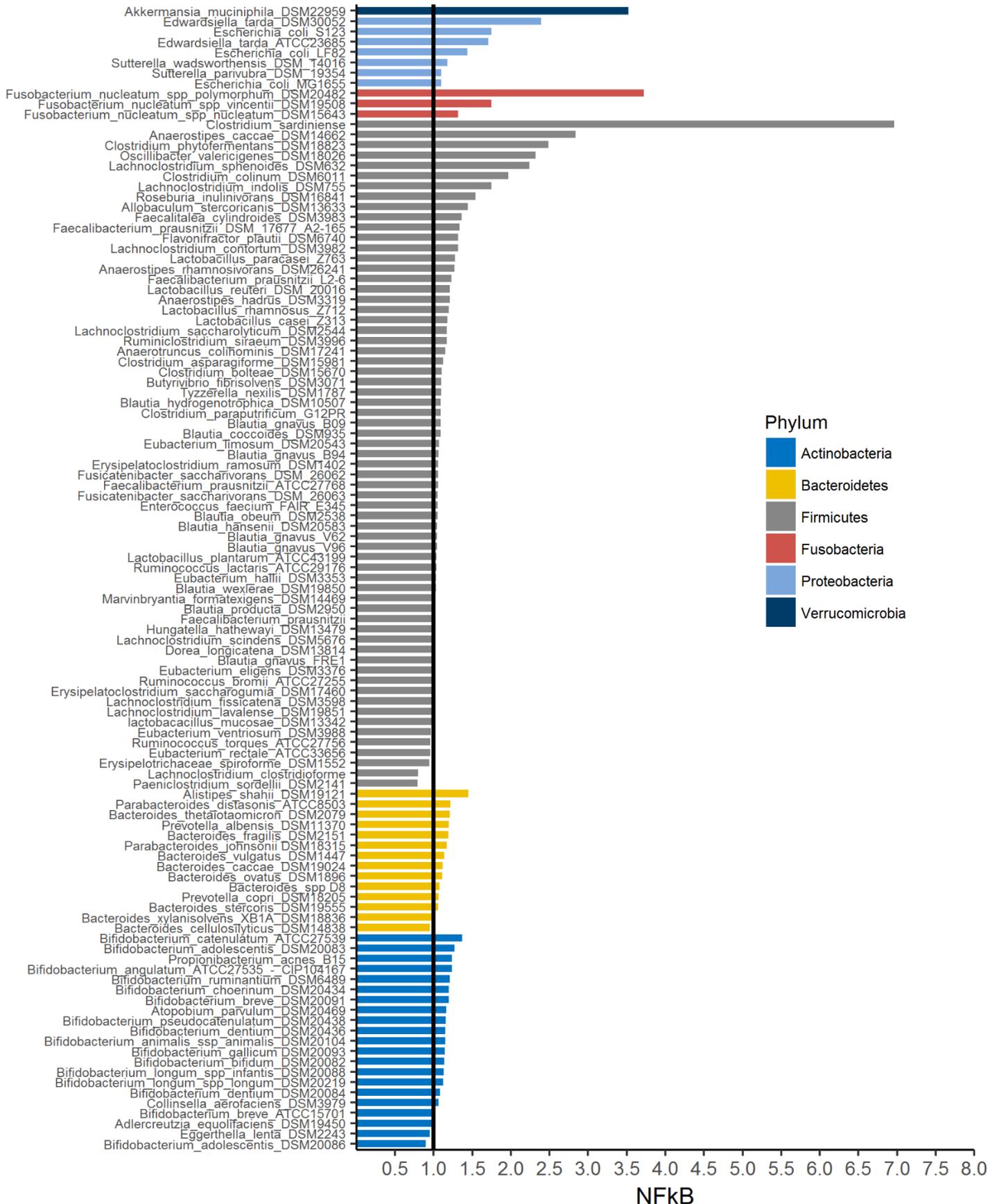


Figure 1A : NFκB activity on HT29 induced by bacterial supernatants 10% (vol/vol), order by phylum.

- medium blue Actinobacteria,
- yellow: Bacteroidetes
- grey : Firmicutes,
- red : Fusobacteria,
- light Blue : Proteobacteria
- dark blue : Verrucomicrobia.

Values below and above the dash lines were considered biologically relevant. Data are represented as median and IQR.

Figure 1B: Average NFκB activity on HT29, induced by bacterial species supernatant, order by phylum. In medium blue Actinobacteria, yellow: Bacteroidetes, grey: Firmicutes, red : Fusobacteria, light Blue : Proteobacteria, dark blue : Verrucomicrobia. Normalisation was set at 1 (Solid line).



Some human gut bacteria induce NFκB independently of TLRs and MYD88

TLRs activation by various agonists provokes low responses on NFκB-HT29 cells. Although HT29 cells express several surface and endosomal TLRs (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 and TLR9) NFκB is only induced by TLR3, TLR4 and TLR5 ligands. Furthermore, high concentration of flagellin (10μg.ml), recognised by TLR5, is needed to achieve a strong NFκB induction. High dose of TLR3 ligand (Poly(I:C)) and TLR4 ligand (LPS 10μg.ml) only induce weak NFκB activity on this cell line (Cario et al. 2000; Lakhdari et al. 2010, data not shown). To select bacterial species producing molecules inducing NFκB in a TLRs-independent manner, we screened the most potent HT29 activators on HEK cell line stably transfected with NFκB reporter system (Figure 2A). Indeed, HEK cells only express TLR5 and TLR3 (Hornung et al., 2002). In our settings, high dose of flagellin (10μg.ml) induced a fold change of ≈2 in NFκB activity (Data not shown). In NFκB-HEK cells, several species conserved the activity on NFκB although some of the previously selected species showed no more activity, such as *P. albensis*, *C. colinum* or *F. cylindroides*, suggesting a TLR-independent activity.

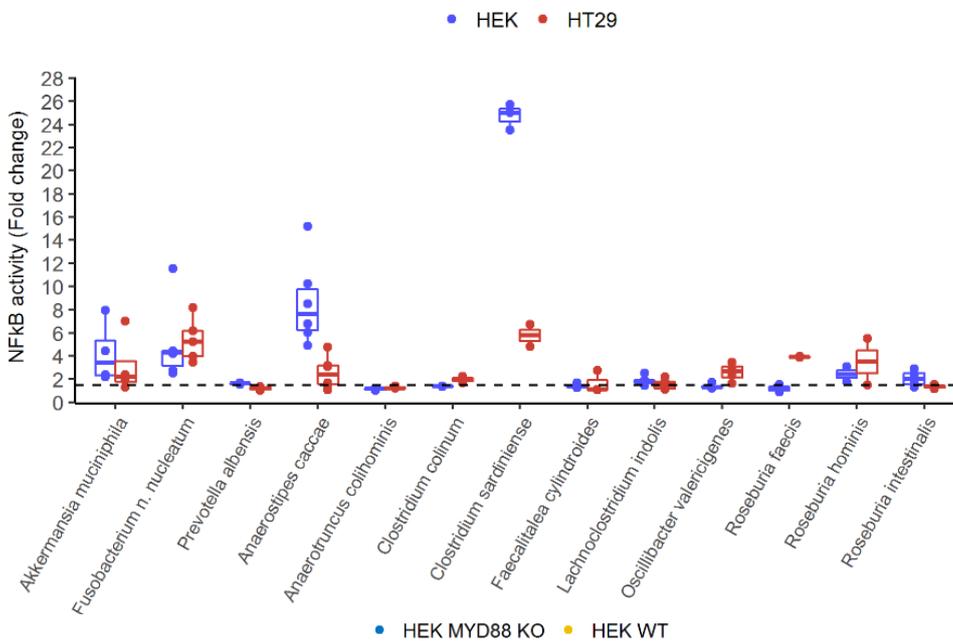


Figure 2A: Several commensal species induced NFκB in a TLRs-independent manner in NFκB-HT29 and NFκB-HEK cell lines.

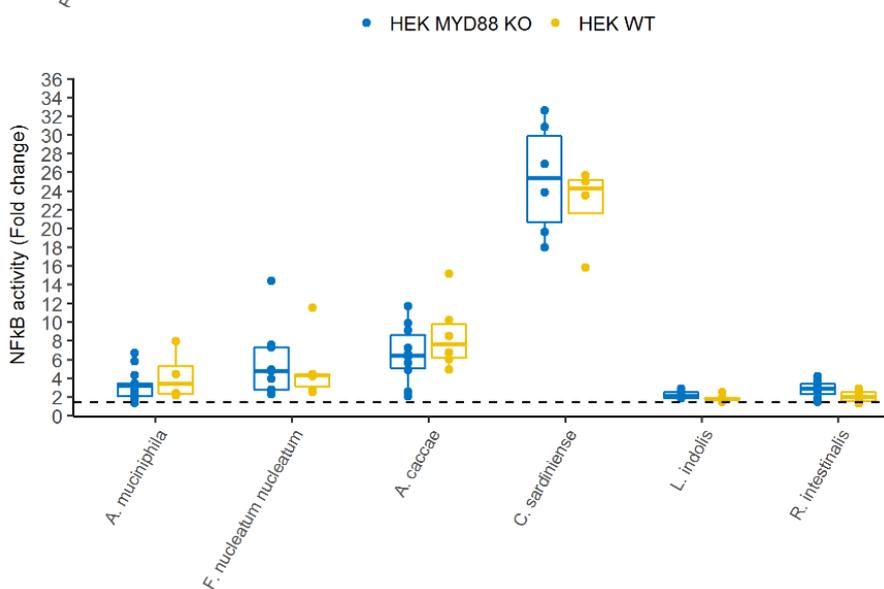


Figure 2B: Bacterial supernatant enhanced NFκB independently of MYD88 in NFκB-HEK.

Species considered as NFκB inducers are above 1.5 fold change (dash line) compared to unstimulated cells. Data are represented as median and IQR.

To further confirmed that bacterial supernatants could trigger NFκB in an MYD88 independent manner, a range of species: *A. muciniphila*, *F. nucleatum nucleatum*, *A. caccae*, *L. indolis*, *C. sardiniense*, and *R. intestinalis* were tested on a *MYD88* deficient NFκB-HEK reporter system (Figure 2B). In this setup, we could demonstrated that, MYD88 was dispensable for these species to promote NFκB.

Some commensal Gram⁺ bacteria promote NFκB via NOD1 activation

Several signalling pathways, independent of MYD88, are reported to induce NFκB, the most obvious exemple are the NODs receptors. HEK cells express NOD1 by not NOD2 (Barnich et al., 2005; Kim et al., 2004). Inquiring if the selected bacteria were stimulating NFκB via NOD1, we treated NFκB-HEK reporter cells with ML130, a NOD1

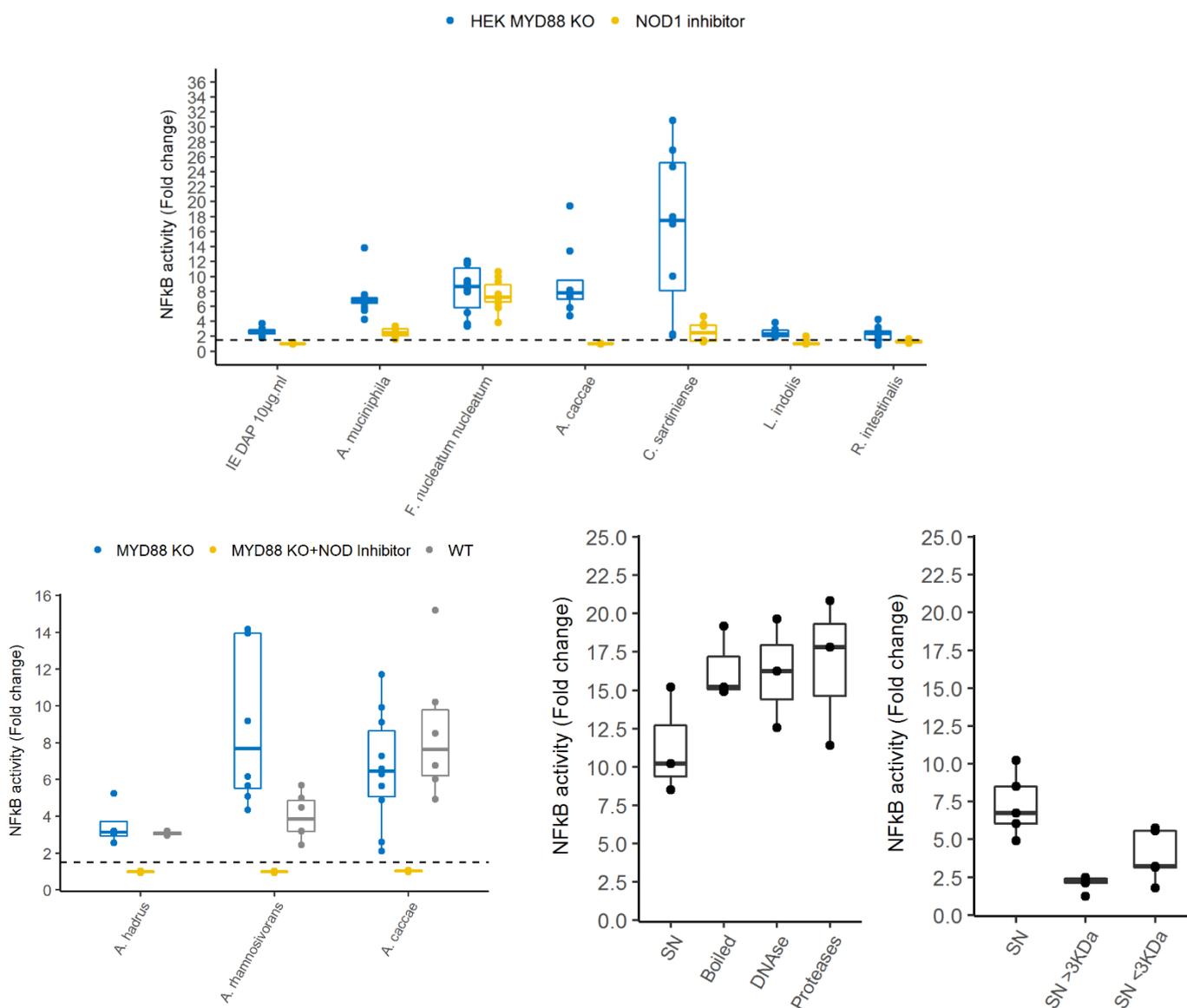


Figure 3A : Bacteria inducing NFκB in a NOD1 dependent and independent manner in HEK MYD88 Crispr cell line. Cells were incubated with ML130 10μM 1h prior adding bacterial supernatants.

Figure 3B: Anaerostipes bacteria share a common pattern of NFκB modulation via NOD1 receptor in NFκB HEK and HEK Myd88 KO cell lines. Cells were incubated with ML130 10μM 1h prior adding bacterial supernatants.

Figure 3C : *A. caccae* supernatants were treated for 2h at 37°C with Dnase I, Proteinase K and Tyrsin and boiled before incubation in NFκB HEK cell line.

Figure 3D : *A. caccae* supernatants were centrifuged on a 3kDa cut-off before incubation in NFκB HEK cell line.

Data are represented as median and IQR. Dash line is set at 1.5 fold change

inhibitor (Figure 3A). Co-incubation of bacterial supernatants with NOD1 inhibitor had a dramatic impact on all the Gram⁺ bacteria. *C. sardiniense*, *A. caccae*, *L. indolis* and *R. intestinalis* activities seemed to be entirely mediated by NOD1. These findings were interesting, as NOD1 is mostly described as a sensor of Gram⁻ bacteria peptidoglycan. *Akkermansia muciniphila* promoted NFκB partially by NOD1 activation as incubation with NOD1 inhibitor abolished partially this activation.

The second Gram⁻ bacterium, *F. nucleatum nucleatum* had a distinct profile, its activity on NFκB was both NOD1 and MYD88 independent. These data indicated that *F. nucleatum nucleatum* and *Akkermansia muciniphila* activities on NFκB may involve a second pathway, MYD88 independent and NOD independent.

In our model, supernatants from several *Clostridiales* stimulated NOD1 and therefore NFκB. These species represented two different branches of the *Clostridiales* order: *Anaerostipes caccae*, *Lachnoclostridium indolis* and *Roseburia intestinalis* belong to the *Lachnospiraceae* family /Cluster XIV while *Clostridium sardiniense* is a member of *Clostridium* genus /Cluster I *stricto sensu*. We next investigated if the NOD1 modulatory properties were restricted to these specific species or shared by a larger group. Two other species of the *Anaerostipes* genus, *A. hadrus* and *A. rhamnosivorans* were tested on our NFκB-HEK reporter system. The results indicated that activation of NFκB is a common property among this genus and that it was mediated by NOD1 (Figure 3B). Using enzymatic and heat shock assays we attempt to determine the nature of the molecules stimulating NFκB in the *A. caccae* supernatants (Figure 3C). Treatment of supernatants with Dnase I and proteases (Proteinase K and Trypsin) or boiling did not abolish stimulation on NFκB suggesting that the molecules were not nucleic acids, neither protein. Moreover, we could demonstrate that the compounds had a strong activity below 3kDa even though activity was present above this molecular weight cut-off (Figure 3D).

All together, these findings suggested that Gram⁺ supernatants contained NOD1 agonists promoting NFκB activity. It is unlikely that these ligands were peptidoglycan fragments as these bacteria are Gram⁺ and they are not described to produce *meso*-DAP. We could make the assumption the NOD1 pathway might be stimulated by alternative ligands. As the selected Gram⁺ bacteria produced short chain fatty acids (SCFA) we asked if the <3kDa activity was SCFA-dependent. However, incubation of NFκB-HEK or NFκB-HT29 reporter cells with a range of concentrations of acetate, butyrate, propionate, isobutyrate, isovalerate and valerate barely induced detectable NFκB activity. We are currently confirming the NOD1 involvement using siRNA on NFκB-HEK cell line, with a range of Gram⁺ supernatants. To disentangle the molecular pathway involved in the Gram⁺ bacteria activity we intend to perform more experimentations as discussed in the conclusion. Interestingly, only a part of *A. muciniphila* activity was abolished when inhibiting the NOD1 receptor, suggesting the existence of another pathway promoting NFκB.

Gram negative bacteria promote NFκB in an ALPK1, TIFA and TRAF6 dependent pathway

As shown in the Figure 3A, *A. muciniphila* and *F. n. nucleatum* were both enhancing NFκB activity, in a TLR, MYD88 and NOD1-independent manner. The TRAF6 ubiquitin ligase is a broadly expressed actor, downstream of various immunoregulators signals, such as TNF, Toll-like and IL1 receptor families as well as more recently TIFA (Walsh et al., 2015). We thus first questioned TRAF6 implication in the observed phenotype. Upon stimulation, TRAF6 goes through several modifications, oligomerisation, ubiquitination, and forms complexes with various proteins including NFκB activators. By using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats

(CRISPR)/Cas9-mediated method, *TRAF6* was knockout in NFκB-HEK reporter cell line. Incubation of *F. n. nucleatum* supernatants in NFκB-HEK *TRAF6* KO resulted in a dramatic decrease of NFκB activity (Fig 4A, Supplementary I) demonstrating that both species activities were TRAF6 dependent.

Recently a new pathway, MYD88 and NOD1-independent, leading to NFκB activation was described. Gray-Owen and colleagues have shown that several pathogenic bacteria stimulate the ALPK1 kinase and TIFA, which promotes TRAF6 activation (Gaudet et al., 2015, 2017; Milivojevic et al., 2017; Zimmermann et al., 2017). We thus investigated if TIFA mediated the *A. muciniphila* and *F. n. nucleatum* activities by knocking out *TIFA* in NFκB-HEK reporter cell line. Incubation of *F. n. nucleatum* supernatants in NFκB-HEK *TIFA* KO reporter system resulted in a dramatic decrease of NFκB activity. *A. muciniphila* activation was partially reduced as expected from the previous experiments showing that supernatant activity was also mediated by NOD1 (Figure 4B). We confirmed these results on HT29 by measuring NFκB activity (Figure 4C) and IL8 secretion by ELISA (Supplementary II), upon stimulation with supernatant on NFκB-HT29 *TIFA* KO reporter system and control cell line. These finding demonstrated that *F. n. nucleatum* supernatants activity on NFκB were TIFA-dependent and *Akkermansia muciniphila* supernatant was partially TIFA-dependent.

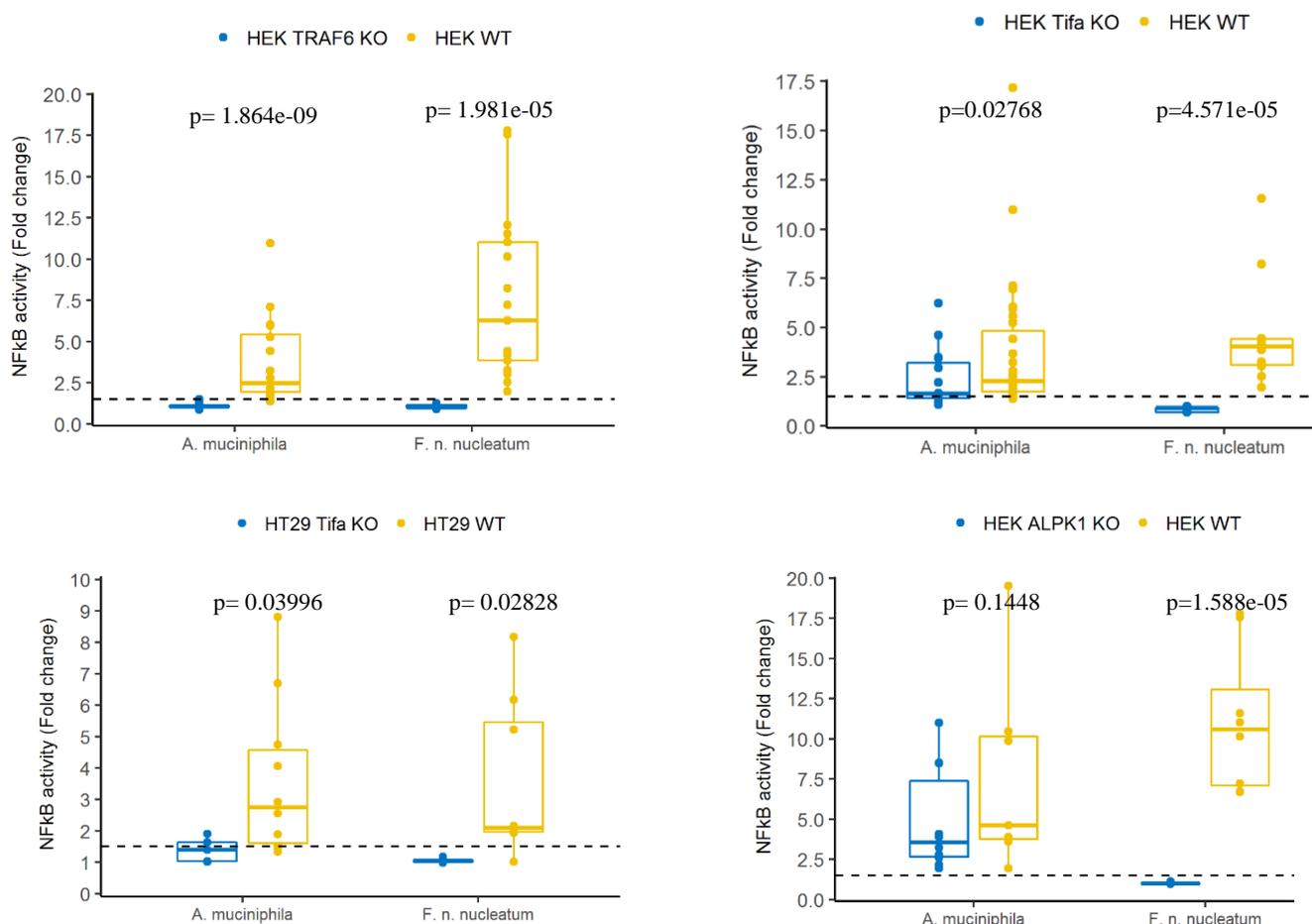


Figure 4: NFκB-HEK *TIFA* KO (A), NFκB-HEK *TIFA* KO (B), NFκB-HT29 *TIFA* (C) and NFκB-HEK *ALPK1* KO (D). Cells were incubated from 24h with *F. n. nucleatum* or *A. muciniphila* supernatants before reading NFκB activity. Dash line was set at 1.5 fold change. Results are expressed as medium ± quartiles. Wilcoxon rank sum test was performed toward WT cell line.

Several publications demonstrated that ALPK1 phosphorylation is driving TIFA activation (Gaudet et al., 2017; Milivojevic et al., 2017; Zimmermann et al., 2017). These works prompted us to investigate the role of ALPK1 in mediating NFκB activation by *Akkermansia* and *Fusobacterium* species. Incubation of supernatants on NFκB-HEK

ALPK1 KO reporter system indicated that *Fusobacterium n. nucleatum* stimulation was ALPK1 dependent (Figure 4C, Supplementary III). *Akkermansia muciniphila* promotion of NFκB showed a modest reduction when ALPK1 was depleted, which was not statistically significant, probably due to the strong activation variability between batches of supernatant. Altogether, these findings demonstrated that two Gram⁻ species residing in the human healthy gut produce molecules that activated the ALPK1-TIFA-TRAF6 pathway resulting in enhancing NFκB transcriptional activity.

To test the hypothesis that *Akkermansia muciniphila* induced NFκB via two non-overlapping pathways, NOD1 and TIFA, we inhibited NOD1 in the NFκB-HEK *TIFA* KO cell line and NFκB-HEK WT KO. Confirming our assumption, the remaining NFκB activity in *TIFA* KO cells, was abrogated when NOD1 was inhibited (Figure 5A). *Akkermansia muciniphila* is the only representative isolated species of Verrucomicrobia in the human gut however, several members of Fusobacteria phylum are present (Guo et al., 2017b). In addition to *Fusobacterium nucleatum nucleatum*, *Fusobacterium* species and *Fusobacterium nucleatum* subspecies have been reported in the gastrointestinal tract as well as in the oral cavity. Hence, we questioned if *F. nucleatum nucleatum* was the only member producing TIFA inducer. Indeed, all *Fusobacterium* members tested shared the capacity to act via TIFA. *F. naviforme*, *F. nucleatum vincentii*, *F. nucleatum polymorphum* and *F. nucleatum fusiforme* were all activating NFκB in a TIFA-dependent manner (Figure 5B). Very little is known for the moment of how some TIFAsome agonists enter eukaryotes cells. Published findings suggest that TIFA activator enter the cell via endocytosis (Gaudet et al., 2015, 2017). In line with this, inhibition of clathrin-mediated endocytosis and micropinocytosis by Dynasore, inhibited strongly the NFκB activity on NFκB-HT29 cells by bacterial supernatants (Figure 5C), suggesting that the activation was dependent on endocytosis.

What compounds produced by *Fusobacterium* and *Akkermansia muciniphila*, activate TIFA?

Pioneer work from Gray-Owen demonstrated that *Neisseria gonorrhoea* releases heptose bi-phosphate in the extracellular milieu. Heptose bi-phosphate (HBP) is likely a LPS synthesis by-product, which has the property of inducing the TIFAsome complex. Several intracellular pathogens (*S. flexneri*, *S. typhimurium*) or extracellular pathogen with Type IV secretion system (*H. pylori*) activate the TIFA complex formation. Moreover, it has been demonstrated that only the bi-phosphate form of heptose is a TIFA modulator, as the mono-phosphate form and heptose included in the LPS core structure have not effect (Milivojevic et al., 2017; Zimmermann et al., 2017). Thus, we hypothesis that our active molecules might be heptose, as HBP is the only known bacterial activator of TIFA. HBP is a small molecule thus supernatants of *A. muciniphila* and *F. n. nucleatum* were sieved with molecular weight cut-off at 3kDa.

We next examined if supernatants <3kDa kept activity on NFκB-HEK reporter cell line and if this effect was mediated by the TIFA pathway (Fig 6A). Consistently, most of the *F. n. nucleatum* and *A. muciniphila* activations were in the lower fraction. Moreover, the NFκB effects of these fractions were lost when the *ALPK1-TIFA1-TRAF6* pathway was mutated. Additionally, as heptose is a saccharide, DNase, proteases and heat chock treatments, may not affect it activity. Thus, *A. muciniphila* and *F. n. nucleatum* supernatants were treated with enzymes and boiled before examining the lingering activity on NFκB-HEK reporter cell line (Figure 6B). None of the treatments abolished NFκB activity, suggesting that the molecules might be carbohydrates.

In order to further determine if these two bacteria were producing heptose in the extracellular environment, we are planning to incubate supernatants with the purified GmhB enzyme, which removes a phosphate thus converting heptose bi-phosphate to heptose monophosphate (Figure 6C). The monophosphate form of heptose do not activate the TIFA pathway. We assumed that if the main activity in supernatants were dependent of HBP, treatment with GmhB should show a reduced NFκB activity when removing a phosphate. In parallel, we used a C18 purification step to remove peptidoglycan fragments from *A. muciniphila* supernatants. Purified *A. muciniphila* and *F. n. nucleatum* supernatants (<3kDa, C18) are currently analysed by our collaborators using mass spectrometry to determine if heptose can be detected (CEA F. Chenaille and AL Damont).

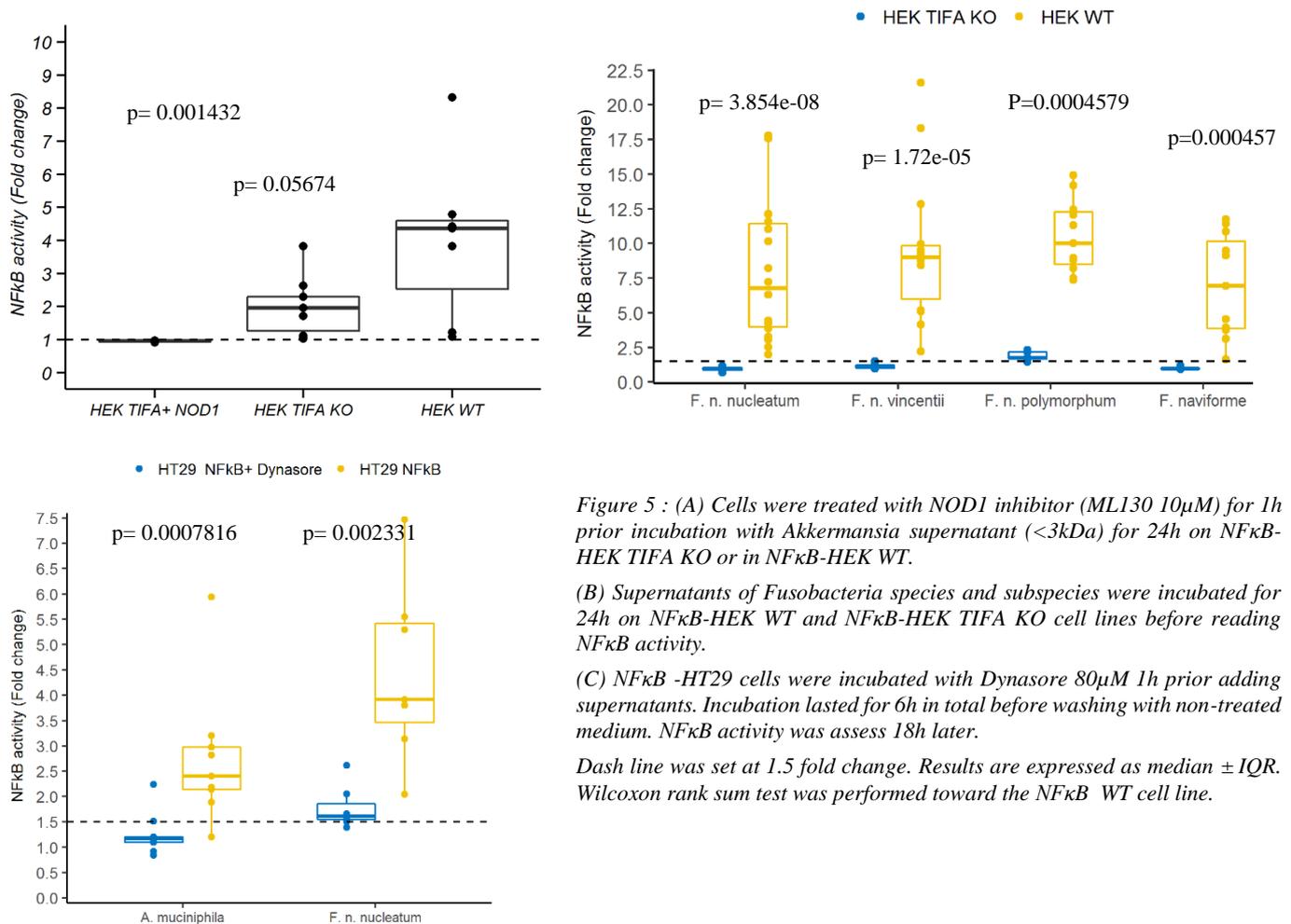


Figure 5 : (A) Cells were treated with NOD1 inhibitor (ML130 10μM) for 1h prior incubation with Akkermansia supernatant (<3kDa) for 24h on NFκB-HEK TIFA KO or in NFκB-HEK WT.

(B) Supernatants of Fusobacteria species and subspecies were incubated for 24h on NFκB-HEK WT and NFκB-HEK TIFA KO cell lines before reading NFκB activity.

(C) NFκB -HT29 cells were incubated with Dynasore 80μM 1h prior adding supernatants. Incubation lasted for 6h in total before washing with non-treated medium. NFκB activity was assess 18h later.

Dash line was set at 1.5 fold change. Results are expressed as median ± IQR. Wilcoxon rank sum test was performed toward the NFκB WT cell line.

To date, there is very few molecular tools to modify *A. muciniphila* and *F. n. nucleatum* genomes. Anaerobic growth requirement, specific restriction system and a high AT content in Fusobacteria genome have hampered further investigation. Recently, a group developed a random insertion-inactivation mutagenesis system for *Fusobacterium*, opening new possibilities for investigating the genes involved in the TIFA-dependent activation of NFκB (Copenhagen-Glazer et al., 2015).

Eventually, one obvious question is how the TIFA activator ended up in the extracellular medium; was it secreted via a transporter, coming from a leakage during the membrane renewal, extracellular vesicles or was it a debris from lysis? So far, there is no precise mechanism describing how TIFA heptose biphosphate is released from *Neisseria*. Up to now, we found no method to prove definitively the activator secretion. One argument in favour of secretion or release of TIFA activator rather than debris of lysed bacteria is that pellets of both species lysed by boiling, were not potent inducers of NFκB compared to supernatants from the same bacteria (Figure 6D). If heptose bi-phosphate was abundant in bacteria and released during bacterial replication or death, we would expect that lysis would release a high level of activator, which was not observed in our experiments.

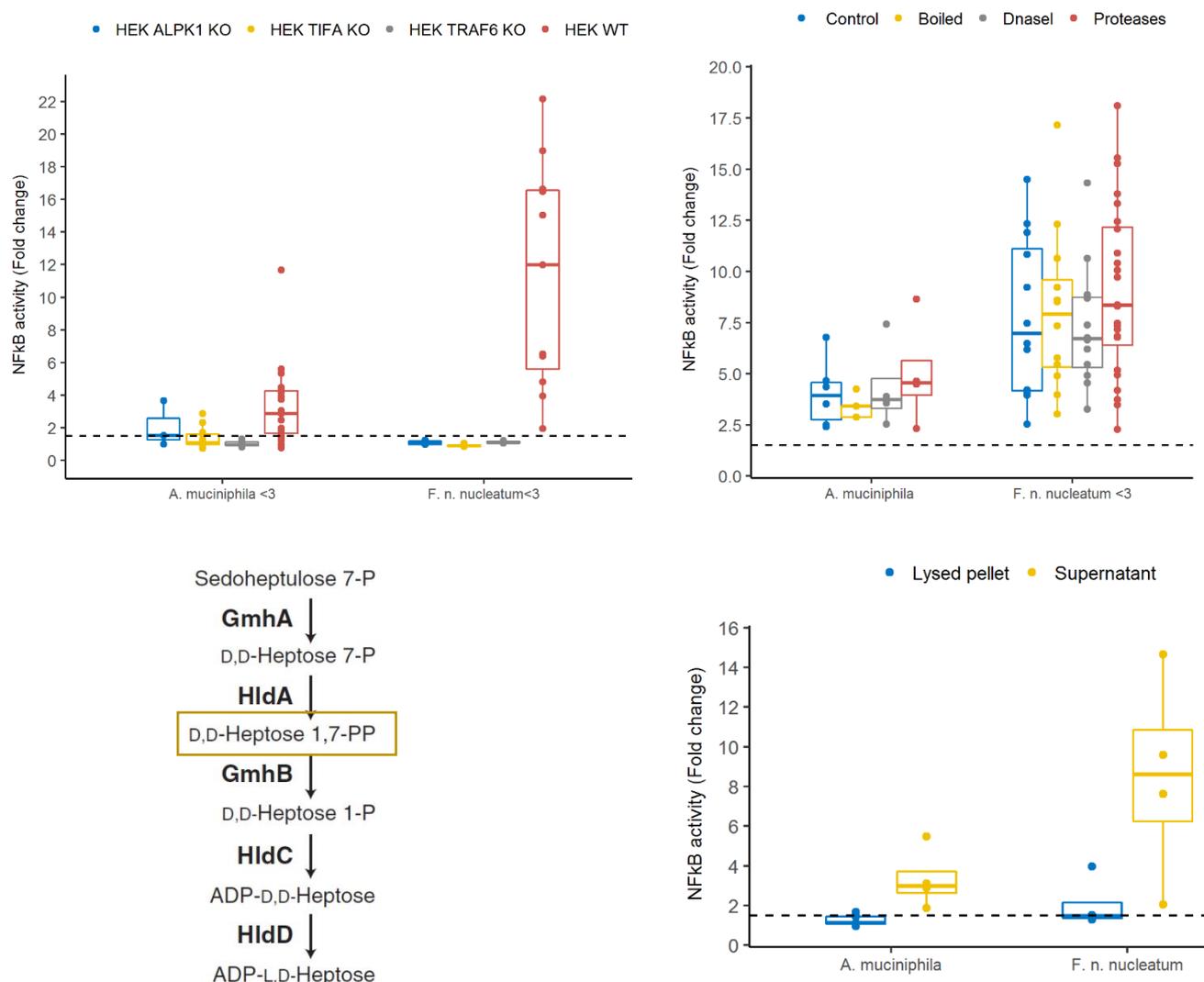


Figure 6 : Activity was <3kDa and resistant to enzymatic and heat treatments. (A) Supernatants <3kDa fraction were applied on NFκB-HEK WT, TIFA KO, TRAF6 KO, ALPK1 KO for 24h. *A. muciniphila* TIFA p-value = 0.002115, TRAF6 p-value = 0.0003843, ALPK1 p-value = 0.2781. *F. n. nucleatum* TIFA p-value = 0.0005267, TRAF6 p-value = 0.0006077, ALPK1 p-value = 0.0005926. (B) Supernatants were boiled for 2x 10min or incubated for 2h with DNaseI, Proteinase K, Trypsin and boiled to inactivate enzymes prior incubation for 24h on NFκB-HEK WT. (C) Schematic representation of heptose synthesis on bacteria (adapted from Gaudet 2015). (D) Pellets suspended in PBS of both species were boiled 10°C at 100°C twice before incubation on NFκB-HEK.

Akkermansia muciniphila impacts on IECs

Transcriptional analysis on Jurkat cells has shown the upregulation of genes implicated in inflammatory response, and NFκB in particular, upon heptose bisphosphate stimulation : *TNFAIP3*, *BIRC3*, *NFKBIA*, *IL8*, *IFNγ*, *TLB*, *IL32*

(Gaudet et al., 2015). We hypothesised that if *A. muciniphila* supernatant were inducing TIFA, we would expect a similar mRNA up-regulation profile on HT29 cells. HT29 were incubated for 6h with *A. muciniphila* supernatants or non-inoculated medium prior RNAs extraction and RTqPCR. In line with Gaudet *et al.* publication, our experiments revealed that *A. muciniphila* supernatant upregulated *IL8*, *BIRC3*, *NFKBIA*, *TNFAIP3*, *IL32*, suggesting that a similar pathway might be involved. TNFAIP3 and NFKBIA are negative NFκB regulators. TNFAIP3 (TNF Alpha Induced Protein 3) also named A20 is an ubiquitin ligase and deubiquitinase enzyme regulating several pathways such as TNFα, IL1β and TLRs via catalytic and non-catalytic activities (Vereecke et al., 2014). The protein NFKBIA (NFκB Inhibitor Alpha) sequesters the NFκB complex in the cytoplasm therefore preventing its translocation in the nucleus (Afonina et al., 2017). The BIRC3 protein (Baculoviral IAP Repeat Containing 3) is an E3-ubiquitin protein ligase targeting a large range of kinases involved on canonical and non-canonical NFκB signalling including TRAFs.

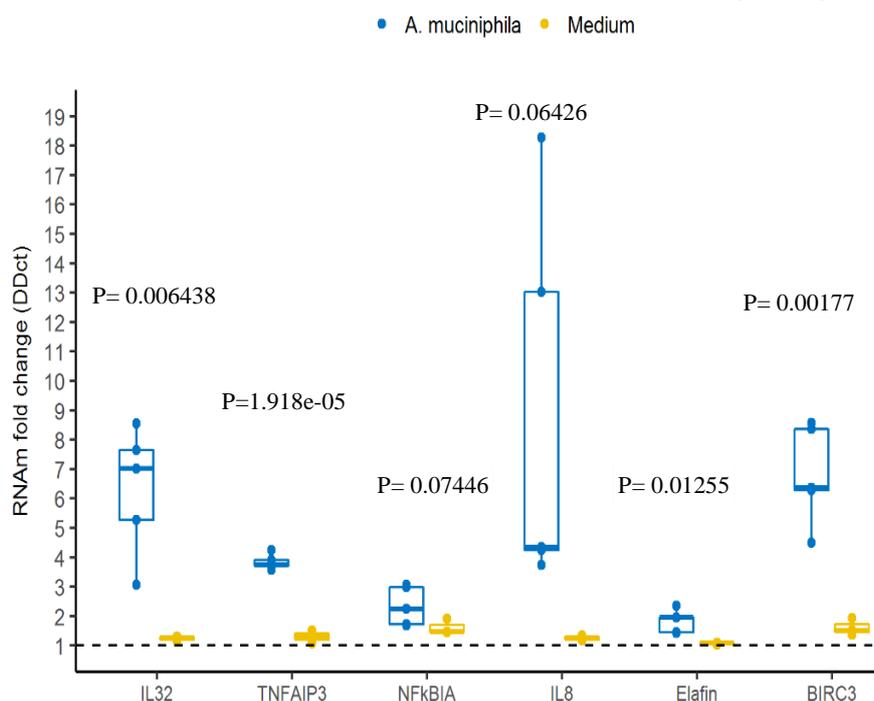


Figure 5: *A. muciniphila* induced inflammatory and anti-inflammatory mRNAs. *A. muciniphila* supernatants were incubated for 6h on HT29 cells before RNA extraction and RT qPCR. Results were normalised on Actin and express as $\Delta\Delta C_t$ toward non-stimulated cells. N=3 minimum. T test 2 tailed.

IL32 was the last gene studied. This cytokine induces MAPK, NFκB activation leading to inflammatory cytokines secretion (Andoh et al., 2008; Fantini et al., 2007). In another hand IL32 promotes anti-inflammatory molecules (IDO and Ig like transcript 4) and a negative feedback on NK cells (Gorvel et al., 2017; Smith et al., 2011a). A dozen of splicing variants are known yet they are barely described (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , s) (Khawar et al., 2017). IL32 α isoform is increased in UC or in CD patients mucosa and it has a low expression in normal colonic cells (Shioya et al., 2007). In a more recent publication, IL32 is only increased in CD patients, however there is with no information the specific isoform. IL32 accumulation in IECs might account for the inflamed mucosa and induction of apoptosis. On the contrary, two other isoforms have an immunosuppressive action as they block IL8, IL1β, TNFα and CCL5. IL32 γ is upregulated in the mucosa of CD patients and IL32 θ in certain gastric and colon cancers (Imaeda et al., 2011).

Besides, we further investigated the impact of *A. muciniphila* on genes involved in the regulation of intestinal barrier. This species is thought to have positive impacts on host health. It is associated with lean individuals and improved glucose metabolism (Derrien et al., 2017; Zhou, 2017). *A. muciniphila* adheres to epithelial cells, regulates

mucus and antimicrobial peptides production. Several studies have shown that the bacterium promotes intestinal barrier integrity and global host health via a pili-like protein, using the whole bacteria or heat-killed bacteria. (Ottman et al., 2017; Reunanen et al., 2015). A complementary study has demonstrated that the bacterium releases extracellular vesicles in the supernatant, favouring the epithelial barrier (Chelakkot et al., 2018). We chose to examine *ELAFIN* expression level, as this serine protease inhibitor is associated with gut homeostasis. Elafin is downregulated in IBD, especially in the colonic mucosa of patients suffering of UC and CD. It has a protective role by inhibiting bacterial and host-derived proteases such as elastase and proteinase 3 from neutrophils (Motta et al., 2012; Zhang et al., 2017b). Upon *A. muciniphila* stimulation, *ELAFIN* or *PI3* (Peptidase Inhibitor 3) was increased.

To further delineate which molecules were involved in the transcriptional activity of *A. muciniphila* supernatant, we will assess the impact of the <3kDa fraction of supernatant, C18 purified, on the same panel of genes using RT qPCR in WT and *TIFA* mutant HT29 cells. We are also studying its impact on the epithelial permeability using the transepithelial resistance (TER) measures on human colonic epithelial cell line T84 as HT29 do not form a differentiated monolayer.

Finally, if the purified GmhB succeeds to inhibit bacterial supernatants activity on NFκB-HEK, we will determine by qPCR the precise effect of TIFA on a range of genes using qPCR on HT29 cells. We envisage as well to evaluate the impact of *A. muciniphila* supernatant <3kDa, treated with or without GmhB, on primary epithelial cells from human colonic biopsy with the help of our collaborator (Anne Jarry, INSERM Nantes).

Similarly, we are planning to investigate the transcriptional responses in HT29 following *F. n. nucleatum* supernatant stimulation, in the same experimental setup. These experimentations may reinforce our hypothesis that *F. n. nucleatum* produces heptose biphosphate.

Conclusion and perspectives

Firmicutes and Verrucomicrobia modulate NFκB in a NOD1-dependent mechanism

The NOD1 and NOD2 share common structural domains but they have distinct cell expressions and ligands. NOD1 is a ubiquitous receptor expressed by a broad range of cells and tissues whereas NOD2 is restricted to Paneth and myeloid cells. Both receptors recognise processed fragments found in the peptidoglycan on bacteria cell wall. NOD2 has affinity for muramyl dipeptide molecule found in almost all bacteria cell wall, Gram⁺ and Gram⁻. On the contrary, NOD1 ligand, the meso-diaminopimelate-L-Ala-D-isoGln-L-Lys-D-Ala (IE-DAP) moiety is found essentially in Gram⁻ bacteria as it is typical of *meso*-DAP-type peptidoglycan (Chamaillard et al., 2003; Girardin, 2003; Gutierrez et al., 2002). Typical Gram⁺ peptidoglycan contains Lysine instead of *meso*-DAP. Recent evidences suggest that NOD1 and NOD2 sense activation of Rho GTPases reflecting damages induced on cell by pathogens such as *Shigella*, *Salmonella* or *E. coli*. Furthermore, some virus and protozoan parasites, Hepatitis C virus (RNA double stranded) or *Trypanosoma* for example, can trigger IFN responses via NOD1 in a peptidoglycan-independent pathway. The activation of NOD1 contributes to various responses on host, depending of the tissue and the environmental context. Administration of NOD1 agonists to mice promote vascular inflammation with dense cellular infiltrate of neutrophils and macrophages in coronary arteritis (Nishio et al., 2011). In addition, the receptor is implicated, in neuro-inflammation process as *NOD1*^{-/-} mice model show markedly reduced axon demyelination and

neuro-inflammation (Shaw et al., 2011). Beside detrimental effects, NOD1 is also associated with intestinal homeostasis and protection against cancers induced by colitis (Bouskra et al., 2008; Caruso et al., 2014; Chen et al., 2008). An insertion-deletion polymorphism on *NOD1* is strongly associated with asthma and IBD onset. Other genetic variations of this gene are correlated with sarcoidosis and Behçet diseases (Keestra-Gounder and Tsohis, 2017; McGovern et al., 2005). *NOD1*^{-/-} mice present a decreased expression of MUC2, antimicrobial peptides α and β defensins (Robertson et al., 2013). Peptidoglycan ligands from the gut microbiota, particularly NOD1, are reported to enhance defence against infections (*H. pillory*, *S. flexneri*, *E. coli*, etc.) by promoting intestinal IL17A-producing lymphocytes and GM-CSF at systemic level (Brown et al., 2017; Clarke et al., 2010; Hergott et al., 2016; Viala et al., 2004).

Our results revealed that some commensal bacterial were potent TLRs and MYD88 independent activators of NF κ B on human IECs cell line HT29. Active bacterial species belonged to various phyla, Gram⁺ (Firmicutes) and Gram⁻ (Fusobacteria and Verrucomicrobia). These results were confirmed by specific depletion of *MYD88* using Crispr/Cas9 method. Moreover, we showed that NOD1 inhibition, using a specific inhibitor (ML130), suppressed the NF κ B activation by *Clostridiales*, suggesting a NOD1 requirement in this process. Interestingly, activation by *A. muciniphila* supernatants was only partially abolished by NOD1 inhibition. ML130 inhibitor is a 2-aminobenzimidazole small compound which causes conformational changes, modification of subcellular localisation of NOD1 and enhances its ubiquitination. It is described as highly selective for NOD1 (Correa et al., 2011). Confirmation of NOD1 requirement is in progress using siRNA depletion.

Our findings suggest that *A. muciniphila* cell wall renewal releases fragments of peptidoglycan containing NOD1 ligand in the culture supernatant. Intriguingly, peptidoglycan synthesis was controversial among Verrucomicrobia as well as *Chlamydiales*. However, its presence is now demonstrated even if its structure may be unusual (Naqvi et al., 2016; van Niftrik and Devos, 2017). *A. muciniphila* lacks a crucial enzyme converting fructose-6-phosphate to glucoamine-6-phosphate (*GlmS*) which is needed for peptidoglycan synthesis (van der Ark et al., 2018). Hence, host-derived mucin degradation provides N-acetylglucosamine (GlcNAc), and N-acetylgalactosamine (GalNAc) used to form peptidoglycan. Thus, it might be interesting to further characterise the type peptidoglycan expressed by *A. muciniphila*.

In addition we demonstrated the bacterial compound triggering NF κ B were small molecules (<3kDa), resistant to Dnase, proteases (Trypsin and Proteinase K) and heat treatments. This is in line with the chemical properties of NOD1 ligand (Chamaillard et al., 2003). It is worth noting that bacterial supernatants were much more potent inducers of NF κ B than the specific NOD1 ligand IE-DAP on both NF κ B-HEK and NF κ B-HT29, suggesting that accessory molecules may enhance the cellular response. Supplementary experiments indicated that NOD1 activation was dependent on endocytosis as its inhibition strongly reduced NF κ B activation (data not shown).

Our results suggesting that Firmicutes, and specifically *Clostridiales*, induced the NOD1 pathway were original. Indeed NOD1 is known to be activated by meso-DAP peptidoglycan fragments specific of Gram⁻ bacteria (Chamaillard et al., 2003; Girardin, 2003). Only few Gram⁺ bacteria (*Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*) were shown to turn on this receptor, as most of Gram⁺ bacteria express a lysine instead of of DAP residue on their

peptidoglycan. In collaboration with a team from our Institut, we are willing to determine using biochemical analysis, the type peptidoglycan expressed by these *Clostridiales* species

An alternate hypothesis is that *Clostridiales* species release molecules that activate Rho GTPase or induce cytoskeletal remodelling thus triggering NFκB in a NOD1-dependent manner as it is described for pathogens (Keestra-Gounder and Tsohis, 2017; Keestra and Bäumler, 2014). Small Rho GTPases such as CDC42, RHOA or RAC1 are proteins localised at cell membrane that can alternate from a GDP-bound inactive form to a GTP-bound active form. There are evidences of interactions between NOD1, RIP1/2, NEMO and HSP90 (Heat shock protein 90) forming the Nodosome with the Rho GTPase CDC42 and RAC1. Bacterial virulence factors such as IpgB2 and OspB for *S. flexneri* interact with GEF-H1, a guanidine exchange factor of RhoA. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium injects effectors such as SipA and SopE (inositol phosphatase) that also activate via RAC1 and CDC42 respectively resulting in NOD1 activation. Another exemple is the uropathogenic toxin of *E. coli*, the cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) that constitutively activates RAC1 and interacts with NOD1 downstream the RIP2 adaptor. *Clostridiales* are reported to secreted toxins, especially cluster I that contains toxin producers such as *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani* and to which our main activator *C. sardniense* belongs (Popoff, 2014). Many of these toxins target Rho GTPase (Aktories, 2011; Popoff and Geny, 2011). To challenge this hypothesis, simple tools are available. If Rho GTPases are involved, treatment with chemical inhibitors would reduce *Clostridiales* activity on NFκB. In addition, activation of small GTPases and cytoskeletal remodelling can be assess by immunoblotting and immunofluorescence.

An alternative hypothesis is that endocytosis of molecules derived from *Clostridiales*, promotes endoplasmic reticulum stress. Recent publications demonstrate that *Brucella abortus* and *Chlamydia muridarum* induce ERN1 (Endoplasmic reticulum to nucleus signalling 1 or IRE1α) thus provoking NOD1 and NOD2 activation in a TRAF2-dependent manner (Keestra-Gounder et al., 2016). This IRE1α–TRAF2–NOD1/2–RIP2 signalling pathway is not only implicated in intracellular infection. Stress of the endoplasmic reticulum is linked to autophagy and inflammation in IBD. *ATGL16* (related to autophagy) and *XBPI* (related to unfolded proteins) loci are associated with a higher risk of developing the Crohn disease (Hosomi et al., 2015; Kaser and Blumberg, 2014). If *Clostridiales* provoke an endoplasmic reticulum stress, it can be assess with specific markers such as CHOP and GRP78.

Why the triggering of NOD1 by *Clostridiales* would have been selected in the gut context is an opened question. The activation may have consequences on intestinal homeostasis, which remain to be explored. Several evidences show that inducing GTPases increase NO production in inflammation responses, allowing a growth boost for enteropathogens in the context of nutrients competition in the gut lumen (Lawley et al., 2008; Winter et al., 2010). However, for bacteria highly adapted to the gut environment such as *Clostridiales* this explanation seems not be appropriate. NOD1 induction by commensal could elicit a basal cellular response favouring maturation of the host immunity to control infections. For example, *B. fragilis* stimulates TLR2, generating a low level activation of the immune system which is protective (Round et al., 2011b).

Search for NFκB activators in IECs evidenced that a large group of commensal bacteria are releasing soluble molecules that interact with the host innate immune system. We have established that several *Clostridiales*, one of the two major group of commensal bacteria in the gut, induce NFκB in a NOD1-dependent manner. Not all the

Clostridiales species tested were able to induce a NOD1 response, suggesting that involved molecules are specifically regulated in phylogenically close bacteria. Yet the precise mechanism enhancing NOD1 activity remains to be characterised. In addition, we have evidenced that *A. muciniphila* promotes a NOD1 stimulation of NFκB. This commensal bacteria is proposed to have protective impacts on obesity and metabolic disorders in human. The Gram⁻ bacteria probably prompted NOD1 by releasing peptidoglycan motifs. Interestingly, NOD1 inhibition is not preventing entirely NFκB activity suggesting the existence of another signalling pathway which is MYD88 and NODs independent, that is discuss below.

Gut bacteria-derived molecules stimulate TIFA

Akkermansia and *Fusobacterium* are commensal bacteria, with a relative abundance of ranging from 2-3 % to 0.1 % in the healthy human gastrointestinal tract. We reported in this work that bacterial compounds produced by *Fusobacterium* and *Akkermansia muciniphila*, induced NFκB activity in IECs (HT29) and HEK cells expressing low levels of TLRs. This effect was independent of MYD88 and NOD1 as demonstrated using genes knockout and NOD1 inhibition. Both, *Fusobacterium* and *Akkermansia muciniphila* supernatants activity were dependent of ALPK1, TIFA and TRAF6 as depletion of any of these genes diminish NFκB stimulation in HEK cells. Recent studies have shown that the TIFA pathway is induced by several intracellular and extracellular pathogens. Only *Neisseria* are secreting TIFA activator in the extracellular milieu, which is endocytosed by eukaryotic cells. In line with this finding, blocking endocytosis markedly reduced the supernatant-induced activities on NFκB, suggesting a common mechanism. Eventually, by using enzymatic and sieving strategies we were able to demonstrate that the active molecules from *Fusobacterium* and *A. muciniphila* were small, resistant to Dnase and proteases as well as heat-shocks.

Our work suggest that *Fusobacterium* and *A. muciniphila* are promoting two different patterns of immunomodulatory signalisation. In the first one, *Fusobacterium*, is an inducer of the ALPK1-TIFA-TRAF6-NFκB pathway in a very similar way to what is described for *Neisseria*. *Akkermansia muciniphila* presents a different pattern, by activating both NOD1 and TIFA. Thus *A. muciniphila* is more similar to *S. flexneri*. Further work may reveal if TIFA induction is supported by NOD1 stimulation by a positive retroaction, as it is demonstrated with *S. flexneri*. A major difference with *S. flexneri* is, however, that the TIFA agonist was in *A. muciniphila* supernatant and not released intracellularly in the cytosol. In *Fusobacterium* and *A. muciniphila* cases, TIFA agonist are concentrated and diffuse enough to stimulate NFκB without IECs membrane permeabilisation.

As for *Neisseria*, we showed that the activating metabolite entered IECs via endocytosis. Our work, add supplementary observations supporting that the bacterial metabolite can enter in cells without permeabilisation, suggesting the existence of a facilitating mechanisms, active transport or receptor at cell surface. Intelectin1, member of the lactoferrin receptor, recognises KDO, KO and free forms of D/L-manno-heptose but as far as we known, no the biphosphate form. Furthermore, Intelectin 1 does not induce NFκB, suggesting that this receptor is not involved in our model. The difference between *Neisseria* or gut bacteria and others bacteria might be on the bacterial activator itself. The molecule could be linked to another molecule or modified, improving its internalisation. A second hypothesis might be that these bacteria release complementary compounds impacting cells thus indirectly favouring the TIFA agonist internalisation. More investigations are underway to identify the nature of the gut bacteria secreted

molecules inducing TIFA. We are currently investigating the impact on bacterial activating supernatants of purified GmhB enzyme, removing one phosphate group on HBP to form heptose monophosphate. Moreover, collaborators are working on identification of HBP-related molecules in *Fusobacterium* and *A. muciniphila* supernatant by mass spectrometry.

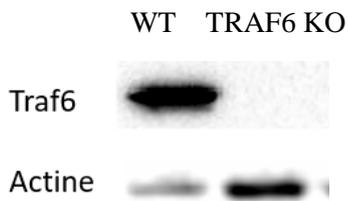
From the bacterium point of view, it remains not known how heptose is delivered to extracellular environment. Heptose biphosphate coming from the LPS synthesis could be include in the formation of bacterial outer membrane vesicles (OMV). Membrane vesicles are an interkingdoms phenomena, eukaryotes, bacteria and archaea produced these particles. They play important roles in the microbes-microbes communication as well as the host-microbiota crosstalk. Shen *et al.* have evidenced that *B. fragilis* delivers the polysaccharide A (PSA) via OMVs to gut mucosa thus leading to dendritic cells to produce IL10 via TLR2 (Shen *et al.*, 2012). However, if extracellular membrane vesicles (EMVs) were produced by *Fusobacteria* or *A. muciniphila*, the NF κ B enhancement observed was probably not attributable to EMVs in our settings. *A. muciniphila* EMVs are typically described to measure around 200nm, thus they were not present in supernatant below 3kDa (Chelakkot *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018). So far genetic modifications of *A. muciniphila* and *Fusobacterium* to disrupt genes from the LPS synthesis pathway thus demonstrating that TIFA agonist is a LPS by-product, are challenging.

We wish to complete this work by monitoring the TIFA and TRAF6 subcellular localisation upon stimulation with *Fusobacterium* and *A. muciniphila*, using immunofluorescence. In absence of an inducer signal, TIFA is reported to be uniformly distributed in the cytoplasm and the nucleus (Huang *et al.*, 2012). During infection or HBP stimulation, large TIFAsome complexes that can be detected within minutes by microscopy and western blot. These complexes do not colocalise with intracellular bacteria and appear as small foci (Gaudet *et al.*, 2015; Milivojevic *et al.*, 2017). Thus, using microscopy, we hope to better characterise the kinetics of IECs response to extracellular TIFA agonist delivered by gut bacteria.

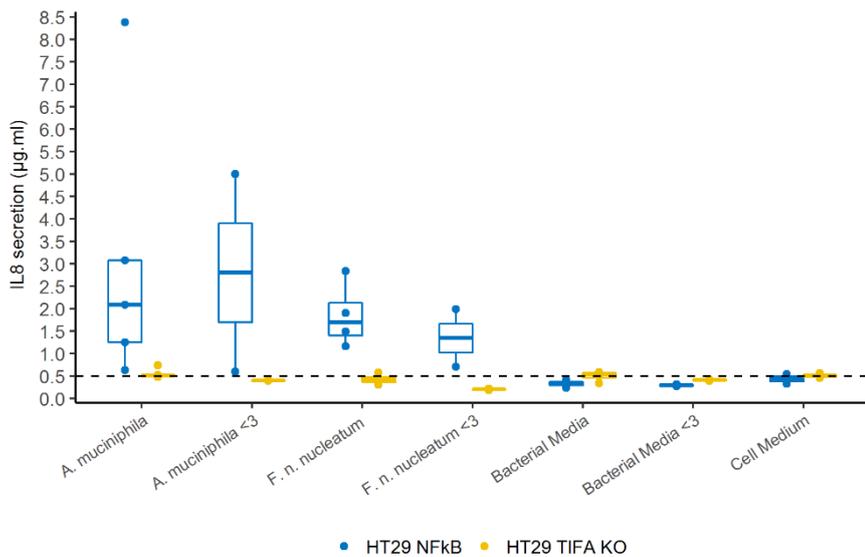
Supplementary figures

Supplementary I

Verification of TRAF6 expression in NF κ B-HEK WT and TRAF6 KO cell lines by Western Blot.



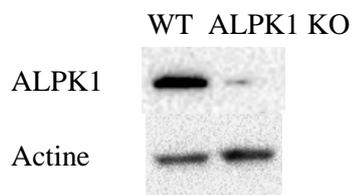
Supplementary II



HT29 cells were incubated for 24h with bacterial supernatants or controls before assessing IL8 secretion in cell medium. N=2. Data are represented as median and IQR.

Supplementary III

Verification of ALPK1 expression in NF κ B-HEK WT and ALPK1 KO HEK cell lines by Western Blot.



Material and methods

Cell Culture

The human epithelial cell lines HT29, HEK293, HEK293T were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). HT29 and HEK293 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin, 50 U/mL streptomycin in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Culture media and supplements were supplied by Sigma-Aldrich and Gibco. Mycoplasma contamination was regularly tested using MycoAlert (Lonza) and Plasmotest (Invivogen).

NFκB reporter system and cell viability Assays

For each experiment, cells were seeded at $1.5 / 3 \cdot 10^4$ cells per well in 96-well plates 24h / 48h prior to incubation with bacterial supernatants or reagents. The cells were stimulated for 24 h with 10μL of bacterial supernatants, or controls (TNFα, IL1β, PMA and RPMI) in a total culture volume of 100 μL per well prior to the luciferase assay. Secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) was revealed with the Quanti-Blue reagent (Invivogen) using microplate reader (655nm Infinite 200, Tecan). NFκB-HT29 and NFκB-HEK cell lines were stably transfected with pNiFty2-SEAP (Invivogen) and has been describe previously, upon stimulation NFκB-HT29 and NFκB-HEK produce SEAP which can be quantified using QuantiBlue detection media (InvivoGen) at 620 nm {Lakhdari, 2010 #125}. The NF-κB activities were normalized to the controls, i.e., the unstimulated cells or cells in presence of non-inoculated bacteria culture medium. Experiments were performed in triplicates for at least three independent assays. Cell viability was monitored by MTS measurement using the CellTiter 96 Aqueous One solution (Promega) according to the manufacturer's recommendations.

Genes invalidation using Crispr/Cas9

The *TIFA*, *TRAF6* and *MYD88* genes were disrupted co-transfection (DNA-In, MTI-GlobalStem) of a plasmid containing specific template sgRNAs and a second plasmid containing a GFP and Puromycine cassette (GeneCopoeia) in NFκB-HEK and NFκB-HT29 cell lines. After single cell dilution and antibiotic selection, cassette insertion was tested by PCR on GFP high cells using XX DNA extraction kit. Selected clones PCR products were sequenced by Sanger.

The *ALPK1* gene was disrupted by indel event using CRISPR/Cas9 following the Zhang general cloning protocol. Oligos containing ALPK1 sgRNA were cloned into lentiCRISPRv2 (Addgene #52961) using oligos previously published: CACCGGGACCAGCGCTGCAGAGGTG (ALPK1 up-Oligo), AAACCACCTCTGCAGCGCTGGTCCC (ALPK1 down-Oligo) (Zimmermann et al., 2017). HEK293T $7 \cdot 10^5$ cells were seeded with DMEM without antibiotics in 6cm² plate. The next day, cells were transfected with a mixture of 750ng psPAX2 (Addgene #12260), 250ng of pMD2.G (Addgene #12259) and 1μg of pLentiCRISPRv2-ALPK1 using Lipofectamine 2000 (Invivogen) diluted in OptiMEM (Gibco). Medium was changed after 18h of transfection and lentiviral particles were harvested 2 days after transfection and filter 0.45μM before storage at -80°C. NFκB-HEK were seeded at $1.5 \cdot 10^6$ in 6cm² plate 24h prior transduction with 1ml of lentiviral particles and 5μg.ml of polybrene (Sigma). Fresh medium was added 6h later and selection with puromycin 1μg.ml started 24h later for one week. Clonal cells were tested for NFκB activity before genotyping of genomic DNA by Sanger method and assessing protein level by immunoblot.

Culture of commensal bacteria, preparation of bacterial supernatants and SCFA concentration assessment.

137 human intestinal commensal bacterial strains which include 112 different species from the in-house INRA-Micalis collection or from DSMZ were grown. Anaerobic culture conditions were done using the Hungate method {Hungate, 1950 #321}. Screened species and strains, corresponding growth media, optical densities (OD), short chain fatty acids (SCFAs) concentrations are listed in Supplementary Table 1. Composition of home-made growth media is listed in Supplementary Table 1. Bacterial cultures were cultured to reach the maximum OD and centrifuged at 3,000 g for 10 to 20 min. Cultures were controlled using Gram staining method, aerobic growth test and fresh observation on microscope. Bacterial supernatants were then collected and filtered on a 0.22µm PES filters and conserved at -80°C. Non-inoculated bacteria culture medium served as control. Concentrations of SCFAs produced by cultured bacteria were measured by HPLC and gas chromatography as described {Lakhdari, 2011 #174; Bourriaud, 2005 #322}. *Akkermansia muciniphila* DSMZ 22959 ATTC BAA-835 type strain, *Fusobacterium nucleatum nucleatum* DMSZ 15643 type strain.

Supernatants and pellets treatments

For filtration, bacterial supernatants were added on a 3kDa cutoff filtration column (Millipore) and centrifuged for 1h at 4 000g at room temperature. In enzymatic treatments, supernatants were incubated with Dnase I (100µg.ml, Sigma) with 5mM MgCl₂ or Proteinase K (100µg.ml), Trypsin 0.25% for 2h at 37°C. After 2h of incubations, supernatant were boiled twice for 10min at 100°C. Bacterial pellets were suspended in PBS lysed with glass beads using Fastprep 2x 40s 4m/s prior centrifugation for 10min at 16 900g and dilution to 1X. For C18 purification step, supernatants and controls were centrifuged for 1h at 4 000g on a 3kDa (Millipore) cartridge, next samples were applied on Strata-X C18 Reverse phase column (Phenomenex) washed with Methanol and TFA 0.1%. Hydrophilic phase phases were freeze-drying using vacuum lyophiliser (Labcono). Before use on cells, samples were 0.22µm filtered before freezing.

Proteins assays

ELISA

NFκB-HEK or NFκB-HT29 WT or *TIFA* KO cells were seeded at 3.10⁵ cells per well in 24 well-plates 24h prior incubation with bacterial supernatants, non-inoculated medium and controls. Cells supernatant were collected 24h later, centrifuged and assessed by ELISA following manufacturer instructions using the IL8 Biolegend kit.

Western Blot

HT29 or HEK cells were washed twice and lysed in buffer (1% NP40, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCL pH8, 5mM EDTA, 1 x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Protein extracts were run in SDS-PAGE gels and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked overnight in TBS 0.1% tween 4% skim milk or BSA (Sigma). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C, TRAF6 (Biolegend), ALPK1 1:200 (NovusBio) , Actin 1:2000 (AC-40) from Sigma, GAPDH 1:2000 (Santa Cruz). Secondary (Goat anti-Rabbit IgG HRP (P0448) and Goat anti-mouse HRP (P0447) from Dako) antibodies were successively added for 1h before detection with the Clarity Western ECL Substrate using the Chemidoc MP System (Bio-Rad). Quantifications were performed using the Image Lab software (Bio-Rad). Proteins levels were internally normalised with Actin before comparison with experimental controls.

Reagents and cytokines

All agonists, drugs and inhibitors were dissolved in glycerol, DMSO or water following the manufacturer's recommendations. IL1 β (10ng/ml) and TNF α (10ng/ml) were from Peprotech. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100nM), Dynasore 80 μ M, ML130 10 μ M was from Sigma.

siRNA assays

HEK-NF κ B cells were seeded at 4.10⁵ density in 12-well plates and transient transfections were done on day 2 and day with 2.5 μ L of DharmaFECT 1 (Dharmacon) and 25nM of ON-TARGETplus smart Pool siRNA NOD1 (L-004398-00-0005, NM_001251825.1) or Negative Control (D-001810-10-05). ALPK1 siRNA Silencer Select (s37074) and Negative control (4390844) were from Ambion. On day 4 cells were plated to 2.10³ on 96 wells, on day 5 incubation with reagents was done and incubated for an additional 24h prior luciferase activity measurement.

Real-Time PCR

HT29 cells were seeded in 6 well culture plates at densities of 1.10⁶ per well 24h before stimulation and total RNA was extracted using RNeasy mini-Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations with Dnase I treatment (R&D). cDNA was synthesized from 2 μ g of RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and 100ng per well were used to conduct qPCRs on ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) or StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFischer Scientific). Actine was used for normalisation and comparisons were done with $\Delta\Delta$ Ct. Samples were tested in experimental duplicates and at least in biological triplicates.

<i>Actin beta</i>	Hs99999903_m1
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1
<i>Tifa</i>	Hs00385268_m1
<i>IL32</i>	Hs00992441_m1
<i>PI3 (elafin)</i>	Hs00160066_m1
<i>UBD</i>	Hs00197374_m1
<i>SI00A3</i>	Hs00161483_m1
<i>IL8</i>	Hs00174103_m1
<i>TFNAIP3</i>	Hs00234713_m1
<i>TIFA</i>	Hs00385268_m1
<i>ALPK1</i>	Hs01567926_m1
<i>BIRC3</i>	Hs00985029_m1

Statistical Analysis

Data were analysed using R and RStudio software. Graphics were produced with ggplot2 package. Statistical test used were T test or Wilcoxon rank test. Data come from at least 3 independent biological experimentations.

Discussion générale et perspectives

I. Résumé du travail expérimental

Depuis plus d'une décennie, une série de publications révèle des mécanismes qui expliquent comment s'établissent et se maintiennent les relations de symbiose entre le microbiote et le système immunitaire de l'hôte. Le microbiote contribue activement à la stabilité de sa propre niche écologique, en dialoguant avec le système immunitaire. Deux grands types de signaux sont émis par le microbiote : des fragments bactériens (LPS, flagelline, peptidoglycane) et des molécules provenant du métabolisme bactérien (acide gras, acides biliaires, peptides). Les cellules épithéliales de l'intestin sont les premières destinataires de ces signaux et constituent l'interface entre le microbiote et le système immunitaire inné et adaptatif. Elles sécrètent en réponse un ensemble de cytokines, de chimiokines, de peptides et de métabolites, qui conditionnent l'environnement muqueux et l'orientent vers un phénotype plutôt effecteur (M1, Th1, Th2, Th17) ou régulateur de la réponse immunitaire (Treg, Breg, M2, DC103+). Si de nombreux indices laissent entrevoir l'importance des cellules épithéliales dans le dialogue hôte-microbiote, néanmoins leurs rôles restent encore méconnus.

Le premier objectif de cette thèse, était d'identifier des bactéries intestinales capables de moduler la transcription des protéines impliquées dans la réponse immunitaire, au niveau des cellules épithéliales de l'intestin humain. Dans un second objectif, nous souhaitons déterminer quelles molécules bactériennes étaient impliquées ainsi que leurs mécanismes d'action dans les cellules épithéliales humaines. Grâce à l'expertise de notre laboratoire en matière de microbiologie anaérobie, une banque de bactéries intestinales humaines, cultivées sur différents substrats, a été mise en place. Nous avons choisi de nous intéresser au facteur de transcription NFκB, véritable chef d'orchestre de la réponse immunitaire innée, ainsi qu'à deux gènes, *TGFB1* et *IDO1*, importants pour la différenciation des lymphocytes T naïfs en Treg.

Le choix d'étudier *TGFB1* et *IDO1* s'est fondé sur deux publications du même groupe (Atarashi et al., 2011a, 2013). Après avoir décrit que la colonisation de souris axéniques avec des spores de *Clostridiales* restaure un niveau de lymphocytes T régulateurs exprimant FOXP3, à un niveau proche de celui observé dans le côlon des souris SPF, les auteurs prouvent que le traitement avec des anticorps anti-TGFB1, bloque l'augmentation des Treg. De plus, ils mettent en évidence que les *Clostridiales* sécrètent des molécules capables d'augmenter la production dans les cellules épithéliales de TGFB1 et d'IDO1. Bien que ces travaux n'aient pas identifié les molécules bactériennes responsables de ces effets, néanmoins, ils ont ouvert de nouvelles pistes mécanistiques en éliminant les voies « classiques » de la reconnaissance des motifs microbiens que sont MYD88, RIP2 et CARD9.

L'étude des *Clostridiales*, présente un intérêt d'autant plus grand que leur proportion est réduite chez les patients souffrants de maladies inflammatoires de l'intestin. Une étude postérieure, a élargi le spectre des bactéries capables d'induire la différenciation des Treg dans le côlon dans un modèle de souris axéniques. Des bactéries appartenant à des genres aussi divers que *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Prevotella* ou *Bifidobacterium*, ont la capacité d'induire des Treg favorables à la tolérance intestinale (Sefik et al., 2015).

La première étape de notre travail a été de cultiver une large sélection de bactéries présentes dans le microbiote humain puis de tester les surnageants et les culots bactériens sur des systèmes rapporteurs de *TGFB1*, *IDO1* et NFκB dans des cellules épithéliales d'origine intestinale (HT29). A l'issue de ce premier crible, nous avons sélectionné des bactéries ayant un impact sur chaque système. Les tests des culots bactériens étant très hétérogènes, nous nous sommes concentrés sur l'étude des surnageants.

Dans ce contexte, nous avons montré que les acides gras à chaînes courtes, en particulier le butyrate présent dans les surnageants bactériens des *Clostridiales* et des *Fusobacterium*, se sont révélés être les plus puissants modulateurs de *TGFBI* et d'*IDO1*. De manière intéressante, le butyrate a des effets opposés sur ces deux gènes : d'un côté il active *TGFBI* et de l'autre il inhibe *IDO1*. Les effets de cet acide gras sont indépendants des trois récepteurs connus GPR41, GPR43 et GPR109a, et du principal transporteur du butyrate, MCT1. Nous avons montré que différents inhibiteurs de HDAC reproduisent exactement l'impact du butyrate sur ces deux gènes, ce qui suggère un mécanisme d'action commun qui implique une modification du niveau d'acétylation de certaines protéines. Le butyrate augmente la transcription de *TGFBI* via le facteur de transcription SP1 qui se lie à son promoteur. D'autre part, le butyrate bloque la principale voie d'induction d'*IDO1* par l'IFN γ en inhibant le niveau basal de STAT1. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un second mécanisme par lequel le butyrate inhibe la transcription d'*IDO1*, indépendamment de la stimulation par l'IFN γ . Par ces deux mécanismes, le butyrate pourrait constituer un important verrou physiologique de l'expression d'*IDO1*, dans des lignées et dans des cellules épithéliales primaires de côlon.

Dans une troisième partie, nous avons étudié les surnageants bactériens qui stimulent le facteur de transcription NF κ B. Dans notre système, les acides gras à chaînes courtes n'ont pas d'effet sur la voie NF κ B, ce qui suggère l'implication d'autres molécules bactériennes. Afin d'éliminer les activations dues à l'activation des TLR, nous avons sélectionné les bactéries conservant une activité dans des cellules HEK293 où *MYD88* était muté par la technique CrispR/Cas9. En inhibant le récepteur NOD1, nous avons pu mettre en évidence que l'activation de NF κ B par certaines *Clostridiales* est dépendante de cette voie d'activation. De plus, l'inhibition de NOD1 bloque une partie de l'activité du surnageant d'*A. muciniphila* sur NF κ B. Ces travaux sont en cours de confirmation en utilisant des siRNA de NOD1. Par ailleurs, grâce à une série de délétions génétiques, nous avons établi que les surnageants de *F. nucleatum* et d'*A. muciniphila* augmentent l'activité de NF κ B via la voie ALPK1-TIFA-TRAF6. Des expériences sont en cours avec des collaborateurs, afin d'identifier les molécules bactériennes capables de stimuler cette voie de l'immunité innée nouvellement décrite.

II. Limites techniques et forces de la stratégie choisie

A l'ère du haut débit et des approches « Omics », le choix de la culture de bactéries individuelles peut paraître anachronique. Pourtant ces deux approches nous ont paru complémentaires. La culture individuelle permet de caractériser des bactéries peu connues au niveau fonctionnel et moléculaire. La microbiologie classique est un outil pour comprendre les facteurs biotiques et abiotiques qui régulent le métabolisme et la production de composés bactériens. La culture individuelle offre une souplesse et un coût peu élevé pour tester des hypothèses fonctionnelles et de varier les paramètres. D'un côté, les approches globales proposent des relations de corrélation entre des phénotypes et des groupes de bactéries. De l'autre, la culture individuelle, offre un cadre simplifié pour vérifier ces corrélations et comprendre leurs mécanismes. Pour aller plus loin, plusieurs équipes ont montré qu'il est possible avec des modèles de co-culture, d'étudier les interactions directes entre différents micro-organismes et également entre micro-organismes et cellules eucaryotes (Benomar et al., 2015; Reunanen et al., 2015; Sadabad et al., 2015; Schnupf et al., 2015). Ces modèles de co-cultures offrent de nouvelles perspectives pour mieux décrypter les interactions hôte-microbiote. Ces étapes sont intéressantes pour sélectionner des hypothèses à approfondir ensuite dans des modèles plus complexes, tels que des fermenteurs, des animaux à la flore intestinale contrôlée ou des

organoïdes (Browne et al., 2016; Clavel et al., 2017). Dans le cadre de cette thèse, nous avons privilégié des conditions de culture mimant celles que les bactéries rencontrent dans l'intestin, avec notamment des milieux de cultures riches en fibres, tout en respectant les besoins de chaque espèce. Parce que le nombre d'espèces cultivées était trop important, nous n'avons pas joué sur les conditions de culture pour comparer les différences d'activité bactériennes.

L'essentiel du travail présenté dans cette thèse a été effectué sur des lignées cancéreuses, de cellules épithéliales intestinales humaines, principalement HT29 et Caco2. L'étude de la signalisation NFκB a été en partie réalisée avec une lignée humaine très indifférenciée (HEK), mettant ainsi à profit le fait que ces cellules expriment très peu de récepteurs de motifs microbiens. L'utilisation de lignées cellulaires présente différents avantages pour effectuer un crible avec un nombre important d'échantillons bactériens tels que le faible coût, la souplesse et rapidité de culture et la reproductibilité. De même, ces modèles sont très intéressants pour déterminer les voies de signalisation impliquées dans les réponses cellulaires. Il est relativement simple de construire des systèmes rapporteurs stables et de modifier les génomes de ces cellules. Le travail sur des lignées cancéreuses a également des désavantages : peu différenciées, elles ne reflètent que partiellement le fonctionnement des côlonocytes primaires. Le caractère cancéreux est également un handicap pour comprendre l'impact des acides à chaînes courtes sur les cellules épithéliales parce que les lignées cellulaires de côlonocytes ne métabolisent pas les acides gras par la β -oxydation comme les côlonocytes sains. Ces cellules sont ainsi plus sensibles à l'effet antiprolifératif des acides gras que les cellules saines. Nous avons utilisé les lignées cellulaires à l'état non différencié, où elles ne sont pas polarisées et ne forment pas d'épithélium monostratifié. Il n'est pas possible avec ces modèles, d'explorer le rôle de récepteurs (PRR, récepteurs de acides gras) en fonction de leur localisation cellulaire ni de tester les impacts sur la perméabilité de l'épithélium. Toutefois, certaines lignées peuvent se différencier en cellules proches des côlonocytes et permettent ainsi de répondre à ces questions.

Grâce à nos collaborateurs, nous avons eu la possibilité de tester sur des cellules primaires de côlon humain certains des résultats obtenus avec les lignées cellulaires, Nous avons eu accès des explants de muqueuse colique, maintenus en culture quelques jours. Avec ces explants, il est possible de tester différentes molécules sur des cellules différenciées dans un tissu structuré mais ils ne permettent pas de travailler spécifiquement sur les cellules épithéliales car ils sont constitués à la fois des cellules épithéliales et des cellules de la *lamina propria* : cellules de soutien, cellules dendritiques, lymphocytes, etc. Nous avons eu également la possibilité de travailler de manière complémentaire, sur des cellules épithéliales primaires de côlon cultivées.

III. Mécanismes de régulation de la transcription de gènes immuno-régulateurs par le microbiote dans les cellules épithéliales intestinales ?

Comment le gène *TGFB1* est-il régulé ?

Mécanismes de régulation de TGFB1 par le microbiote

Le promoteur humain de *TGFB1* comporte différents motifs de liaison, notamment avec les facteurs de transcription AP1, NFκB et SP1. Nous rapportons que l'augmentation de la transcription de *TGFB1* par le butyrate est dépendante de la liaison de SP1 sur le promoteur de *TGFB1* sur un motif que nous avons identifié. En effet, la mutation de deux bases dans cette séquence, suffit à abolir la réponse de *TGFB1* au butyrate. A notre connaissance c'est la première fois que l'on montre que les inhibiteurs de HDAC, dont le butyrate, augmentent la transcription de *TGFB1* dans des cellules épithéliales intestinales humaines. L'équipe de Honda a montré qu'une faible dose de 0.5mM de butyrate, seule, ne suffit pas à augmenter la production de la protéine TGFB1 dans les HT29, alors qu'un mélange de différents acides gras à 0.5mM, est capable d'induire cette augmentation (Atarashi et al., 2013). Dans notre travail, le butyrate seul, induit également une augmentation au niveau protéique dans les HT29, mais elle n'est détectable qu'à une concentration plus élevée. Par contre, dans des résultats non publiés, nous n'observons pas cet effet additif des acides gras sur la régulation transcriptionnelle de *TGFB1*. Les différences entre nos résultats et ce qui a été publié par l'équipe japonaise, peuvent provenir d'une part des concentrations testées, et d'autre part des différents niveaux étudiés, niveau transcriptionnel versus sécrétion protéique. Il est possible que le butyrate ait un effet sur la sécrétion de TGFB1 indépendamment de son effet sur la transcription. Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de TGFB1 sont complexes et impliquent de nombreuses enzymes qui permettent la formation du TGFB1 mature sur lesquelles pourraient agir le butyrate. En 2013, Atarashi *et al* ont proposé que les acides gras produits par les bactéries intestinales augmentent TGFB1 et TGFB2, ce qui induit l'expansion des Treg intestinaux. Les résultats de ce travail de thèse confirment le rôle du butyrate dans la régulation de l'expression de *TGFB1* et mettent en évidence un mécanisme d'action *via* l'inhibition des HDAC et le facteur de transcription SP1.

TGFB1 est-il régulé comme un gène de ménage ?

Une partie intéressante du travail effectué pendant cette thèse a été de décrypter les mécanismes de régulation transcriptionnelle de *TGFB1*, sur lesquels il y a peu d'études. Etonnamment, la plupart des efforts de recherche sont concentrés sur la régulation post-transcriptionnelle, très complexe de TGFB1. Le promoteur du gène humain de *TGFB1* ne possède pas de TATAbox proprement dite (Kim et al., 1989a). Le promoteur est riche en bases GC et contient de multiples sites d'initiation de la transcription. Ces éléments sont souvent les indicateurs d'un gène exprimé de manière constitutive, comme pour les gènes dits de ménage. Ces gènes de ménage sont régulés par des éléments de reconnaissance en amont (Inr, BREu) et en aval de l'initiation (DPE) de la transcription, autour d'un promoteur dit essentiel ou « core ». En utilisant l'outil de détection, Element (Sloutskin et al., 2015), nous pouvons voir que plusieurs de ces éléments de régulation sont présents dans le promoteur de *TGFB1* (données non montrées).

Le promoteur *TGFB1* possède de nombreux motifs de liaison avec des facteurs de transcription AP1, EGR, USF, Z9F, STAT3, NFκB ainsi que des facteurs appartenant à la famille SP/KLF (Specificity Protein/Krüppel-like Factor). Le génome humain contient près de 12 000 motifs de liaison à SP1, dont la séquence consensus est GGGGCGGGG (Cawley et al., 2004). Les protéines SP1 et SP3 sont très proches en termes de structure, elles reconnaissent les mêmes motifs ADN, mais elles n'ont pas toujours le même impact transcriptionnel. Par conséquent, il est difficile de séparer

l'action de SP1 et de SP3. SP1/SP3 contrôlent la transcription basale d'un grand nombre de gènes de ménage, qui assurent des fonctions vitales pour la cellule (Krüger et al., 2007; Suske, 1999). SP1 est un facteur de transcription avec trois domaines en doigt de zinc qui sont nécessaires à la liaison sur les zones d'ADN riches en GC. Il interagit avec d'autres facteurs de transcription (récepteur aux estrogènes, ZBP-148), des régulateurs transcriptionnels et des facteurs qui remodelent la chromatine. Le promoteur de *TGFBI* contient environ 4 fois plus de motifs SP1/SP3 que la moyenne du génome dont plusieurs sont dans la région dite « essentielle » du promoteur, où se situent en général les éléments de régulation les plus importants (résultats non publiés). D'autres expériences seraient nécessaires afin de comprendre comment fonctionne, de manière plus globale, la régulation l'initiation de la transcription du gène *TGFBI* à l'état basal et lors de stimulations.

Nous avons montré que le butyrate et d'autres inhibiteurs de HDAC, activent SP1, qui se lie sur un motif de liaison du promoteur de *TGFBI* et conduit à l'augmentation de sa transcription dans les cellules épithéliales. Il reste des zones d'ombre dans le mécanisme d'action du butyrate mais plusieurs pistes ont été décrites dans des modèles s'intéressant à la régulation d'autres gènes, qui permettent de poser des hypothèses (Bai and Merchant, 2000; Davie et al., 2008). La trichostatine A, un inhibiteur d'K/HDAC dont l'effet est similaire au butyrate, active la transcription du récepteur de type II de TGFβ (TGFRII) dans des cellules pancréatiques par 3 mécanismes : en augmentant l'acétylation de SP1, en sur-exprimant simultanément p300/CBP (CREB-binding protein) et en inhibant les HDAC. La TSA modifie la composition du complexe de transcription: SP1 et SP3 permettent le recrutement du complexe p300-CBP qui sont des lysine/histone acétyltransférases (K/HAT). Ce complexe augmente l'acétylation des histones et provoque le recrutement de la polymérase ARN II (Huang et al., 2005).

Dans une autre publication, le butyrate stimule dans les cellules de cancer du sein, l'association de SP1 et p300 et inhibe la présence de HDAC1 sur le promoteur humain de l'*IGFBP3*. Les auteurs suggèrent qu'à l'état basal SP1/SP3 forment des complexes avec HDAC1, qui se dissocient en présence du butyrate. SP1/SP3 peuvent alors interagir avec p300 (Walker et al., 2001). Il faut noter que SP1/SP3 ne sont pas toujours des activateurs transcriptionnels, plusieurs cas de répression ont été décrits. Concernant *TGFBI*, il est probable que le butyrate produise également des modifications de liaison de SP1 avec d'autres protéines régulatrices de la transcription qui ne sont pas connues (Figure III-1). Des expériences d'immuno-précipitations de la chromatine, couplées au séquençage permettraient de

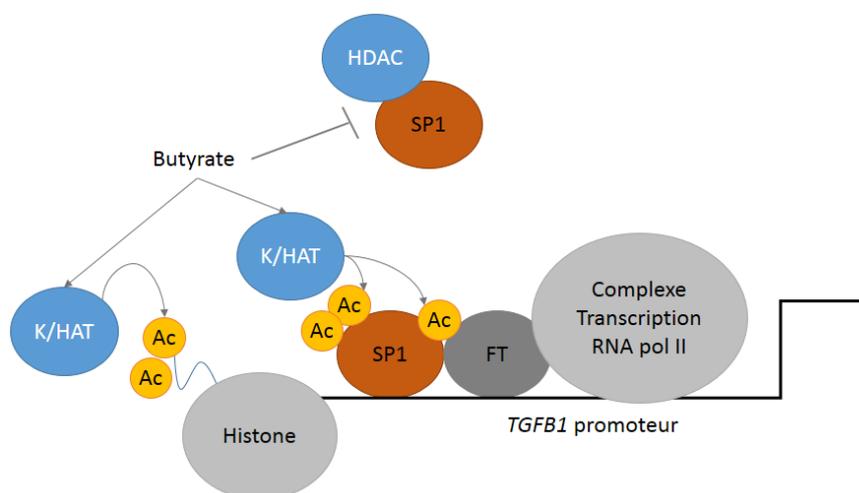


Figure III-1 : Mécanismes proposés d'activation de *TGFBI* par le butyrate via SP1 et l'inhibition des histones et lysines déacétylases, dans les cellules épithéliales intestinales.

mieux décrire les interactions de SP1/SP3 avec les autres protéines régulatrices. Le butyrate n'est pas la seule molécule microbienne qui régule *TGFB1*. Différentes équipes ont montré que le virus de l'hépatite C augmente la transcription de *TGFB1* dans des cellules du foie, en jouant sur AP1, NFκB et SP1 (Lin et al., 2010; Presser et al., 2013).

Quels liens entre TGFB1, le butyrate et les maladies inflammatoires ?

TGFB1 est une protéine aux fonctions pléiotropiques chez l'humain. C'est un facteur déterminant au niveau de l'immunité, pour la différenciation des lymphocytes Th17 et des Treg. C'est la présence de TGFB1, couplée à d'autres cytokines, qui engage le facteur de transcription RORγt pour les Th17 et FOXP3 pour les Treg. La présence concomitante d'IL6 ou de l'IL21, et de TGFB1 entraîne l'expression de RORγt qui engendre des lymphocytes Th17. La présence d'IL2 et de TGFB1, provoque quant à elle, la spécialisation en Treg, qui eux-mêmes produisent du TGFB1 (Zhu and Paul, 2010). En réalité, le destin des lymphocytes n'est pas complètement fixé, les lymphocytes Treg induits dans l'intestin et dans le thymus sont des populations hétérogènes, réunies par leurs capacités immunosuppressives. La présence de TGFB1 est importante au moment de l'engagement dans la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs qui elle doit être maintenue au-delà, car les lymphocytes sont dotés d'une grande plasticité. En présence d'IL6, dans un contexte inflammatoire, les Treg FOXP3 peuvent perdre leur capacité immunosuppressive, ne plus exprimer FOXP3 et se transformer en Th17. Ils peuvent aussi sécréter de l'IL17. A l'inverse, des lymphocytes Th17 peuvent adopter un phénotype suppresseur sous l'influence de cytokines dans l'environnement (Gagliani et al., 2015; Omenetti and Pizarro, 2015). L'expression de TGFB agit indirectement pour favoriser le changement du type d'immunoglobulines produites par les lymphocytes B. La protéine TGFB1 favorise la production d'IgA dans l'intestin, qui aident à contrôler la composition du microbiote (Kim et al., 2016; Klein et al., 2006). Dans ce contexte, la stimulation par le microbiote intestinal de la production de TGFB1 dans les cellules épithéliales, via le butyrate, pourrait favoriser la régulation de la réponse immunitaire intestinale et le contrôle de la composition du microbiote. En participant à cette boucle de renforcement positif de la symbiose, la protéine TGFB1 apparait comme un élément important du dialogue hôte-microbiote.

La protéine TGFB est également importante pour la cicatrisation des tissus et la différenciation cellulaire, deux facteurs clefs dans l'épithélium pour faire face au renouvellement rapide et aux lésions fréquentes dans l'intestin. Le contrôle de TGFB1 par le microbiote, peut avoir un impact dans les MICI et dans d'autres pathologies comme le cancer. En effet la diminution du niveau de butyrate est un marqueur du risque de cancer du côlon, ainsi que de la progression de la sévérité dans la maladie. Parallèlement, les Firmicutes, en particulier les *Clostridiales* cluster XIV, les *Lactobacillus*, les *Bifidobacterium*, sont fréquemment réduits chez les patients atteints de MICI, tandis que certaines bactéries à Gram⁻ augmentent (*Bacteroides*, *Akkermansia*, *Fusobacteria*, *Alistipes*). Les changements de composition du microbiote dans les fèces sont corrélés à une modification des métabolites, à une baisse du butyrate et à une augmentation des dérivés d'acides azotés (Borges-Canha et al., 2015). Les patients atteints de MICI ont aussi plus de risque de développer un cancer colorectal, suggérant des mécanismes sous-jacents communs.

Il existe un grand nombre de preuves des effets anti-tumoraux du butyrate, par différents mécanismes tels que les miRNA, l'inhibition des HDAC, les antioxydants, la régulation de P53, de P21, de Wnt, le ralentissement du cycle cellulaire, etc. (Louis et al., 2014; O'Keefe, 2016). Cependant certaines propriétés du butyrate produisent des effets

anti-inflammatoires et immunosuppresseurs par l'augmentation des Treg et des Tr1 producteurs d'IL10 et par le blocage de la stimulation de NFκB par des signaux inflammatoires (Arpaia et al., 2013; Chang et al., 2014; Kaisar et al., 2017). Ces propriétés sont défavorables dans la lutte contre les tumeurs et peuvent paraître contradictoires avec l'effet anti-tumoral bien décrit de cette molécule. Il est possible que l'augmentation de TGFB1 par le butyrate, fasse pencher l'action du butyrate plutôt vers une action anti-inflammatoire. Les essais de suppléments directs avec du butyrate donnent souvent des effets décevants dans les essais cliniques chez l'humain. Au contraire, la consommation de fibres complexes est corrélée à un effet protecteur préventif, en relation avec la production d'acides gras à courtes chaînes par le microbiote dont le butyrate. Les fibres sont des prébiotiques qui favorisent la colonisation du tractus intestinal par certaines bactéries mais elles ne sont pas toujours suffisantes à enrayer des maladies souvent multifactorielles comme les MICI ou les cancers.

Notre travail met en évidence la capacité d'un large groupe de bactéries intestinales à réguler le gène et la protéine TGFB1 grâce à la production de butyrate. Il est possible que le microbiote émette d'autres métabolites ayant la capacité à moduler cette cytokine, cependant, vu les concentrations physiologiques des acides gras dans le côlon, il est probable que leur impact soit déterminant. Les effets physiologiques de la régulation de TGFB1 sont potentiellement nombreux du fait du caractère pléiotropique de la protéine. En fonction de sa concentration, TGFB1 favorise le contrôle de la réponse immune, la fonction de barrière de l'épithélium et la cicatrisation. Son rôle est critique et non redondant dans l'homéostasie intestinale comme cela a été montré récemment chez individus présentant une perte de fonction de TGFB1 sur les deux allèles (Kotlarz et al., 2018). L'inhibiteur de TGFB1, SMAD7 est fréquemment surexprimé chez les individus atteints de la maladie de Crohn ce qui induit une production non contrôlée de cytokines inflammatoires (Monteleone et al., 2008). Un inhibiteur de SMAD7, le Mongersen est actuellement à l'étude dans la maladie de Crohn pour restaurer les capacités de signalisation de TGFB1 (Ihara et al., 2017). Accompagnée de stratégies pour restaurer un microbiote équilibré, producteur de butyrate, la régulation de TGFB1 est aujourd'hui une cible thérapeutique intéressante pour les MICI.

Importance d'IDO1 dans le fonctionnement de l'intestin

L'indoleamine 2,3-dioxygénase est une enzyme qui permet la dégradation du tryptophane et la production de kynurénines. L'implication d'IDO1 dans l'homéostasie intestinale a été démontrée dans des travaux *in vitro* et *in vivo* (Ciorba, 2013; Yeung et al., 2015). Cette protéine favorise la différenciation des lymphocytes Treg et le maintien de cellules présentatrices d'antigènes tolérogènes, par des activités enzymatiques et non enzymatiques (Fallarino et al., 2012). L'exposition à un agent colitogénique a des effets plus sévères sur l'inflammation et réduit de manière plus importante le nombre de Treg dans des souris *IDO1*^{-/-} ou lorsque son activité enzymatique est inhibée (Gurtner et al., 2003; Takamatsu et al., 2013). Le niveau d'IDO1 est augmenté chez les patients atteints de MICI, tout comme différents facteurs qui contrôlent de la réponse immunitaire, tel que l'IL10 (Barceló-Batllori et al., 2002; Ferdinande et al., 2008). La littérature indique que les cellules dendritiques, sont une source importante d'IDO1, tout comme les cellules épithéliales lors des épisodes inflammatoires. Chez les patients atteints de MICI, les cellules épithéliales des zones ulcérées de l'intestin produisent un haut niveau d'IDO1. Notre travail montre qu'IDO1 est aussi exprimé, en dehors des épisodes inflammatoires, à l'état physiologique, dans les cellules épithéliales de parties saines du côlon et dans la *lamina propria* chez l'humain. Au regard de ces différents résultats, augmenter IDO1 dans les MICI ne semble

pas une piste thérapeutique prometteuse en soi, puisque les patients produisent déjà un haut niveau de molécules anti-inflammatoires (Ciorba, 2013; Wolf et al., 2004). Elle est pourtant envisagée par certains auteurs (Zhou et al., 2012).

Dans les cancers colorectaux, la moitié des patients présentent une forte expression d'IDO, ce qui a conduit à proposer que le niveau de kynurénines circulant, puisse être utilisé pour détecter la présence de tumeur. La forte expression d'IDO1 participerait à l'immunosuppression locale qui protégerait les tumeurs et est associée à un mauvais pronostic vital (Brandacher et al., 2006; Mangaonkar et al., 2017; Puccetti et al., 2015). En conséquence, des inhibiteurs enzymatiques d'IDO1 sont actuellement en essais cliniques afin d'augmenter l'efficacité des thérapies chimiques et des vaccins (Prendergast et al., 2017).

Régulation d'IDO1 par le microbiote

L'expression d'IDO1 dans l'intestin murin et humain, est dépendante de la présence du microbiote intestinal et de l'IFN γ (Harrington et al., 2008; Takikawa et al., 1999). IDO1 a trois fonctions : l'enzyme métabolise le tryptophane, ce qui a un effet sur les nombreux organismes auxotrophes pour cet acide aminé, elle produit des kynurénines qui sont métabolites antimicrobiens, et enfin la protéine agit comme un immunosuppresseur. Différentes bactéries pathogènes, des parasites et des virus modulent IDO soit en l'inhibant pour échapper à l'effet antimicrobien des kynurénines, soit en l'activant pour échapper à la réponse immunitaire. Ces stratégies ont été très bien résumées dans la revue de Yeung. Par exemple la bactérie spirochète *Borrelia burgdorferi*, l'un des agents de la maladie de Lyme, provoque la sécrétion d'IFN γ et la maturation des cellules dendritiques, ce qui stimule l'activité d'IDO et permet à la bactérie de se camoufler du système immunitaire (Yeung et al., 2015).

A notre connaissance, l'impact de seulement deux groupes de bactéries commensales sur IDO1 a été étudié : les *Lactobacillus* et les *Clostridiales*. Le gavage de rats qui développent spontanément un diabète, avec *Lactobacillus johnsonii*, inhibe IDO dans l'intestin, au niveau protéique, et diminue le catabolisme du tryptophane. De plus, *in vitro*, le surnageant de culture de *L. johnsonii* provoque le même effet sur des cellules intestinales humaines en culture (HT29). Les auteurs de cet article démontrent que c'est la forte concentration d'H₂O₂, présente dans les surnageants de lactobacilles qui bloque l'activité enzymatique d'IDO (Valladares et al., 2013). IDO1 oxyde l'indole présent sur le tryptophane grâce à l'hème de son cœur catalytique, or celui-ci est dénaturé en présence de peroxyde d'hydrogène. Lors de notre crible, nous n'avons pas observé d'effet inhibiteur des différentes espèces de *Lactobacillus* sur l'activité transcriptionnelle d'IDO1. A l'inverse, parmi les quelques espèces légèrement activatrices d'IDO1, figurent des lactobacilles dont *L. johnsonii*. Cette différence tient probablement au fait que l'équipe de Valladares étudie le métabolisme des lactobacilles en condition aérobie alors que nous les avons cultivés en condition anaérobie. D'autre part, ces travaux étudient la régulation d'IDO1 au niveau protéique alors que nous regardons l'effet au niveau de la transcription. Dans les conditions d'anoxie intestinale, les équilibres redox sont favorables à l'activité catalytique de l'enzyme. Cependant, lors des épisodes inflammatoires ou des infections, le niveau des espèces oxydantes augmente ce qui pourrait inhiber l'activité catalytique d'IDO1. Cependant, les informations cliniques concernant le niveau des kynurénines circulantes indiquent que le catabolisme du tryptophane n'est pas diminué dans les cancers et les MICI.

A l'opposé, l'équipe d'Atarashi et Honda a mis en évidence en 2011, la capacité des *Clostridiales* à restaurer le niveau d'IDO1 dans le côlon des souris axéniques. Plus précisément, ils ont montré que le niveau d'ARNm d'IDO1 augmente dans les cellules épithéliales de côlon des souris axéniques colonisées par un mélange de *Clostridiales*,

tandis que la colonisation avec un mélange de *Lactobacillus* n'a pas cet effet (Atarashi et al., 2011a). A notre surprise, nous n'avons pas retrouvé de bactéries activatrices d'*IDO1* dans notre crible. Parmi les *Clostridiales* testées, soit celles-ci n'avaient pas d'effet significatif sur *IDO1*, soit elles inhibaient fortement son expression dans les cellules épithéliales intestinales humaines (HT29). De plus nous avons montré que le butyrate, produit par les *Clostridiales* et les *Fusobacterium*, inhibe fortement l'expression *IDO1*. Plusieurs hypothèses complémentaires peuvent expliquer les différences de résultats. Une première possibilité est que les *Clostridiales* produisent des motifs microbiens, de la flagelline ou du peptidoglycane par exemple, qui, reconnus par les TLR, stimulent NFκB et les IRF. Or le complexe NFκB et les IRF stimulent la production des IFN, qui sont les voies les plus importantes pour l'activation de la transcription d'*IDO1*. Il est donc possible que l'augmentation d'*IDO1* chez la souris, résulte de l'activation de NFκB et des IFN dans les cellules épithéliales que nous ne détecterions pas faute d'une concentration suffisante ou de récepteurs non exprimés par les HT29. Les auteurs ont montré que l'induction des Treg par les *Clostridiales* est indépendante de *MYD88*, mais ils n'ont pas démontré que l'augmentation d'*IDO* est elle aussi indépendante de cette voie de signalisation. D'autre part, *in vivo*, les côlonocytes métabolisent le butyrate, ce qui participe probablement à diminuer son impact transcriptionnel.

La seconde hypothèse est que les *Clostridiales* ne produisent cet effet sur *IDO* que lorsqu'elles sont cultivées en consortium. Nous avons cherché à identifier les bactéries qui pouvaient, individuellement, moduler des voies de signalisation dans les cellules épithéliales humaines. Dans sa première publication en 2011, l'équipe de Honda a montré qu'un mélange de 46 souches, dont ils n'ont pas précisé l'affiliation taxonomique, activent *IDO1* et *TGFB1*. Dans leur seconde publication en 2013, ils ont montré qu'un consortium de 17 bactéries induit toujours *TGFB* mais ils n'évoquent pas l'effet sur *IDO1*. Nous avons cultivé 10 espèces de bactéries présentes dans le mélange des 17 bactéries. Les 7 autres bactéries du mélange n'ont pas d'affiliation taxonomique et ne sont pas présentes en banque, et donc, pour ces raisons nous n'avons pas pu les cultiver. Il est possible que, lorsque ces *Clostridiales* sont cultivées ensemble, ces bactéries produisent des molécules qui ne sont pas présentes lorsqu'elles sont seules, ou en trop faible concentration (quorum-sensing, bactériocines, toxines, par exemple). On peut faire l'hypothèse que ce sont ces molécules qui, dans l'étude de l'équipe japonaise, impactent *IDO1* peut être indirectement dans les cellules épithéliales. Nous avons effectué quelques tests de culture de bactéries de différentes espèces en mélange. Pour *TGFB1* et *IDO1*, les surnageants issus de ces cultures mixtes ont donné des résultats équivalents, à ceux obtenus avec les surnageants des bactéries cultivées seules, avec de fortes concentrations d'acides gras à chaînes courtes. La difficulté de ces expériences est qu'en raison des différences de taux de croissance des bactéries et des phénomènes de concurrence, il est difficile de savoir quelles sont les espèces réellement présentes dans la culture et dans quelles proportions, sans avoir recours à du séquençage systématique.

A notre connaissance, l'impact sur *IDO1* de bactéries appartenant à d'autres groupes du microbiote intestinal n'a pas été exploré. Il serait intéressant d'étudier l'effet des métabolites de bactéries non productrices d'acide gras à chaînes courtes comme les *Lactobacillus*, certains *Bacteroides*, les *Bifidobacterium* ou encore les *Prevotella* pour mieux comprendre le rôle de cette protéine dans la tolérance du microbiote par le système immunitaire intestinale.

Mécanisme de régulation d'IDO1

Plusieurs équipes ont montré que des inhibiteurs de HDAC, dont le butyrate, inhibe IDO1. Deux publications montrent que le butyrate provoque la diminution d'IDO dans des lignées de carcinome nasopharyngé et de vésicule biliaire (He et al., 2013; Jiang et al., 2010; Zhang et al., 2013). Dans ces modèles, le butyrate inhibe la phosphorylation de STAT1, ce qui bloque l'induction d'IDO par l'IFN γ . Le mécanisme que nous avons mis en évidence est plus complexe puisque le butyrate diminue le niveau basal de STAT1, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'effet de stimulation de l'IFN γ . De plus dans notre modèle, l'inhibition de STAT1 n'est pas corrélée à une diminution transcriptionnelle, ce qui suggère que la diminution de la protéine serait plutôt la conséquence de modifications post-traductionnelles. Un mécanisme similaire a été décrit récemment dans des cellules gliales où le butyrate inhibe le niveau basal de la protéine STAT1 (Patnala et al., 2017). Plusieurs types de modifications de STAT1 ont été décrits : ubiquitination, acétylation ou encore SUMOylation (Ginter et al., 2012; Icardi et al., 2012; Maarifi et al., 2015)

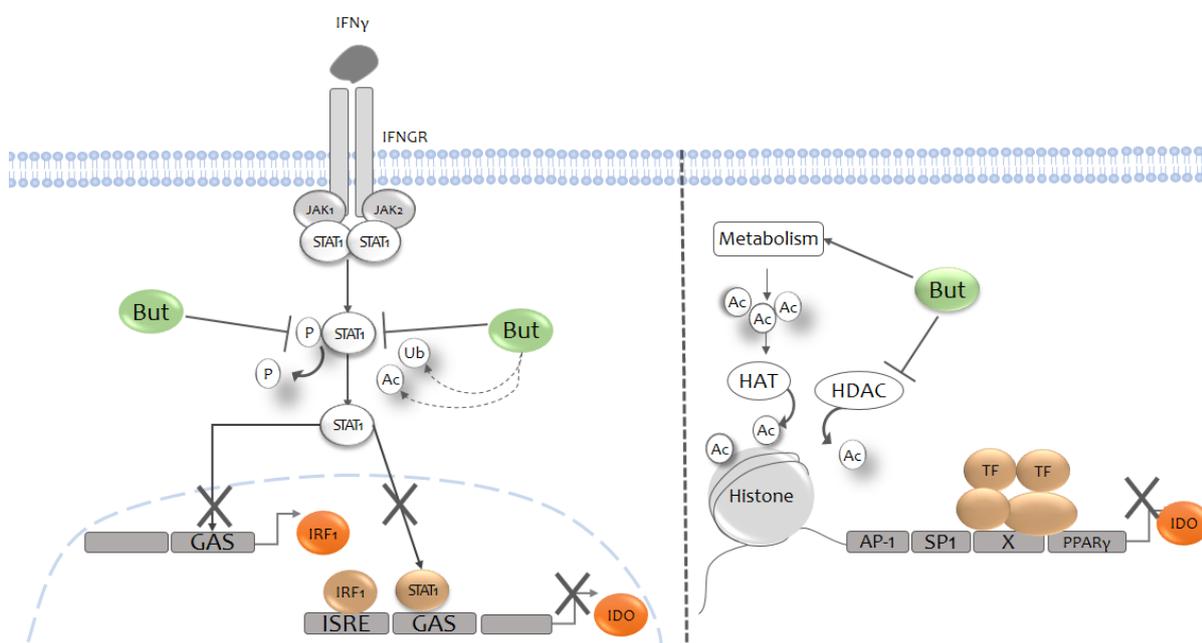


Figure III-2 : Schéma récapitulatif des mécanismes de régulation d'IDO1, dépendant de l'IFN γ et indépendant, dans les cellules HT29.

Nous montrons par ailleurs, que le butyrate contrôle l'activité du promoteur par un mécanisme indépendant de STAT1 et de l'IFN γ . Cet effet repose probablement sur une augmentation de l'acétylation des histones entourant le gène *IDO1* et/ou de l'acétylation de protéines intervenant dans la régulation la transcription. Pour décrire de manière plus détaillée ce second mécanisme, nous pourrions réaliser des immuno-précipitations de la chromatine afin de déterminer les molécules impliquées et leur niveau d'acétylation.

IDO1 peut être induit par d'autres voies que celle de l'IFN γ . Le facteur de transcription AHR et IDO sont liés par des relations d'interdépendances (Jaronen and Quintana, 2014). D'un côté, AHR est activé par différents ligands provenant de l'environnement et de l'hôte. Les dérivés du tryptophane, comme la L-Kynurénine, produits par IDO1 font partis de ces ligands endogènes. D'un autre côté, AHR régule IDO1 par une boucle autocrine qui implique l'IL6 et STAT3 (Li et al., 2016; Litzenburger et al., 2014). Une équipe a montré que le haut niveau d'expression d'IDO1 dans les cellules tumorales, repose sur l'activation d'AHR qui augmente l'expression de l'IL6. La liaison de cette cytokine à son récepteur provoque la phosphorylation et l'acétylation de STAT3, qui transloque dans le noyau, où il

se lie au promoteur d'*IDO1*. Le promoteur d'*IDO1* contient 3 motifs de liaison à STAT3 fonctionnels. L'activation d'*IDO1* augmente le catabolisme du tryptophane et donc génère des ligands se liant à AHR, qui promeut à son tour *IDO1* dans une boucle activatrice. Nos travaux indiquent que cette boucle n'est pas présente dans notre modèle : ni la stimulation d'AHR par d'autres ligands que le tryptophane, ni l'IL6 n'active le promoteur d'*IDO1*. De plus l'inhibition de JAK2/STAT3 n'a pas d'effet sur le niveau basal d'IDO ni sur l'inhibition provoquée par le butyrate. La régulation d'IDO1 semble donc être différente d'une lignée cellulaire à l'autre. La protéine IDO1 comprend deux domaines ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) qui sont phosphorylés en présence de cytokines inflammatoires, comme l'IL6. La phosphorylation des domaines ITIM permet l'interaction avec la protéine SOCS3 qui induit la dégradation d'IDO1 par le protéasome permettant de réguler la boucle d'auto-activation décrite précédemment (Fallarino et al., 2012; Orabona et al., 2008).

A l'inverse dans un contexte où l'IL6 est absente, et dominé par TGF β , IDO peut être phosphorylée par la kinase FYN ce qui stimule des voies de signalisation différentes comme la voie non canonique de NF κ B, qui renforce la tolérance immunitaire sur le long court (Grohmann et al., 2001). Si IDO2 partage avec IDO1 les activités catalytiques du tryptophane, il semble que seule IDO1 ait des activités de signalisation indépendantes de son activité enzymatique. Or l'activation de différentes voies de signalisation est liée à la capacité d'IDO1 à maintenir un environnement tolérogène, sur de longue période (Pallotta et al., 2011). En nous focalisant sur la régulation transcriptionnelle, nous n'avons pas accès aux différentes modifications subies par la protéine IDO1. Il serait donc intéressant de compléter le travail présenté ici par des analyses de la régulation protéique d'IDO1 dans les cellules épithéliales intestinales.

Le butyrate : un immuno-modulateur majeur de l'écosystème intestinal

Les effets des acides gras à chaînes courtes ont fait l'objet de nombreuses études, tant au niveau intestinal qu'au niveau systémique. Ces travaux montrent la grande variété des cibles moléculaires du butyrate, qui peut modifier de manière globale le niveau d'acétylation des histones et celui d'ubiquitination des protéines. Étonnamment, en même temps, il régule de manière spécifique, certaines voies de signalisation. Un de ses effets majeurs semble être le blocage des voies de signalisation de l'inflammation. En effet, il bloque la signalisation des principaux médiateurs de la réponse inflammatoire, tels que TNF α , IFN γ , IL6, IL8 ou NOS2, tout en stimulant l'IL10 et TGFB. Cet acide gras bloque la différenciation, l'activation et la migration des cellules au profil pro-inflammatoire : cellules dendritiques, macrophages M2, Th1, Th2, ILC (Meijer et al., 2010). De plus en activant les GPR43 et GPR109a, le butyrate favorise la différenciation des T régulateurs. Son action sur les lymphocytes T régulateur passe principalement par l'inhibition des HDAC de classe I et IIa, ce qui stimule l'expression du facteur de transcription FOXP3 (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013). Cependant, il est intéressant de noter que l'administration de butyrate seul, chez des souris axéniques, ne restaure pas le niveau de Treg. Cela suggère que le butyrate agit en complément d'autres mécanismes, dont l'engagement du TCR par des signaux microbiens (Ohnmacht et al., 2015; Sefik et al., 2015). L'importance du butyrate dans le contrôle de l'inflammation est soutenue par le fait que, chez les individus porteurs d'un microbiote dysbiotique, il y a une corrélation entre la baisse des bactéries productrices des acides gras à chaînes courtes tels que les *Clostridiales*, la diminution du nombre de Treg et l'augmentation des cytokines inflammatoires (Buttó et al., 2015).

Disease	Sample source	Phylum	Family	Species	possible mechanisms
Decreased beneficial bacteria					
UC and CD	Ileum, Fecal	Firmicutes	Clostridiaceae	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Butyrate↓, anti-inflammatory effect ↓ (IL-10↓, NF-IL-12↑, IFN γ ↑, TNF- α ↑, IL-8↑, NF- κ B activation)
UC	Fecal	Firmicutes	Lachnospiraceae	<i>Roseburia hominis</i>	Butyrate↓
CD	Fecal	Firmicutes	Eubacteriaceae		Butyrate↓
CD	Fecal	Firmicutes	Veillonellaceae	<i>Dialister invisus</i>	Propionate↓, acetate↓
CD	Fecal	Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus albus</i>	Cellulose degradation↓, Acetate
CD	Fecal	Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus callidus</i>	Polysaccharides degradation↓ (e.g. starch, xylan)
CD	Fecal	Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus bromii</i>	Polysaccharides degradation↓ (e.g. starch, xylan)
UC and CD	Ileum, Fecal	Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Butyricoccus</i> spp.	Butyrate↓
UC and CD	Ileum, Fecal	Firmicutes	Lachnospiraceae	<i>Anaerostipes</i> spp.	Butyrate ↓
UC and CD	Ileum, Fecal	Firmicutes	Lachnospiraceae	<i>Dorea</i> spp.	Formate↓, acetate↓
UC and CD	Ileum, Fecal	Actinobacteria	Coriobacteriaceae	Coriobacteriaceae spp.	Lactate↓, formate↓, acetate↓
UC and CD	Fecal	Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> spp.	Folate↓, Treg↓
CD	Fecal	Bacteroidetes	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides fragilis</i>	Immune system (Th1/Treg balance) disruption, <i>Helicobacter hepaticus</i> -induced colitis↓
CD	Fecal	Bacteroidetes	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Escherichia coli</i> -induced colitis↓
Increased pathobionts					
CD	Ileum	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i> (AIEC)	Pro-inflammatory cytokines↑ (IL-6, IL-12, IL-23, IL-17, TNF- α)
UC and CD	Colon	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>pkS+ Escherichia coli</i>	Colibactin↑, DNA damage↑
UC and CD	Colon	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i> spp.	Colitogenic bacteria in TRUC mice
CD	Colon, Ileum	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> spp.	Epithelial cell damage↑
UC and CD	Fecal	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Salmonella</i> spp.	Immune system (Th1/Th2 balance) disruption
UC and CD	Fecal	Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	Sulfate-reducing bacteria (e.g. <i>Bilophila wadsworthia</i> , <i>Desulfovibrio</i> spp., <i>Desulfuromonas</i> spp)	H2S↑, toxic product↑, butyrate↓, immune system (Th1) disruption
UC and CD	Fecal, Colon	Proteobacteria	Campylobacteraceae	<i>Campylobacter concisus</i>	IL-8↑, pro-inflammatory effect↑ (e.g. IL-6↑, IL-12, TNF- α , NF- κ B activation)
UC and CD	Fecal	Proteobacteria	Campylobacteraceae	<i>Campylobacter jejuni</i>	IL-8↑, Proinflammatory effect↑ (e.g. IL-1b↑, TNF- α ↑)
UC and CD	Fecal	Bacteroidetes	Bacteroidaceae	Enterotoxigenic <i>Bacteroides fragilis</i>	Toxin↑, Epithelial cell function disruption, pro-inflammatory cytokines↑ (e.g. IL-8)
CD	Fecal	Actinobacteria	Coriobacteriaceae	<i>Atopobium parvulum</i>	H2S↑, mitochondrial function disruption
UC and CD	Fecal	Firmicutes	Clostridiaceae	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium scindens</i> ↓, primary bile acids↑, secondary bile acids↓

Figure III-3 : Tableau résumant les implications connues des différentes bactéries dans les MICI ainsi que les mécanismes proposés. Les Clostridiales sont encadrés en vert. Encadré en vert. Adapté de Nagao-Kitamoto et Kamada 2017

Les côlonocytes ont un lien particulier avec le butyrate, car celui-ci constitue à la fois un substrat énergétique et une molécule régulatrice qui agit sur la signalisation cellulaire et la transcription en modifiant le niveau d'acétylation et d'ubiquitination des protéines. Ainsi nous avons montré que le butyrate, qui est sécrété abondamment par certaines bactéries du microbiote intestinal, augmente la transcription et la production de la protéine TGF β 1 au niveau des cellules épithéliales. Cette protéine ubiquitaire est impliquée dans de nombreux processus physiologiques, en particulier dans la différenciation, la cicatrisation et l'immunité. Ces trois fonctions sont essentielles au renouvellement et au maintien de la barrière intestinale, ainsi qu'au contrôle de la réponse immunitaire par le microbiote. Par leur sécrétion de TGF β , les cellules épithéliales intestinales participent à la formation d'un environnement immunologique favorable à la différenciation, le développement et le maintien des lymphocytes Treg.

Le butyrate favorise l'expression d'autres molécules impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire intestinale. Notre équipe et d'autres ont montré, que le butyrate active le facteur de transcription AHR dans les cellules épithéliales intestinales humaines (Marinelli, article soumis 2018). En plus de son rôle régulateur d'IDO, évoqué auparavant, AHR favorise la différenciation des lymphocytes T régulateur FOXP3⁺ et des Tr1 FOXP3⁻ (Gandhi et al., 2010). Ce facteur de transcription est fortement exprimé par les Th17 et les ILC de la *lamina propria* qui sécrètent l'IL22, cytokine qui induit la production de peptides antimicrobiens et favorise la régénération des cellules épithéliales de l'intestin (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008).

Des travaux menés précédemment dans notre laboratoire ont contribué, à montrer que le butyrate active le facteur de transcription PPAR γ dans les côlonocytes. L'activation de PPAR γ participe au maintien de l'homéostasie intestinale en contrôlant les voies de signalisation inflammatoires ainsi que le niveau de nitrate et d'oxygène (Byndloss et al., 2017; Kelly et al., 2004; Nepelska et al., 2017).

De plus, une équipe a récemment montré que le butyrate augmente la production d'acide rétinoïque dans les cellules épithéliales intestinales, active la transcription des enzymes *ALDH1* et *ALDH3*, qui transforment le rétinol alimentaire en acide rétinoïque (Goverse et al., 2017; Schilderink et al., 2016). L'acide rétinoïque joue un rôle complémentaire à TGF β 1 en contribuant à former un environnement qui favorise la différenciation en Treg plutôt qu'en Th17. En outre, en présence de butyrate, les cellules dendritiques présentent un phénotype tolérogène et produisent à leur tour de l'acide rétinoïque, qui polarise les lymphocytes T en Tr1 et en Treg (Tan et al., 2016a; Zhang et al., 2016).

L'ensemble de ces éléments montrent que le butyrate induit un phénotype tolérogène dans les cellules épithéliales et les cellules immunitaires de l'intestin. C'est pourquoi, la mise en évidence de l'inhibition d'*IDO1* par le butyrate, peut paraître une anomalie. Du fait de son rôle catalytique, *IDO1* doit être finement régulée dans la muqueuse intestinale afin de ne pas provoquer la consommation de tout le stock de tryptophane cellulaire, ce qui serait délétère pour les cellules. D'autre part, le catabolisme de cet acide aminé produit des molécules qui sont toxiques pour les microbes mais aussi pour les cellules eucaryotes. Ainsi, il a été montré dans le système nerveux que les kynurénines ont un effet délétère par la production de radicaux libres et le contrôle de l'activité du récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Ces métabolites sont également suspectés d'avoir un rôle dans le développement de maladies dégénératives du système nerveux (Huntington, Parkinson, Alzheimer) et de maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, lupus systémique et syndrome de Sjögren). *IDO1* n'est pas être la principale enzyme synthétisant des

kynurénines puisque différentes publications montrent que c'est l'enzyme TDO qui contrôle la majeure partie du catabolisme du tryptophane. Cependant, seule IDO1 est régulée par les signaux microbiens et les molécules inflammatoires endogènes et de ce fait, c'est sur IDO1 et non sur TDO que se focalisent les efforts thérapeutiques pour limiter l'impact délétère du métabolisme du tryptophane (Badawy, 2017; Vécsei et al., 2013). Dans ce contexte, la stimulation continue d'IDO1 par les signaux microbiens pourrait être bénéfique localement afin que le système immunitaire intestinal ait une réponse adaptée au microbiote tout en ayant des conséquences néfastes au niveau systémique. Etudier les conditions du maintien de l'équilibre entre immunosuppression et production de métabolites toxiques, constitue une piste de recherche pertinente pour mieux comprendre le sens physiologique de l'inhibition d'IDO1.

Les effets du butyrate sur la physiologie de l'intestin dépendent de l'état de différenciation des cellules épithéliales. Dans le côlon, cet acide gras est plus concentré dans la partie luminale et au niveau du plateau strié, tandis qu'il ne serait très peu présent dans les cryptes intestinales. Une équipe a élégamment montré que l'effet antiprolifératif du butyrate sur les cellules cancéreuses, peut également être observé sur les cellules souches. Le gradient de concentration entre la lumière et le fond des cryptes protège les cellules souches et leur permet d'assurer le renouvellement de l'épithélium et sa cicatrisation. Dans ces cellules souches, le butyrate agit, indépendamment des GPR, via l'inhibition des HDAC, et augmente la liaison du facteur de transcription FOXO3 à l'ADN (Kaiko et al., 2016). Kaiko *et al*, font l'hypothèse dans cette publication, que les profonds replis de la structure intestinale, qui constituent les cryptes chez les mammifères, sont une adaptation à la présence de bactéries productrices, entre autres, d'acide gras à chaînes courtes. Le niveau d'oxygène est plus élevé au niveau du fond des cryptes qu'au niveau de l'apex, ce qui explique que les cryptes soient colonisées par un microbiote spécifique composé de bactéries aérobies et anaérobies chez la souris comme chez l'humain (Pédron et al., 2012; Swidsinski et al., 2005). *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* et *Delftia* sont des genres des *Proteobacteria*, aérobies, présentent fréquemment dans les cryptes coloniques de la souris ainsi que l'espèce anaérobie *B. fragilis*. Or, ces espèces ne produisent pas de butyrate, ce qui renforce l'hypothèse d'une adaptation importante de la structure de l'intestin à la présence des bactéries.

Le butyrate n'est pas seulement un intermédiaire du dialogue hôte-microbiote et un substrat métabolique des cellules épithéliales. Certains pathogènes se sont adaptés et tirent profit de la production du butyrate par les bactéries du microbiote. En effet, la plupart des bactéries pathogènes ne produisent ni butyrate ni propionate. Ainsi certaines espèces de salmonelles qui sont des pathogènes intestinaux, comme *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sont capables d'utiliser le butyrate comme substrat énergétique via la β -oxydation, et cette capacité est corrélée à une faible pathogénicité. L'utilisation du butyrate par *S. Typhimurium* diminue la population de *Clostridiales* dans le côlon à la fois par compétition des ressources énergétiques et par l'augmentation de l'oxygénation intestinale (Rivera-Chávez et al., 2016). A l'inverse, *Salmonella enterica* serovar Typhi et Paratyphi, deux pathogènes systémiques, ont subi une perte de fonction de l'opéron qui ne leur permet plus d'utiliser le butyrate. Cette mutation paraît liée à un phénotype plus invasif et plus inflammatoire où la bactérie passe de la niche intestinale à la dissémination extra-intestinale (Bronner et al., 2018).

En résumé, les acides gras à chaînes courtes, et le butyrate en particulier, sont des métabolites secondaires bactériens impliqués dans le dialogue entre l'hôte et le microbiote. Leurs effets sont importants aux niveaux de la

muqueuse intestinale et bien au-delà. Ces molécules agissent sur les cellules eucaryotes par différents mécanismes : activation de récepteurs, métabolisme, inhibition des HDAC, modification post-transcriptionnelles. Dans leur ensemble, ils concourent au maintien au niveau de l'intestin d'une réponse inflammatoire physiologique et contrôlée. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact du microbiote sur l'hôte. Cependant, l'hôte n'est pas le receveur passif des signaux microbiens. A travers son système immunitaire, inné et adaptatif, l'organisme favorise le maintien d'un écosystème qui lui est bénéfique. Le butyrate est une molécule centrale dans cet équilibre.

IV.NFκB, gardien ambivalent de l'homéostasie intestinale

Le facteur de transcription NFκB a un rôle de premier plan dans la régulation des gènes de l'immunité innée et adaptative, de la survie et de la prolifération dans les cellules épithéliales de la peau et de l'intestin. La présence de pathogènes ou de dommages dans les tissus, reconnus par les PRR, déclenche différentes voies de signalisation qui provoquent la translocation du complexe NFκB dans le noyau. La liaison du complexe NFκB à l'ADN permet la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire, caractérisée, par la sécrétion de cytokines et des chimiokines qui favorisent l'infiltration des neutrophiles et des polynucléaires dans la zone inflammatoire et amplifient la réponse immunitaire innée. Si cette réponse pro-inflammatoire est mal contrôlée, l'hyperactivité de la voie de signalisation de NFκB peut provoquer une inflammation chronique (Zilberman-Rudenko et al., 2016). A côté de ces fonctions pro-inflammatoires très documentées, NFκB joue un rôle essentiel dans la protection de l'intégrité de la barrière intestinale. Ce facteur de transcription régule les gènes de la survie et de la prolifération cellulaire et la sécrétion de cytokines protectrices, notamment TSLP, IL10 ou TGFB.

L'hypo-activité de NFκB dans les cellules épithéliales intestinale est, de manière contre-intuitive, associée à une augmentation de l'inflammation dans certaines conditions (Eckmann et al., 2008; Zaph et al., 2007). Les souris dont les activateurs de NFκB, *IKKβ*, *IKKγ* (*Nemo*) ou *RelA* (p65) sont mutés au niveau systémique, meurent quelques jours après la naissance. La délétion de l'un de ces trois gènes dans les cellules épithéliales, entraîne une apoptose massive, associée à une inflammation sévère de l'intestin (Li et al., 1999; Nenci et al., 2007). L'importance de la fonction d'IKKβ dans les cellules épithéliales de l'intestin a été démontrée par un ensemble de publications. Ainsi, lors d'une infection avec le parasite *Trichuris*, l'inhibition ou la délétion d'IKKβ dans les cellules épithéliales intestinales entraîne une exacerbation de la réponse inflammatoire liée à l'IFN et à l'IL17, ainsi qu'à un déficit de sécrétion de TSLP, une cytokine nécessaire au contrôle de l'inflammation chronique (Zaph et al., 2007). La capacité d'IKKβ à limiter l'inflammation intestinale a également été démontrée dans un modèle de colite aigue chez la souris. L'activation d'IKKβ dans l'épithélium intestinale favorise la cicatrisation du tissu et l'intégrité de la barrière intestinale en limitant l'apoptose via STAT3 et HSP70 et en recrutant des cellules immunitaires produisant de l'IL11 et de l'IL22 (Eckmann et al., 2008). De même, le rôle du facteur NEMO dans l'intestin a été bien documenté, ce qui a permis de démontrer que l'activation de NFκB via NEMO est essentielle à l'intégrité de la barrière intestinale. Ainsi NEMO inhibe la mort cellulaire induite par la voie de signalisation du TNFα en bloquant RIPK1. En son absence, les bactéries pénètrent anormalement dans la muqueuse colonique et alimentent l'inflammation en libérant des motifs microbiens reconnus par les PRR. Ce rôle protecteur n'est pas restreint au côlon puisque des travaux utilisant des délétions conditionnelles des IKK chez la souris, montrent que l'activation de NFκB par NEMO dans l'intestin grêle, diminue l'apoptose et la nécrose des cellules épithéliales, en particulier des cellules de Paneth (Vlantis et al., 2016). Ces travaux chez la souris concordent avec les observations cliniques qui montrent que les humains porteurs de mutations de NEMO développent des dysplasies et de sévères immunodéficiences accompagnées d'infections. Un quart d'entre eux, souffrent de colites et de maladies inflammatoires qui peuvent être soignées par des anticorps neutralisant le TNFα (Hanson et al., 2008; Kawai et al., 2012; Paciolla et al., 2015). Ces résultats indiquent que le TNF provoque des colites chez la souris et chez l'humain en lorsque la régulation de NFκB par NEMO est déficiente. Dans les MICI, l'épithélium est souvent atteint de nécrose et les traitements anti-TNFα sont

efficaces pour réduire la destruction de la muqueuse et diminuer la perméabilité intestinale. Bien que NEMO ne soit pas un facteur de risque dans ces maladies, Vlantis *et al.* font l'hypothèse que RIPK1 pourrait être impliqué dans le rôle délétère du TNF α dans les MICI.

Le rôle de NF κ B, dans les inflammations aiguës et chroniques, est ambivalent. Certaines données montrent une activation de ce facteur de transcription, dans les biopsies des sites actifs du côlon des patients atteints de la maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique, comparées aux biopsies contrôles (Ellis *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998). Des travaux plus récents mettent en évidence une corrélation entre le niveau d'activation de NF κ B et le degré de sévérité de la maladie de Crohn (Han *et al.*, 2017b). Ces résultats sont en faveur d'un rôle délétère de NF κ B dans ces pathologies. Par ailleurs, la contribution des TLR à l'inflammation induite par le DSS dans les cellules épithéliales est débattue. Certaines études montrent que l'absence de MYD88, et donc de l'activité des TLR, n'a pas d'effet sur l'inflammation chez les souris. D'autres travaux mettent en évidence qu'en l'absence de MYD88, le dysfonctionnement de la barrière intestinale sensibilise les souris au DSS (Kirkland *et al.*, 2012; Malvin *et al.*, 2012). Différentes équipes ont aussi mis en évidence un rôle de IKK β et de NEMO dans la protection et la résolution de l'inflammation dans les cellules épithéliales intestinales (Chen *et al.*, 2003; Nenci *et al.*, 2007). La protéine TRAF6 participe à l'activation de NEMO et d'IKK β . Or, les équipes de Pasparakis et Wullaert ont démontré qu'en l'absence de l'ubiquitine ligase TRAF6, les souris développent une réponse inflammatoire exacerbée au DSS. Le traitement aux antibiotiques des souris déficientes en TRAF6 diminue le niveau d'inflammation à un niveau comparable aux souris non mutées. Ces données indiquent que TRAF6 protège l'épithélium des inflammations induites par le microbiote. Dans cette publication, l'absence de *MYD88* et de *TRIF* n'entraîne pas l'augmentation de l'inflammation, indiquant que la voie des TLR n'est pas impliquée dans ce rôle protecteur. TRAF6 semble intervenir non pas dans la réparation de l'épithélium mais plutôt en stimulant une réponse anti-inflammatoire ou en favorisant l'intégrité de la barrière intestinale. D'autres travaux indiquent également que TRAF6 a un effet protecteur dans les cellules dendritiques qui contribue à l'homéostasie dans l'intestin grêle, indépendamment de MYD88 (Han *et al.*, 2013). Les molécules produites par le microbiote n'ont pas été identifiées dans ces deux études.

C'est dans ce contexte, que nous avons entrepris ce travail de thèse, avec l'ambition d'identifier certains mécanismes par lesquels les bactéries du microbiote régulent l'immunité innée dans les cellules épithéliales intestinales. Nous avons montré que des bactéries appartenant à différents genres et phyla secrètent des molécules qui activent NF κ B. Ces résultats ont confirmé un précédent travail mené dans notre laboratoire lors d'un crible plus restreint (Lakhdari *et al.*, 2011). De plus, en mutant la voie des TLR, il a été possible de distinguer plusieurs profils différents parmi ces bactéries. Toutes les bactéries commensales n'activent pas les mêmes voies de signalisation. Un premier groupe de commensales produit des ligands qui se lient aux TLR et activent la voie MYD88. Afin d'identifier les bases moléculaires de l'effet protecteur du microbiote indépendant de MYD88 publié par les groupes de Pasparakis et Wullaert, nous nous sommes intéressés aux bactéries dont l'activité est indépendante des TLR. Nous avons ainsi montré, qu'un second groupe de commensales produit des molécules qui stimulent NOD1 et NF κ B. Ce deuxième groupe est formé de *Clostridiales* et d'*Akkermansia muciniphila*. Enfin, un dernier groupe de bactéries produit dans le milieu extra-cellulaire des molécules qui activent la voie de signalisation ALPK1-TIFA-TRAF6. Ce groupe comprend des *Fusobacterium* et *Akkermansia muciniphila*. A l'issue de ces travaux, nous avons identifié des bactéries du microbiote qui activent deux voies de signalisation indépendantes de MYD88. Afin de savoir si la voie

ALPK1-TIFA-TRAF6 est impliquée dans l'effet protecteur de NFκB observé par les deux publications démontrant un rôle protecteur de TRAF6, il serait intéressant d'étudier leur impact sur l'épithélium intestinal soumis à stress inflammatoire, de type DSS ou TNBS (Han et al., 2013; Vlantis et al., 2015). Nous pouvons faire l'hypothèse que ces bactéries contribuent à l'homéostasie intestinale à la fois en induisant un état d'inflammation « physiologique » de l'intestin à l'état basal, et lors d'une inflammation, en contrôlant la réaction inflammatoire via TRAF6 ou NEMO.

Quel est le rôle de la voie ALPK1-TIFA-TRAF6 dans l'homéostasie intestinale ?

La voie ALPK1-TIFA-TRAF6, ou voie TIFA, est impliquée dans la mise en place de la réponse immunitaire innée face à des bactéries pathogènes. L'unique activateur bactérien connu à ce jour de cette voie, l'heptose biphosphate, induit l'activation de NFκB, qui augmente la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales intestinales. Certains auteurs proposent que l'activation de la voie TIFA, permette aux cellules épithéliales de détecter spécifiquement les bactéries intracellulaires qui se répliquent dans le cytosol (Gaudet et al., 2017). Les PRR comme NOD1 sont sensibles à la présence de motifs bactériens, que les bactéries soient actives ou quiescentes. En plus de cette spécificité, cette voie pourrait avoir d'autres fonctions puisqu'elle est aussi activée par des bactéries extracellulaires comme *N. gonorrhoeae* et *H. pylori*. De manière intéressante, l'activation de la voie TIFA, peut se propager de la cellule initialement activée vers les cellules qui l'entoure, via les connexines. Ce faisant, des zones importantes de l'épithélium peuvent être régulées à partir d'une activation localisée. Au cours de cette thèse, nous avons montré pour la première fois que des bactéries du microbiote intestinal sont capables de stimuler cette voie via la sécrétion de molécule(s) dans le milieu extra-cellulaire. Ces résultats suggèrent que cette voie pourrait avoir en plus de la défense de l'organisme contre des pathogènes, une fonction dans l'homéostasie intestinale.

La colonisation de souris axénique par la bactérie SFB conduit à l'augmentation de lymphocytes Th17, de cytokines, chimiokines et de peptides antimicrobiens, qui aident l'hôte à se protéger en cas d'infection par *C. rodentium*. A la manière de SFB, il est possible que l'activation de TIFA par les bactéries intestinales permette d'augmenter la réactivité immunitaire de l'hôte contre des agents infectieux. On peut également envisager que TIFA ait des fonctions homéostatiques qui ne soient pas directement liées à la lutte contre les organismes pathogènes.

La protéine TIFA est exprimée dans la plupart des tissus murins et humains, avec un niveau plus important dans les tissus immunitaires et endocrines. Elle est présente à la fois dans le cytosol et dans le noyau cellulaire. D'après le travail de Gaudet *et al* en 2017, *TIFA* est légèrement plus exprimé dans l'intestin grêle que dans le côlon chez la souris et chez l'humain. Ces données sont cohérentes avec les profils du consortium Human Protein Atlas. L'expression de *TIFA* dans l'intestin grêle est liée à la colonisation par le microbiote comme le montre le travail de l'équipe de Bäckhed (Larsson et al., 2012). Les données existantes ne permettent pas de savoir s'il existe une différence d'expression entre les cellules épithéliales et celles de la *lamina propria*. L'expression de TIFA dans le tractus digestif, assez peu compartimentée, n'apporte pas d'informations supplémentaires directes sur les fonctions de cette protéine. A la différence des tissus primaires, l'expression de TIFA est très variable selon les lignées cellulaires transformées.

Les publications concernant ALPK1 constituent des indices du rôle potentiel de la voie TIFA dans le fonctionnement de l'intestin. *ALPK1* et *TIFA* sont des gènes directement voisins, sur le chromosome 4 chez l'humain

et le chromosome 3 chez la souris, ce qui pourrait indiquer une co-régulation. *ALPK1* est une kinase qui participe au tri et au transport des protéines du réseau golgien vers la membrane apicale. Son premier substrat connu est la myosine IA et IIA. Une analyse globale de génome (GWAS) a révélé que la région d'*ALPK1* est associée à une forte augmentation du risque de développer la goutte, dans certaines populations (Cheng et al., 2004; Wang et al., 2011). Ce lien est corroboré par le fait que l'expression d'*ALPK1* est supérieure dans les leucocytes sanguins des personnes atteintes de la goutte, comparées à des individus non-malades. D'autre part, une étude à la recherche de gènes favorisant le passage de l'inflammation à la tumorigénèse dans le côlon, a identifié un large locus, « *Hiccs* » contenant 8 gènes dont *Larp7*, *Neurogenin 2*, *ALPK1* et *TIFA*. Cette étude a établi que ce locus contrôle le recrutement de lymphocytes T innés (ILC) et la production d'IL17, IL22, IFN γ et de MIP. Il semble que les souris exprimant plus fortement *ALPK1* soient plus sensibles à l'inflammation. Aucune différence majeure n'est perceptible au niveau de *TIFA* dans cette étude (Boulard et al., 2012). Le lien entre ce locus et les MICI reste à explorer car les études GWAS ne peuvent prendre en compte de vastes loci impliquant des variants rares. Enfin, *ALPK1* est inhibé dans les cancers du poumon et du côlon chez l'humain par différentes mutations qui favorisent sur la migration cellulaire (Liao et al., 2016). Comme discuté dans la partie précédente, la protéine TRAF6 est impliquée dans la voie de signalisation TIFA mais elle a d'autres rôles car elle participe à un grand nombre de voies de signalisation, telles que celles des TLR, des récepteurs de la famille de l'IL1, du TNF, de TGF β , des récepteurs de lymphocytes, etc. (Landström, 2010; Walsh et al., 2015). Il est possible que TIFA soit impliquée dans les fonctions protectives de TRAF6, indépendante des TLR, lors d'inflammation dans le côlon comme le suggère de travail de *Vlantis et al*, bien que cette hypothèse reste à tester (Vlantis et al., 2015).

En plus des travaux précédemment discutés, il a été montré que TIFA est activé en réponse à des signaux endogènes de stress et d'inflammation dans les cellules endothéliales par un autre mécanisme. Les phospholipides oxydés, l'angiotensine II, ou le LDL (Low-density lipoprotein) oxydé, activent le facteur de transcription SREBP2 (Sterol regulatory element-binding protein 2) qui stimule à son tour la formation de l'inflammasome NLRP3. Des travaux publiés récemment démontrent que SREBP2 régule la transcription de *TIFA* par une voie de signalisation SREBP2-TIFA- NF κ B. De plus, AKT provoque la phosphorylation de TIFA, dessinant un autre axe qui régule l'inflammasome via Akt-TIFA-TRAF-NLRP3 (Lin et al., 2016).

Enfin, il est possible que TIFA intervienne dans les cancers par d'autres mécanismes que ceux décrits jusqu'ici. Dans les leucémies, un haut niveau d'expression de TIFA est associé à un mauvais pronostic de survie. La sérine/thréonine kinase Aurora A interagit directement avec TIFA. Cette interaction coïncide avec la stimulation de NF κ B dont l'effet anti-apoptotique protège les tumeurs des mécanismes de lutte contre les cancers (Wei et al., 2017). L'utilisation de différentes techniques d'inhibition tels que les siRNA et les dominants négatifs, sensibilisent les cellules tumorales aux traitements anticancéreux de la même manière. Le fait que les effets soient très similaires, incite le groupe de Tsai à faire l'hypothèse que les fonctions cellulaires de TIFA n'ont pas de redondance dans la cellule et qu'elles ne sont pas assurées par d'autres protéines. Ces recherches ouvrent des perspectives intéressantes en cancérologie, notamment dans les nombreux cancers, dans lesquels Aurora A est surexprimée, en particulier dans l'estomac, la langue, le poumon ou le foie (Briassouli et al., 2007; Katsha et al., 2013).

Ces différentes études indiquent que TIFA pourrait être un élément de la régulation de l'homéostasie intestinale via l'inflammasome et Aurora. Il reste de nombreuses questions à explorer sur le fonctionnement de cette voie de signalisation. Une de nos premières interrogations pourrait être : l'axe ALPK1-TIFA-TRAF6 récapitule-t-il les effets protecteur démontrés par l'activation de TRAF6-NEMO ? D'autre part, les relations entre TIFA et ALPK1 ne sont pas encore bien comprises. L'interaction direct entre ALPK1 et TIFA n'est pas démontrée et il semble que la phosphorylation de la thréonine 9, importante pour l'activité de TIFA, ne soit pas un motif classique reconnu par le type de kinase auquel appartient ALPK1 (Huang et al., 2012). De plus, le fait qu'ALPK1 ne colocalise pas avec le TIFAsome, plaide en faveur de l'intervention de protéines intermédiaires (Zimmermann et al., 2017). Des modèles animaux, *TIFA*^{-/-} ou *ALPK1*^{-/-} mutés au niveau des cellules épithéliales intestinales, apporteraient des informations précieuses sur les fonctions physiologiques de ces molécules et permettraient de tester son implication dans différentes pathologies.

Sur le plan clinique, à plus long terme, utiliser des molécules bactériennes, comme des ligands de NOD1 ou de TIFA, pour prévenir la mise en place d'une inflammation intestinale et restaurer la barrière intestinale, pourrait être une piste thérapeutique. L'intérêt serait d'autant plus grand que l'altération de la barrière intestinale est un phénomène précoce dans la maladie de Crohn (Wells et al., 2017). Les traitements actuels pour lutter contre les maladies inflammatoires de l'intestin, tels que les dérivés aminosalicylés, corticoïdes, les immunosuppresseurs, les antibiotiques et plus récemment les anticorps anti-TNF α , visent à diminuer l'inflammation de la muqueuse et restaurer la barrière. L'utilisation de molécules efficaces dès la phase précoce de l'inflammation, pourrait permettre de diminuer la perméabilité intestinale et de limiter le développement de maladies (Buttó et al., 2015).

A ce stade, il est difficile d'envisager d'utiliser comme probiotiques les espèces bactériennes qui nous avons identifié. Les connaissances sur leurs effets sur l'hôte en cas d'inflammation et à l'état basal, sont encore trop limitées. Les probiotiques sont une option actuellement très étudiée pour lutter contre la rectocolite hémorragique, tels que des *Lactobacillus*, des *Bifidobacterium* ou encore la souche de *E. coli*, Nissle 1917 (Ganji-Arjenaki and Rafieian-Kopaei, 2018; Kruis et al., 2004). Une connaissance détaillée de l'impact de ces bactéries dans différents modèles est importante afin ne pas provoquer des effets secondaires indésirables. Certaines espèces comme *B. adolescentis* augmentent les Th17 chez des souris mono-colonisées mais sans induire d'inflammation à la manière de SFB. Cette inflammation physiologique peut être bénéfique chez un individu en bonne santé. *B. adolescentis* est d'ailleurs, une espèce abondante du microbiote humain, présente chez les 2/3 des individus (Qin et al., 2010). Cependant, des bactéries inoffensives peuvent devenir pathogènes lorsque l'immunité et la barrière sont compromises. On observe chez les patients atteints de MICI et d'arthrite rhumatoïde, une exacerbation de la réponse Th17 liée à une forte inflammation (Tan et al., 2016b). La formulation des probiotiques destinés aux patients souffrant d'inflammation intestinale ou systémique doit être étudiée de manière spécifique.

L'utilité de molécules renforçant la barrière intestinale va au-delà des maladies inflammatoires de l'intestin. La perturbation de la barrière intestinale augmente la fréquence de translocation de bactéries du microbiote, qui, commensales dans la lumière du côlon, peuvent devenir pathogènes lorsqu'elles pénètrent dans la circulation sanguine et les tissus. Des expériences chez la souris, mettent en évidence l'importance de la translocation bactérienne dans le développement de maladies auto-immunes chez des hôtes génétiquement prédisposés (Manfredo Vieira et

al., 2018). Dans l'iléon, *Enterococcus gallinarum* inhibe un ensemble de molécules liées à la barrière (claudine, occludine, serpine), à la production de mucus et de peptides anti-microbiens (Reg3b, Defa2), alors que ce n'est pas le cas de souris monocolonisées avec *E. faecalis* ou *B. thetaiotaomicron*. Après quelques semaines, la bactérie se développe dans le foie et les ganglions lymphatiques. Sa présence est corrélée à une augmentation de la production d'autoantigènes impliqués dans les lupus. De manière intéressante, chez l'humain, des biopsies de foies d'individus sains, révèlent la présence systématique de bactéries relativement diverses dont une part importante appartient au genre *Enterococcus* (Firmicutes). De même, une augmentation de la perméabilité intestinale est impliquée dans les allergies et dans les inflammations de bas grade (Wells et al., 2017).

La découverte de cette nouvelle voie de l'immunité pose aussi de nombreuses questions du côté bactérien. Il serait intéressant de rechercher quelles sont les bactéries commensales qui libèrent de l'heptose bi-phosphate dans sa forme active. Etudier la capacité des Bacteroides à sécréter cette molécule, en tant que composant majeur du microbiote, serait particulièrement pertinent dans le contexte intestinal. De plus, il est possible que d'autres molécules bactériennes, encore non identifiées, aient la capacité d'activer la voie TIFA. De manière plus ouverte, la capacité immuno-régulatrice des glucides libérés par les micro-organismes est encore peu étudiée au regard de la grande diversité de molécules produites. D'autre part, l'étude des mécanismes de régulation de la production et de la sécrétion de l'heptose bi-phosphate aiderait à en comprendre ses rôles pour les bactéries. Il est envisageable que cette molécule ait d'autres fonctions pour la bactérie que son rôle dans la synthèse du LPS.

Des différentes modulations de NFκB par *Akkermansia muciniphila*



Figure IV-1 :A. muciniphila imaged by electron microscopy (Ottman PhD 2015)

Le phylum des Verrucomicrobia est membre du super-phylum des Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae (PVC). Les bactéries de ce super-phylum partagent des modes de division cellulaire atypiques et une organisation des membranes peu commune. Ainsi, la présence du peptidoglycane est restée longtemps débattue au sein des *Verrucomicrobiales* et des *Chlamydiales*. Ces dernières années, des publications montrent que ces bactéries possèdent effectivement les structures typiques des bactéries à Gram⁺ : membrane externe, interne et peptidoglycane (Naqvi et al., 2016; van Niftrik and Devos, 2017). *A. muciniphila* est relativement à part des Verrucomicrobia, elle ne partage que 29% d'identité avec les autres génomes du phyla. Depuis sa description en 2004, *A. muciniphila* a reçu une grande attention, notamment du groupe de Willem de Vos qui est à l'origine de l'essentiel des publications

la concernant. Cette bactérie est hautement adaptée à l'environnement intestinal ; elle est capable d'utiliser la mucine comme seule source de carbone et d'azote. L'analyse de son génome prédit plus de 60 gènes qui serviraient à dégrader la mucine (van Passel et al., 2011). Étonnamment, des expériences *in vitro* indiquent qu'*A. muciniphila* n'adhère pas à la mucine mais plutôt aux cellules épithéliales (Reunanen et al., 2015). En 2011, 65% des gènes d'*A. muciniphila* avaient une fonction prédite, dont 26% possèdent un site de clivage du peptide signal, suggérant la sécrétion d'un grand nombre de protéines. Ces analyses *in silico* sont étayées par des études *in vitro* qui démontrent l'existence de nombreux échanges entre protéines bactériennes et cellules épithéliales.

En tant que Gram⁻, le LPS d'*A. muciniphila*, a une faible capacité immuno-modulatrice comparé au LPS d'*E. coli* (Ottman et al., 2017). De plus, la bactérie est fréquemment recouverte d'une structure semblable à des flagelles dont la nature et la fonction restent difficile à cerner (Figure IV-1). Cette bactérie produit également des vésicules extra-membranaires (EMV) qui peuvent représenter jusqu'à 25% des EMV totales isolées dans des fèces de souris. La proportion de ces EMV est bien plus importante que ne le laisse supposer la quantité d'*Akkermansia* dans les fèces de ces souris, qui représente 0.3 à 0.4% des bactéries (Kang et al., 2013).

L'abondance moyenne des Verrucomicrobia dans 471 échantillons de fèces humains d'HMP est inférieure à 1%. Cette proportion varie, de la non détection à 2.31%. C'est donc une bactérie non dominante du microbiote intestinale mais non négligeable parmi les 160 espèces présentes dans l'intestin humain. Jusqu'à présent, *A. muciniphila* est l'unique espèce isolée du phylum des Verrucomicrobia dans l'intestin humain. De plus, il est possible que du fait de sa localisation préférentielle dans le mucus, son abondance soit sous-évaluée car elle serait moins représentée dans les fèces que les espèces de la lumière intestinale. Les études métagénomiques ont révélé que d'autres espèces et d'autres souches proches d'*A. muciniphila* sont présentes bien qu'elles n'aient encore jamais été isolées (Guo et al., 2017b). Si, en proportion, *A. muciniphila* est peu abondante, elle est très fréquemment rencontrée dans l'intestin humain avec une prévalence de 80% (van Passel et al., 2011). Elle colonise préférentiellement le colon et ce, très tôt après la naissance. On peut détecter cette espèce dans les fèces dès le premier mois de vie (Collado et al., 2007). Les études métagénomiques nous apprennent que le genre *Akkermansia* est associé à un profil "high gene count" et à l'entérotype des *Ruminococcus*, riche en *Clostridiales*. Sa présence est négativement corrélée aux *Prevotella* (Arumugam et al., 2011; Le Chatelier et al., 2013). La diminution ou une plus faible présence d'*A. muciniphila* est associée à différentes pathologies comme le diabète, l'obésité, l'hypertension ou encore des maladies du foie (Belzer and De Vos, 2012; Dao et al., 2016; Derrien et al., 2011; Schneeberger et al., 2015; Wu et al., 2017b). Différentes études rapportent un niveau plus faible de la bactérie dans les fèces de patients atteints de rectocolite hémorragiques ainsi que dans les biopsies de patients malades de MICI (James et al., 2015; Png et al., 2010; Vignsnaes et al., 2013).

Le gavage quotidien de souris soumises à un régime riche en lipides, avec *A. muciniphila*, limite l'impact délétère de ce régime sur les paramètres métaboliques, sur l'épithélium intestinal et l'endotoxémie sérique. L'ensemble des publications, utilisant différents modèles, indiquent que la bactérie est associée à l'amélioration de la gestion de la glycémie, à la réduction de la masse lipidique et à une diminution du poids, chez l'humain et chez la souris (Derrien et al., 2017; Plovier et al., 2017). Les vésicules extra-membranaires produits par *A. muciniphila* ont également un impact sur la perméabilité intestinale et protègent les souris obèses des colites induites par du DSS (Chelakkot et al.,

2018; Lee et al., 2018). A l'inverse, chez les souris *IL10*^{-/-}, dont la tolérance intestinale et le système immunitaire sont altérés, la mono-colonisation avec *A. muciniphila* provoque une inflammation intestinale. Le culot bactérien ainsi que le surnageant de culture activent les macrophages dérivés de la moelle osseuse de ces souris *IL10*^{-/-}. Les molécules libérées par la bactérie dans le surnageant induisent la production d'IL6 et d'IL12p40 via MYD88 et de TLR4, probablement via le LPS. (Seregin et al., 2017). D'autre part, les auteurs de cette étude montrent que NLRP6 est essentiel pour contrôler la colonisation d'*A. muciniphila* dans l'intestin. La mutation de *NRLP6*^{-/-}, diminue la production d'IL18 et de peptides antimicrobiens ce qui amène à l'augmentation d'*A. muciniphila* chez des souris conventionnelles. D'autres publications tendent à montrer que la voie de signalisation de NLRP6 et de l'IL18 contribue à contrôler la composition du microbiote et l'homéostasie intestinale (Levy et al., 2015; Seregin et al., 2017).

D'autres travaux se sont intéressés plus en détails aux propriétés des molécules membranaires, sécrétées ou associées aux vésicules extra-membranaires sécrétées par la bactérie. La stimulation de cellules mononuclées provenant de sang humain avec *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* ou *L. plantarum*, trois espèces de bactéries qui sont de potentiels probiotiques, provoquent la sécrétion de cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires (Ottman et al., 2017). Ottman *et al* montrent que le surnageant d'*A. muciniphila* est un inducteur important d'IL6 et d'IL8, deux cytokines induites par NFκB, ce qui concorde avec nos données (Figure IV-2). La bactérie libère également de larges molécules, entre 100 et 1000kDa, qui stimulent fortement la production d'IL10. L'incubation avec du LPS purifié, extrait de la bactérie, provoque une production d'IL10 bien inférieure (0.3μg.ml) suggérant que la forte induction observée est le fruit d'autres molécules que le LPS. D'autre part, certaines protéines membranaires purifiées, comme Amuc_1100, augmentent également l'IL10 ainsi que des protéines impliquées dans la barrière intestinale (Claudine 3, Occludine). Amuc_1100 activent également TLR2, tout comme *C. butyricum*, *B. fragilis* ou encore *B. breve* (Hayashi et al., 2013; Jeon et al., 2012; Round et al., 2011b). Ainsi ces protéines membranaires améliorent la barrière intestinale dans l'intestin grêle des souris soumises à un régime riche en lipides (Plovier et al., 2017). En relation

avec notre travail, cette publication indique qu'il reste une activité stimulatrice d'IL8 dans la fraction du surnageant <10kDa

L'originalité de notre travail, réside dans la caractérisation, chez *A. muciniphila*, de deux voies distinctes de signalisation par de petites molécules (<3kDa), résistantes à la chaleur et à différentes enzymes. Le surnageant bactérien contient des molécules, probablement des fragments de peptidoglycane qui induisent l'activation de NOD1 et de NFκB. Nous rapportons également qu'*A. muciniphila* régule NFκB par un second mécanisme qui implique la voie TIFA. En réalisant différentes délétions géniques, nous avons montré que l'activité du surnageant repose en partie sur les kinases ALPK1, TIFA et TRAF6. A notre connaissance, notre travail montre pour la première fois qu'une molécule produite et libérée par une bactérie commensale a des propriétés immuno-modulatrices via TIFA. Cette propriété n'est pas basée sur un contact direct avec la bactérie mais avec des molécules libérées dans le milieu

Cytokine (pg/ml)	Live <i>A. muciniphila</i>	Heat-killed <i>A. muciniphila</i>	Supernatant <i>A. muciniphila</i>	Live <i>F. prausnitzii</i>	Live <i>L. plantarum</i>
IL-1β	894 ± 298	392 ± 71	1650 ± 510	870 ± 301	894 ± 298
IL-6	18029 ± 309	13477 ± 2014	23225 ± 8102	10178 ± 2648	7028 ± 2812
IL-8	60018 ± 18229	54230 ± 9030	86171 ± 32298	48354 ± 10526	33085 ± 16760
IL-10	823 ± 310	638 ± 118	1221 ± 310	834 ± 388	333 ± 215
TNF-α	1920 ± 349	957 ± 568	2095 ± 1249	5545 ± 2615	5459 ± 2830
IL-12p70	< 2	< 2	< 2	< 2	253 ± 293
Supernatant filtrates					
Cytokine (pg/ml)	10 kDa filtrate	30 kDa filtrate	100 kDa filtrate	300 kDa filtrate	1000 kDa filtrate
IL-1β	< 8	< 8	62 ± 29	678 ± 350	949 ± 522
IL-6	22 ± 23	569 ± 430	2556 ± 1049	18697 ± 7097	18717 ± 7326
IL-8	4321 ± 4530	11928 ± 7128	29040 ± 14973	74208 ± 28348	73695 ± 36442
IL-10	< 4	6 ± 4	43 ± 28	937 ± 287	1215 ± 379
TNF-α	< 4	37 ± 48	247 ± 255	1476 ± 849	1188 ± 930
IL-12p70	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Sucrose density-gradient separated fractions and purified Amuc_1100				Controls	
Cytokine (pg/ml)	Fraction 1 (4.5 µg/ml)	Fraction 2 (4.5 µg/ml)	Amuc_1100 (4.5 µg/ml)	Medium	LPS (1 µg/ml)
IL-1β	437 ± 225	< 8	504 ± 227	< 8	324 ± 121
IL-6	9312 ± 3329	414 ± 364	12508 ± 2362	< 4	13299 ± 5460
IL-8	64877 ± 19528	13339 ± 5039	45432 ± 12507	489 ± 291	60063 ± 5765
IL-10	941 ± 404	21 ± 18	526 ± 180	< 4	319 ± 157
TNF-α	2165 ± 883	60 ± 35	1317 ± 885	< 4	1392 ± 622
IL-12p70	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

Data are presented as mean ± SD, n = 3 donors. Per donor a negative control (just medium), and a positive control (LPS from *E. coli* 1 µg/ml) were used.

Figure IV-2 : Effet de bactéries entières, vivantes ou mortes, de leur surnageant ou de protéines purifiées, sur la production de cytokines par des cellules mononuclées de sang humain. Ottamn 2017

extra-cellulaire, qui sont en cours de caractérisation. Jusqu'à présent, *Neisseria* était le seul genre bactérien à avoir la capacité d'émettre des activateurs de TIFA dans son surnageant et à induire NFκB.

De manière intéressante, lorsque *Shigella* est internalisée dans les cellules épithéliales et se retrouve dans le cytosol, des fragments de peptidoglycane sont détectés par NOD1. La réponse cellulaire est une production d'IL8, rapide et aigüe, qui culmine dans la première heure suivant l'infection. La détection de *S. flexneri* par TIFA provoque une sécrétion d'IL8 environ 4 fois plus importante que l'activité de NOD1, qui est décalée dans le temps. Le pic d'activité de TIFA se situe environ 4 heures après l'infection et se prolonge dans le temps (Gaudet et al., 2017). Dans le cas d'*A. muciniphila* il n'y a pas d'infection, l'entrée des activateurs serait dépendante de la vitesse d'endocytose de la cellule. Il serait intéressant de réaliser une cinétique de l'activation de NFκB ou de l'IL8 afin de déterminer si la réponse cellulaire à lieu également en deux vagues distinctes. Nous avons testé la sécrétion d'IL8 après 24 heures

de stimulation et la transcription après 6 heures, ce qui ne nous permet pas d'apprécier la cinétique des activations dues à NOD1 et à TIFA. Il serait également important d'examiner si la réponse NOD1 potentialise, via NFκB, l'expression de TIFA, comme dans le cas de *S. flexneri*. Les données de *S. flexneri* suggèrent qu'il pourrait y avoir un effet de synergie entre les deux voies de signalisation pour stimuler l'immunité innée et protéger la cellule.

Comment concilier, l'effet bénéfique d'*A. muciniphila* dans de nombreuses pathologies, et dans le même temps, sa capacité d'activation de NFκB ? Une hypothèse est que l'activation de NFκB pourrait participer à l'effet protecteur de cette bactérie via TRAF6 et potentiellement NEMO (Han et al., 2013; Vlantis et al., 2015). Un niveau restreint d'IL8 dans la muqueuse colique, est protecteur pour l'hôte, en permettant de garder le système immunitaire en alerte et de limiter d'autres voies de signalisation comme le TNF comme évoqué dans le début de cette partie. Les modèles de souris *IL10*^{-/-} montrent que cette forme d'inflammation, physiologique, doit être contrôlée par les cytokines anti-inflammatoires et l'action des cellules immunitaires régulatrices. Chez des personnes présentant des déficits du système immunitaire, cette inflammation peut échapper au contrôle immunitaire et provoquer des pathologies inflammatoires chroniques. De manière intéressante, *A. muciniphila* induit des cytokines inflammatoires tout en stimulant les fonctions anti-inflammatoires de la cellule. Les travaux précédant ont montré qu'elle active la production d'IL10 et nos travaux indiquent qu'elle stimule aussi des protéines régulatrices de la réponse NFκB comme TNFAIP3 (A20). Le polymorphisme de *TNFAIP3* est associé à de nombreuses pathologies : psoriasis, MICI, lupus systémique érythémateux, arthrite rhumatoïde. La perte de fonction de cette protéine provoque la maladie de Behçet avec un développement précoce de symptômes auto-inflammatoires (Afonina et al., 2017). Chez l'humain, le polymorphisme de *TNFAIP3* semble aussi abolir l'effet protecteur de l'exposition à l'environnement agricole dans l'enfance contre le développement de l'asthme et des allergies. Les études GWAS montrent de plus que *TNFAIP3* figure parmi les loci qui augmentent le plus le risque de l'apparition de MICI et qui prédit la réponse aux thérapies anti-TNF (Verecke et al., 2014). De plus, les souris dont le gène *Tnfaip3* est invalidé dans les cellules épithéliales intestinales souffrent de colites spontanées.

Si les impacts positifs de cette bactérie sur la santé de l'hôte, murin et humain, ont été documentés dans de nombreuses études, les bases moléculaires de ces effets commencent tout juste à être révélées. Différentes protéines, en particulier de la membrane d'*A. muciniphila*, ont des propriétés immuno-régulatrices. Certaines de ces propriétés, *A. muciniphila* les partagent avec un grand nombre de bactéries Gram-, ayant la même organisation de paroi. C'est le cas du LPS par exemple. D'autres protéines sont plus spécifiques de cette espèce, comme le pili de type IV décrit récemment (Ottman et al., 2016). Dans le travail présenté ici, nous nous sommes intéressés à des molécules de nature non protéique, plus difficiles à analyser. A notre connaissance, aucun métabolite d'*Akkermansia* n'a été caractérisé jusqu'à présent. En effet, malgré le potentiel important représenté par les nombreux métabolites bactériens sécrétés, les outils de biologie cellulaire développés pour étudier les sucres et les lipides sont moins nombreux. L'exploration de ces molécules est une piste prometteuse pour mieux comprendre les interactions entre cette espèce, le reste du microbiote et l'hôte. La localisation de la bactérie dans le mucus, proche des cellules épithéliales intestinales facilite probablement la diffusion et les fonctions d'immuno-modulation des molécules libérées.

A la lecture de l'ensemble des études publiées sur *A. muciniphila*, on peut s'interroger sur les mécanismes qui permettent à cette unique bactérie d'avoir autant d'effet positif sur l'hôte. L'une des hypothèses avancées par M.

Derrein et W. de Vos repose sur le fait que cette espèce appartient à un phylum qui est relativement éloigné des autres phyla intestinaux et dont elle est, globalement, la seule espèce. Même si les analyses *in silico* montrent que d'autres espèces proches d'*Akkermansia muciniphila* sont probablement présentes dans le tractus intestinal, ce groupe reste très restreint. Elle serait ainsi la « seule » à produire toute une gamme de protéines et de métabolites sans proche homologues, ce qui permettrait à certains d'avoir un impact singulier sur l'hôte (Derrien et al., 2017). Une autre partie de l'explication tient à ce qu'en dégradant le mucus, elle libère de nombreux nutriments : fucose, galactose, N-acetylgalactose/glucoseamine, acide sialique, sulfate et saccharide, qui sont utilisés par d'autres bactéries. Il est possible qu'*A. muciniphila* soit une espèce « clef de voûte », au centre de chaînes trophiques liées à la dégradation de la mucine qui permettent à d'autres bactéries de se multiplier, structurant ainsi une communauté écologique (Tailford et al., 2015). Une partie de ses effets sur la santé serait le résultat de modifications plus larges de l'écosystème intestinal dont *Akkermansia muciniphila* serait le témoin (Hajishengallis et al., 2012).

Fusobacterium dans l'intestin : archétype du pathobionte ?

Le genre *Fusobacterium* est hétérogène, il comprend des espèces pathogènes opportunistes et d'autres qui sont des composants des microbiotes de la bouche et de l'intestin. Ces Gram⁻, sans endospores, ont longtemps été classées dans le super-phylum des Clostridium, dans le cluster XIX (Collins et al., 1994). L'abondance du phylum des Fusobacteria analysée avec le portail IMG HMP dans 471 échantillons fécaux humains est en moyenne de 0.040%, variant de non détecté à 0.2% (Mars 2018). Ces bactéries représentent donc une fraction non dominante du microbiote mais elles sont très prévalentes. Les gènes des Fusobacteria sont retrouvés dans pratiquement tous les échantillons intestinaux humains analysés (99.36%). Cette présence démontre que les Fusobacteria sont présentes dans le microbiote intestinal d'individus non malades. Les techniques de séquençages utilisées dans ces études ne permettent pas une assignation taxonomique fine, qui différencierait les différentes espèces et sous-espèces de *Fusobacterium*, résidant dans l'intestin.

D'après des publications récentes, le genre *Fusobacterium* peut être divisé en plusieurs groupes suivant la similarité de leurs séquences génomiques. Le groupe I, encadré en jaune dans la Figure IV-3, est formé de *F. nucleatum*, de sous-espèces, de *F. periodonticum* et de *F. russi*. Ce groupe a un haut potentiel de diversification comme le montre le grand nombre de sous-espèces de *F. nucleatum*, qui étaient encore récemment classées comme des espèces distinctes. Le groupe II comprend *F. necrophorum*, *F. gonidaformans* et *F. equinum*. Enfin le dernier groupe (III) comprend des espèces souvent associées à des infections comme, *F. varium*, *F. mortiferum* and *F. ulcerans* et *F. necrogenes*. (Conrads et al., 2002; Gupta and Sethi, 2014). L'espèce *F. naviforme*, que nous avons étudiée, est en dehors de cette classification car elle peut être apparentée aux autres espèces.

Les *Fusobacterium* sont liées à différentes pathologies : periodontites, appendicites, accouchements prématurés, MICI, cancers. *F. necrophorum* est par exemple associée au syndrome de Lemierre, caractérisé par des thrombophlébites ainsi qu'à des septicémies et des lésions métastatiques (Moore and Moore, 1995; Swidsinski et al., 2011). L'espèce *F. varium* est trouvée en plus forte abondance dans les cryptes du côlon de patients atteints de rectocolites hémorragiques (Ohkusa et al., 2002, 2009). Son impact sur la réponse immunitaire dans un modèle de souris monocolonisées a été étudié en détail (Geva-Zatorsky et al., 2017). Dans cette étude, *F. varium* est l'une des espèces testées qui modifie le plus profondément les différentes populations de cellules immunitaires, dans le côlon et l'intestin grêle. En comparaison, *F. nucleatum* a un plus faible impact, plutôt anti-inflammatoire. Dans le genre *Fusobacterium*, différentes bactéries sont reconnues comme des pathogènes opportunistes qui expriment des protéases, des porines (FomA), des protéines d'adhésion qui leur permettent d'infecter leur hôte. Ainsi différentes protéines ont été identifiées comme des facteurs de virulences: Fap2 (Fusobacterial apoptosis protein 2), Fip (Fusobacterial immunosuppressive protein) et FadA (Fusobacterium adhesion A) (Garret et al., 2015; Rubinstein et al., 2013; Toussi et al., 2012). La protéine FadA est la mieux caractérisée : elle permet l'adhésion des bactéries aux cadhérines, des protéines de jonctions cellulaires exprimées dans les tissus épithéliaux. L'adhésion aux cadhérines facilite l'invasion des bactéries dans et entre les cellules de l'épithélium en altérant la barrière. Le relâchement de l'adhésion entre les cellules permet à d'autres bactéries de se disséminer dans les tissus (Han, 2015). FadA est présente chez différentes espèces de *Fusobacterium* : *nucleatum*, *periodonticum*, *simiae* ou encore *hwasookii*.

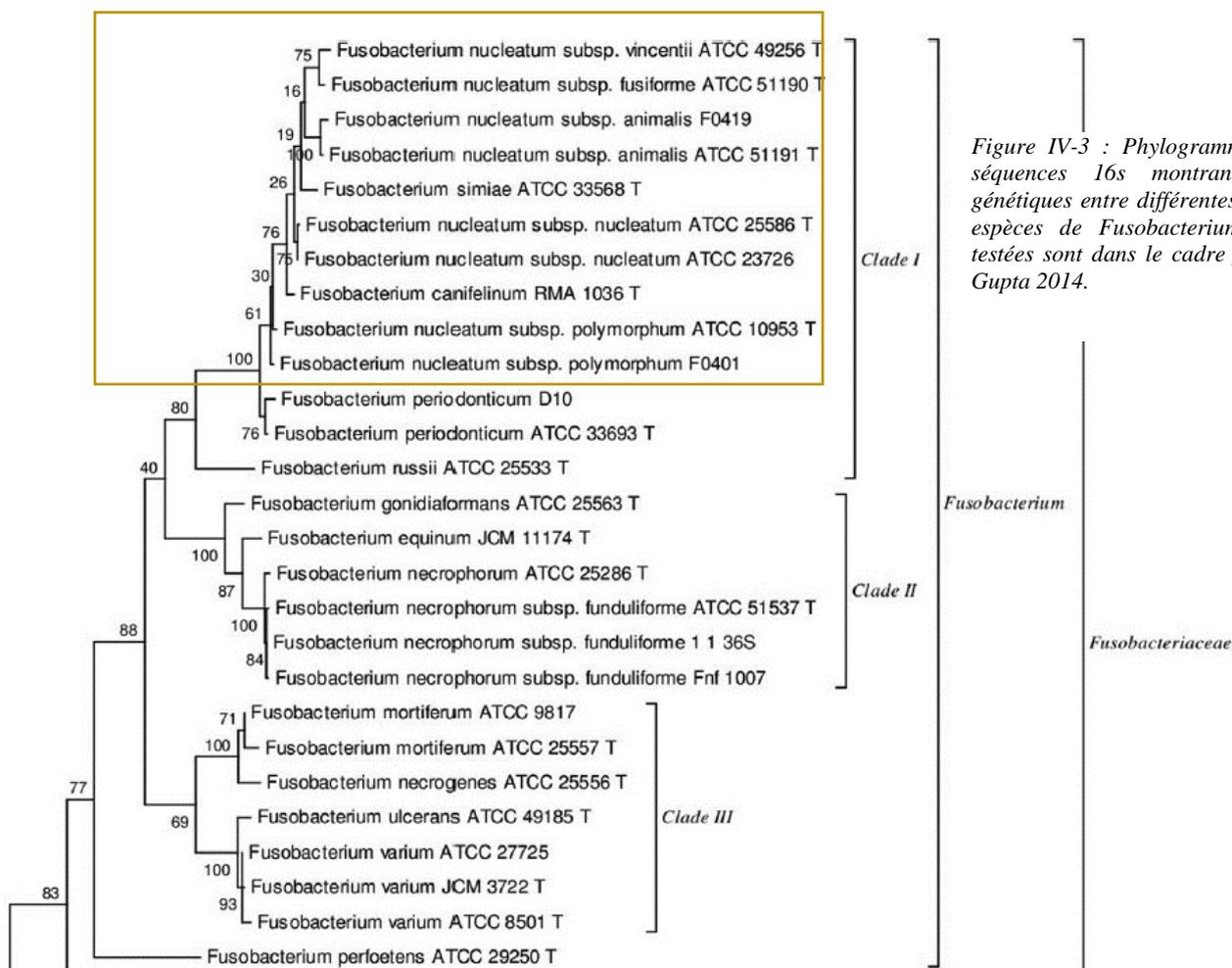


Figure IV-3 : Phylogramme basé sur les séquences 16s montrant les relations génétiques entre différentes espèces et sous-espèces de *Fusobacterium*. Les bactéries testées sont dans le cadre jaune. Adapté de Gupta 2014.

La prévalence du genre *Fusobacterium* est plus forte dans les tumeurs de cancer du côlon (74,4%) que dans les parties normales de la muqueuse colique (52,8 %). Elles sont corrélées aux cancers colorectaux présentant des

infiltrations de lymphocytes dans les tumeurs et un haut niveau de méthylation de l'ADN. *Fusobacterium nucleatum* est l'espèce qui est la plus représentée dans les biopsies colorectales cancéreuses (52,3%) et non cancéreuse (30,3%) (Castellarin et al., 2012; Tahara et al., 2014). La majorité des études corroborent la plus forte prévalence de *F. nucleatum* à l'exception de quelques études (Lu et al., 2016). Le rôle précis de la bactérie dans le développement du cancer colorectal fait encore l'objet de débat. Il semble que cette espèce bactérienne ne soit pas capable seule, d'induire le développement de tumeur, à l'inverse d'*H. pylori*. Cependant, dans différents modèles, *F. nucleatum* augmente la vitesse de progression de la maladie et les risques de rechute. L'un des mécanismes identifiés de promotion de la cancérogénèse par *F. nucleatum* repose sur la protéine Fap2, un transporteur de la membrane externe. Plusieurs équipes ont montré que Fap2 permet l'adhésion des bactéries à des motifs de type Gal-Gal-NAc qui sont plus fortement exprimés dans les cancers colorectaux que dans les tissus sains. La capacité à adhérer spécifiquement à ce motif peut expliquer pourquoi cette *F. nucleatum* a un tropisme singulier pour les cancers colorectaux (Abed et al., 2016; Copenhagen-Glazer et al., 2015). D'autre part, la protéine Fap2 inhibe le récepteur TIGIT, exprimé entre autres par les cellules NK, ce qui permet aux tumeurs d'échapper au contrôle du système immunitaire (Gur et al., 2015). Ces travaux indiquent que la présence de Fap2 pourrait être utilisée comme un marqueur de risque, voir un marqueur de lésions tumorales précoces dans les cancers du côlon. En dehors de son impact sur la carcinogénèse, le contact direct de cellules avec *Fusobacterium* induit une forte réponse immunitaire. Le LPS de *F. nucleatum* active NFκB via TLR4 et TLR2 (Yang et al., 2017). Dans des infections intracellulaires, *in vitro*, de lignées de fibroblastes parodontaux, la bactérie stimule le récepteur d'ARN viral RIG-I (Lee and Tan, 2014).

Les bactéries du genre *Fusobacterium* sont adaptées à l'environnement intestinal. Leurs caractéristiques métaboliques suggèrent qu'à côté des aspects pro-tumoraux, elles peuvent aussi avoir des effets bénéfiques pour l'hôte. Anaérobies, elles sont capables de dégrader un grand nombre de substrats énergétiques et produisent des acides gras à chaînes courtes. Elles libèrent un haut niveau de butyrate, et dans une moindre mesure, du propionate et de l'acétate. Les AGCC sont des molécules connues pour leurs propriétés anti-tumorales et anti-inflammatoires, comme discuté dans la partie précédente (Louis et al., 2014). De plus, plusieurs études montrent que le gavage de souris axéniques avec *F. nucleatum* conduit à un haut niveau de différenciation de lymphocytes T régulateurs via TLR2 et TLR4, mais ne stimule pas celle des Th17 (Jia et al., 2017; Sefik et al., 2015; Tan et al., 2016b). Ces différents éléments indiquent que par certains aspects, *F. nucleatum*, a aussi un rôle anti-inflammatoire. Nous pouvons faire l'hypothèse que les *Fusobacterium* sont des commensales, lorsqu'elles sont présentes à un faible niveau dans un écosystème intestinal, à la composition équilibrée, pauvre en oxygène, et où l'hôte possède une barrière de mucus et de molécules antimicrobiennes efficaces. Dans ces conditions, peu de *Fusobacterium* sont au contact direct des cellules épithéliales. La sécrétion de molécules qui stimulent NFκB via les TLR et TIFA pourrait participer au maintien du système immunitaire dans un état d'alerte physiologique mais aussi jouer un rôle inflammatoire délétère.

A l'inverse, dans un contexte de déséquilibre du microbiote, de lésions ou d'inflammation intestinale, la bactérie a la capacité de résister à des niveaux importants d'oxygène (3% pO₂) ce qui peut lui procurer un avantage pour se multiplier davantage que dans un contexte non inflammatoire (Loesche, 1969). L'inflammation intestinale s'accompagne souvent de la réduction de la barrière physico-chimique, ce qui peut favoriser l'adhésion de la bactérie à l'épithélium grâce à l'expression de ces différentes molécules d'adhésion. L'inflammation intestinale conduit à une

augmentation de la prolifération cellulaire pour réparer les tissus qui favorise les évènements d'altérations génomiques. Le passage de polypes bénins à des adénocarcinomes s'accompagne de l'expression de galactose à la surface des cellules, ce qui augmente la capacité d'adhésion de *Fusobacterium* et pourrait entraîner un cycle inflammatoire auto-entretenu. La bactérie est capable d'altérer la barrière intestinale, d'entrer dans les cellules et même dans les cas les plus graves, d'infecter par voie systémique son hôte. La difficulté pour établir l'ordre de causalité dans ces évènements est que le cancer colorectal se développe sur de longues périodes, de 10 à 20 ans, où de nombreux évènements surviennent et dont la récurrence contribue à la pathogénicité (Raisch et al., 2016). Il paraît clair, que les bactéries appartenant au genre *Fusobacterium* contribuent dans l'intestin à la cancérogenèse. En ce sens, *F. nucleatum* semble être un prototype de bactérie pathobionte : commensale, voir bénéfique dans un contexte sain, potentiellement pathogène dans un environnement dégradé.

Plus globalement, différents travaux chez des souris génétiquement modifiées pour développer spontanément des cancers colorectaux mettent en évidence la contribution du microbiote dans ces pathologies. En effet, dans ces modèles, les souris axéniques développent moins de tumeurs que les souris conventionnelles (Tjalsma et al., 2012). Le cancer colorectal est une maladie multifactorielle, dont seulement 10% des cas sont héréditaires. Comme les MICI, le cancer est fortement corrélé au régime alimentaire où la consommation de viande et de gras est importante, combinée à un faible apport de vitamine D, de fibres et de poisson et plus largement à un mode de vie, dit occidental. Plusieurs chercheurs ont proposé un modèle où les bactéries du microbiote contribueraient à la cancérogenèse en deux temps. Un premier type de bactéries du microbiote, dites bactéries initiatrices (« driver »), favoriseraient les dommages de l'ADN et des défauts de réparation dans les cellules épithéliales, en particulier dans les cellules souches des cryptes coloniques. Les *Clostridiales*, les *Enterobacteriaceae*, les *Actinomycetales* et les *Bacteroides* sont des groupes de bactéries identifiés comme potentiellement initiateurs de dommages à l'ADN. Ce potentiel englobe donc les groupes de bactéries les plus abondants du microbiote. L'hyperprolifération de cellules épithéliales, peu différenciées, qui produisent peu de molécules antibactériennes et de mucus, favoriserait la multiplication d'un second groupe de bactéries, dites opportunistes (« passagers »), qui contribueraient au passage de l'adénome à l'adénocarcinome. Tout comme *F. nucleatum*, *Bacteroides fragilis* est une bactérie à Gram⁻, relativement aérotoleérante, commensale, présente dans le microbiote intestinal humain équilibré. *Bacteroides fragilis*, est un exemple de bactéries opportunistes, qui, en sécrétant des toxines et en recrutant de Th17, pourraient être l'origine du remodelage de l'environnement intestinale et aux mutations qui favorisent la cancérogenèse (Sears and Garrett, 2014).

Les analyses du microbiote chez les patients atteints de cancer colorectal ne mettent pas forcément en avant les bactéries initiatrices. Elles montrent à l'inverse plutôt une diminution de certaines *Clostridiales* et une augmentation de *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus gallolyticus*, *Enterococcus faecalis* et *Fusobacterium nucleatum*. L'hypothèse est que le second groupe de bactéries, dites opportunistes, aurait la capacité de supplanter les bactéries initiatrices en se multipliant davantage dans le nouvel environnement. Les conséquences négatives, importantes pour les bactéries initiatrices supplantées, rendent difficiles à priori, la compréhension des mécanismes de sélection de leur caractère oncogénique. Le fait que les bactéries initiatrices soient remplacées au cours de la maladie rend leur identification mal aisée. Il faudrait pourvoir suivre des individus des stades précoces de la maladie jusqu'à des stades tardifs, dans des études longitudinales, pour percevoir ces différentes dynamiques bactériennes.

Malgré la petitesse des échantillons et l'aspect disparate des études sur les bactéries associées aux tumeurs colorectales humaines, *F. nucleatum* est la seule bactérie à être presque toujours détectée. Nous ne savons pas, ce qui modifie la capacité proliférative de *F. nucleatum* et ce qui la rend mieux adaptée au niveau métabolique que d'autres bactéries à l'environnement tumoral. Sa présence permet probablement, à d'autres bactéries d'adhérer à l'épithélium comme cela a été décrit dans l'écosystème buccal. Parmi les autres bactéries opportunistes identifiées, on trouve les *Roseburia*, les *Feacalibacterium*, deux genres appartenant aux *Clostridiales* ainsi que les *Coriobacteriaceae* (Marchesi et al., 2011). Pour mieux comprendre les mécanismes bactériens en jeu, les études génomiques qui permettent uniquement l'assignation taxonomique, ne suffisent pas. Il faudrait pouvoir comparer les gènes exprimés et les molécules produites par les bactéries associées spécifiquement aux tumeurs.

La composition du microbiote a un impact sur le traitement du cancer puisque différentes publications ont montré que les bactéries jouent un rôle sur les molécules utilisées (Pitt et al., 2016; Routy and Kroemer, 2017; Vetizou et al., 2015). Une publication récente montre que *F. nucleatum* est associée à un risque élevé de rechute du cancer colorectal. La bactérie régule l'autophagie via TR4 et MYD88, et ce faisant augmente la chimiorésistance des cellules (Yu et al., 2017). Au vu de la littérature, on peut s'interroger sur l'impact de la stimulation de la voie ALPK1-TIFA par *F. nucleatum* dans la cancérogénèse. Nous ne disposons d'aucune étude sur la question pour le moment. Toutefois, chez la souris et chez l'humain, le gène *ALPK1* est l'objet de polymorphismes en lien avec certains cancers (Boulard et al., 2012; Liao et al., 2016).

Le rôle méconnu de NOD1 dans la muqueuse intestinale

La stimulation de NOD1 impact plusieurs voies de signalisation : via RIP2 (ou RICK) elle active NFκB et les MAP kinases, via ATG16L1, elle favorise l'autophagie. L'activation de NOD1 et la formation du NODosome par le microbiote, est nécessaire à l'activation du système immunitaire à l'état basal, en particulier pour le bon développement de la population de neutrophiles circulants (Clarke et al., 2010; Hergott et al., 2016). Les agonistes microbiens de NOD1 contribuent à la survie des lymphocytes B matures et régulent la population de cellules stromales hématopoïétiques chez la souris (Hayakawa et al., 2017; Iwamura et al., 2017). L'activation de NOD1, dans les cellules épithéliales pendant le développement, conduit à la production de la chimiokine CCL20 qui permet le recrutement de cellules dendritiques et cellules lymphoïdes inducteurs de tissus (LTi), nécessaires à la formation des follicules lymphoïdes isolés dans le côlon (Bouskra et al., 2008). Ces résultats suggèrent que les bactéries à Gram⁻ ainsi que quelques Gram⁺, jouent un rôle déterminant dans la maturation de certaines structures lymphoïdes telles que les plaques de Peyer ou les ganglions mésentériques. En l'absence de *NOD1*, la population microbienne augmente considérablement dans l'intestin et la composition de l'écosystème est modifiée. D'autre part, la barrière intestinale des souris *NOD1*^{-/-} est plus fragile lors d'un traitement au DSS que chez les souris témoins. En l'absence de NOD1, la perméabilité augmente ainsi que la prolifération cellulaire et l'inflammation intestinale, le tout formant un contexte favorable à la progression tumorale. De manière intéressante, l'effet délétère de l'inactivation de *NOD1* est aboli si le microbiote des souris est éliminé par des antibiotiques (Chen et al., 2008). Les auteurs de cette étude suggèrent que NOD1 protégerait les cellules épithéliales, en stimulant la voie NFκB et en particulier NEMO. En effet, comme évoqué dans la partie précédente, la délétion de *NEMO* entraîne des effets proches de ceux observés par la délétion de NOD1 dans l'épithélium intestinal.

L'effet protecteur de NOD1 passe également par la stimulation de la sécrétion par les cellules épithéliales des peptides antimicrobiens comme les défensines. Lors des infections à *H. pylori*, à *E. coli* ou à *L. monocytogenes*, l'activation de NOD1 est nécessaire à la défense de l'hôte via la production des β -défensines (Boneca et al., 2007; Gaudet et al., 2017; Viala et al., 2004). Ce récepteur protège également les souris des infections à *C. difficile* par le recrutement des neutrophiles (Hasegawa et al., 2011).

Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées aux liens entre le microbiote et le récepteur NOD1, et encore plus rarement dans les cellules épithéliales intestinales. Nos résultats mettent en évidence la capacité de bactéries commensales, appartenant à un groupe dominant du microbiote intestinal, les *Clostridiales*, à stimuler NOD1. A priori ces bactéries à Gram⁺ possèdent un peptidoglycane de type Lysine qui n'est pas reconnu par NOD1. Il semble peu probable qu'elles possèdent un peptidoglycane contenant le motif de l'acide γ -D-glutamylmeso-diaminopimelique (mDAP), le ligand canonique de NOD1 qui est surtout présent chez les Gram⁻ (Figure IV-4). Cependant, le type de peptidoglycane n'est pas connu pour la plupart des bactéries étudiées. La caractérisation de la structure du peptidoglycane apporterait des informations importantes concernant le mécanisme par lequel elles activent NOD1. Le plus probable est donc que les Clostridiales activent NOD1 en libérant soit d'autres molécules reconnues par NOD1, soit qu'elles activent NOD1 plus indirectement. Une étude cherchant à identifier les ligands environnementaux de NOD1 et NOD2 révèle que les ligands de NOD1 les plus efficaces se trouvent dans le surnageant de culture et non dans les culots bactériens. Ils mettent en évidence qu'en plus de *Listeria* et de différents Peptidoglycan de type Lysine, typique des Gram⁺

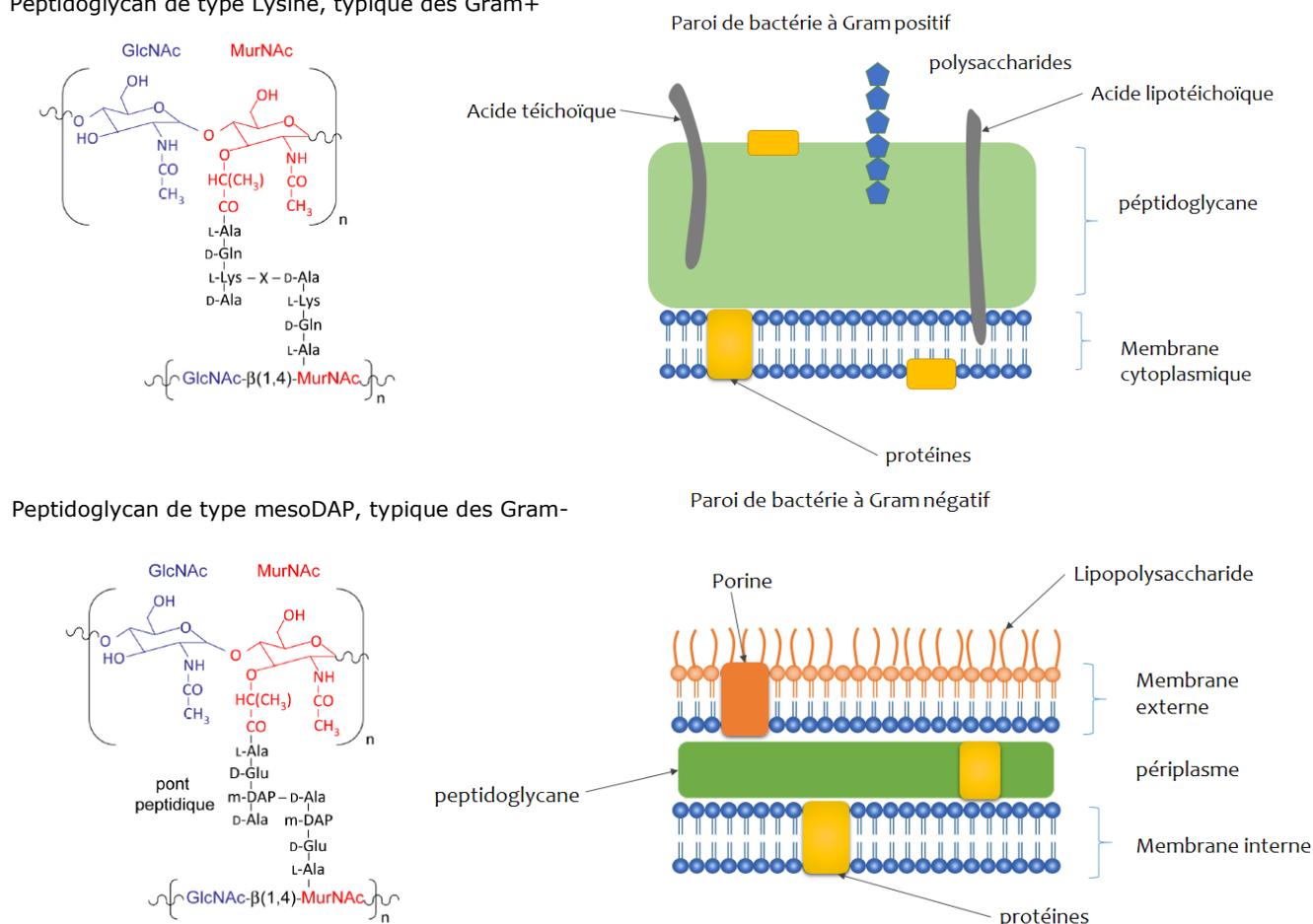


Figure IV-4 : Représentation des différences entre les parois des bactéries à Gram⁺ et Gram⁻ ainsi que des deux structures de peptidoglycane. Le peptidoglycane de type Lysine est reconnu par NOD2 tandis que celui de type mesoDAP est reconnu à la fois par NOD1 et NOD2. GlcNAc (N-acétylglucosamine), MurNAc (N-éacetylmuramique)

Bacillus, des espèces de *Staphylococcus* et de *Lactobacillus* possèdent un peptidoglycane de type mDAP, mais qu'elles ne libèrent que très peu de ligand de NOD1 dans le milieu extracellulaire. Les ligands décrits dans cette étude sont thermostables et peu sensibles au pH, ce qui concorde avec nos données. Les auteurs montrent que la synthèse de ces ligands chez *E. coli* n'est pas dépendante des enzymes qui contrôlent le recyclage et la dégradation du peptidoglycane, comme les amidases et les enzymes dégradant la muréine, par exemple SltY (Hasegawa et al., 2006). Ces travaux ouvrent des pistes intéressantes sur les structures des ligands naturels de NOD1 produits par les bactéries, probablement différentes du mDAP canonique, mais qui restent pour le moment inconnues pour la plupart des espèces (Pradipta et al., 2010). Du fait de la très grande stabilité de ces molécules et de leur abondance dans l'environnement, les auteurs suggèrent que leur ingestion, en particulier dans les aliments, pourrait stimuler le système immunitaire.

Si l'activation de NOD1 par les *Clostridiales* ne provient pas du recyclage du peptidoglycane, d'autres hypothèses sont envisageables. Ces bactéries pourraient produire des molécules qui modifient le cytosquelette cellulaire et ainsi stimulent NOD1 et NFκB. Les cas de modifications du cytosquelette décrits jusqu'à présent impliquent des bactéries intracellulaires, *S. enterica* ou *S. flexneri*, ciblant les protéines de l'hôte avec un ensemble d'effecteurs (Kim et al., 2010). La dépolymérisation de l'actine par des protéines appartenant à la famille des cofilines participe à la signalisation de NOD1 lors des infections à *Shigella* (Bielig et al., 2014). D'autres effecteurs ciblent les petites Rho GTPases comme Rac1 et CDC42 (Keestra and Bäumlér, 2014). Aucun lien n'a encore été publié entre des *Clostridiales* et NOD1, cependant plusieurs *Clostridium* activent le récepteur Pyrine (*MEFV*), proche des NLR et impliqué dans la fièvre méditerranéenne. Le récepteur Pyrine répond spécifiquement à des modifications des Rho GTPases et du cytosquelette, ce qui provoque l'assemblage d'un inflammasome (Gao et al., 2016; Heilig and Broz, 2018). Une étude *in vivo*, montre que les souris *Mefv*^{-/-} développent des colites plus sévères avec une perméabilité intestinale accrue, par rapport aux souris non mutées, due à l'absence d'activation de l'inflammasome. Ce travail suggère que le récepteur Pyrine pourrait protéger l'épithélium intestinal, présentant ainsi une cible sur laquelle appuyer des stratégies thérapeutiques pour lutter contre les MICI (Sharma et al., 2018). A priori, dans notre cas, le récepteur Pyrine n'est pas impliqué, puisque aucune donnée ne montre qu'il est capable d'activer NFκB. La dernière possibilité envisagée serait que les molécules bactériennes provoquent un stress du réticulum endoplasmique. Des liens ont été documentés, entre stress et formation du NODsome, par la voie de signalisation IRE2α/TRAF2 (Keestra-Gounder et al., 2016). Divers outils développés pour l'étude des bactéries pathogènes permettent d'étudier la pertinence de ces différentes pistes : observation du cytosquelette par immunofluorescence, inhibition du récepteur Pyrine, des Rho GTPase, mesures du stress du réticulum endoplasmique, observation des inflammasomes, ou encore siRNAs.

La littérature dans son ensemble indique que le récepteur NOD1 a un rôle particulier au niveau des cellules épithéliales qui serait favorable à l'homéostasie intestinale. Les bactéries du microbiote sécrètent de nombreux ligands de NOD1 qui aident au développement des organes lymphoïdes et du système immunitaire inné. Si des publications montrent que les *Clostridiales* sont une composante majeure du microbiote humain, associée à la maturation du système immunitaire et à des effets anti-inflammatoires, il n'existe pas pour l'instant d'études de leur impact sur le récepteur NOD1 (Hayashi et al., 2013; Quévrain et al., 2016; Tanoue et al., 2016).

En résumé, nous avons exploré dans ce travail la diversité des voies de communication entre les bactéries du microbiote et l'immunité des cellules épithéliales intestinales, qui servent de médiateurs à l'organisme. Ces micro-organismes stimulent une grande diversité de récepteurs cellulaires, que nous n'avons probablement pas fini de mettre au jour. Des travaux d'approfondissement sont à mener afin de comprendre les effets des molécules bactériennes sur les échanges entre l'hôte et les bactéries. Plus nos connaissances sur les mécanismes de cohabitation entre les microbes et l'hôte augmentent, plus l'équilibre qui permet la tolérance immunitaire paraît délicat et changeant, tant est subtile la frontière entre l'inflammation physiologique et celle qui devient pathologique. En permanence, l'organisme contribue à sélectionner les organismes commensaux pour maintenir cet équilibre dans notre intestin. Et malgré cette complexité et cette fragilité apparente, on peut être saisi d'étonnement à constater que nous vivons en relative harmonie avec cette abondante communauté microbienne.

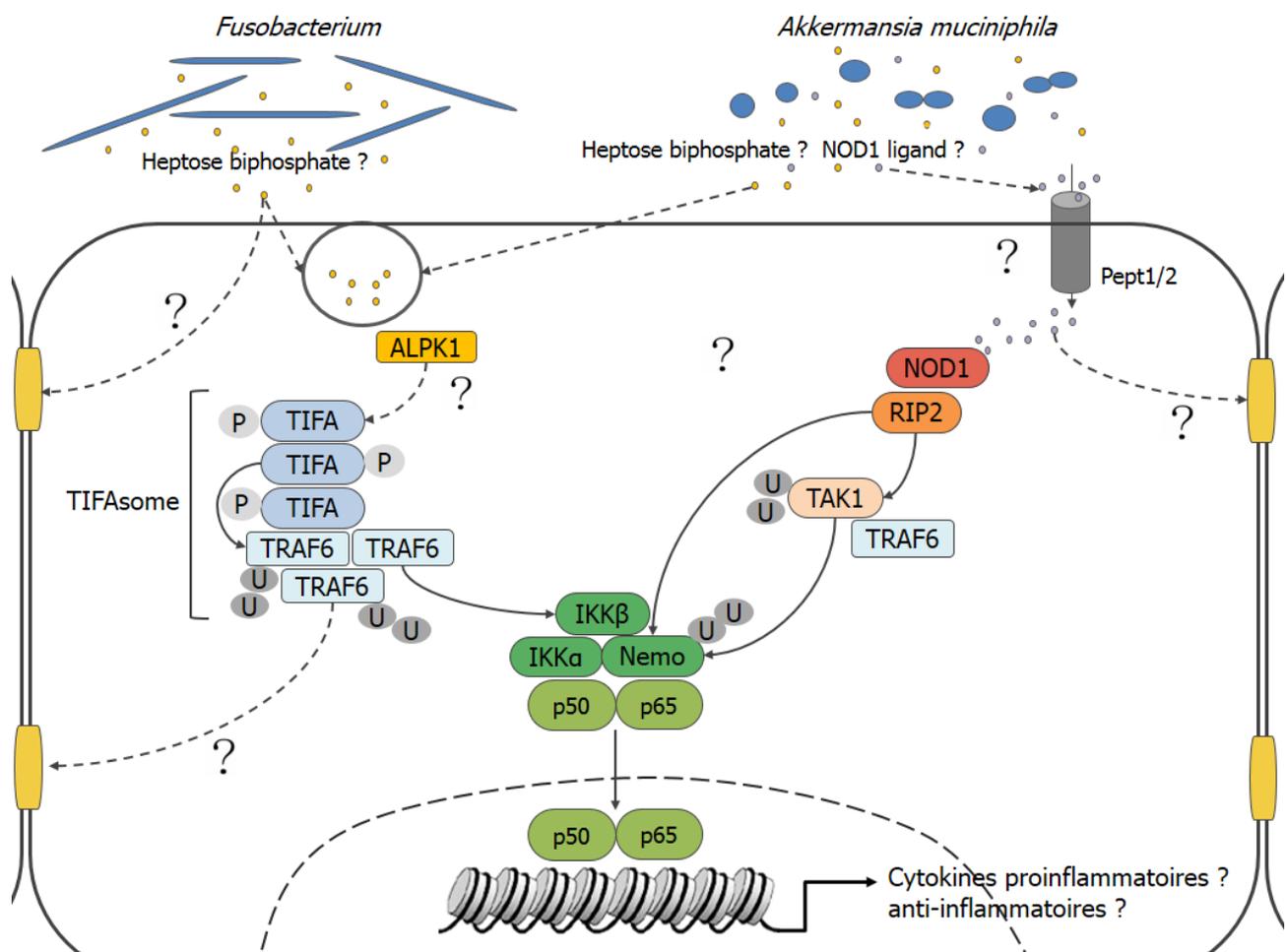


Figure IV-5 : Différents mécanismes d'activation de NFκB, indépendants de MYD88, dans les cellules épithéliales, par les bactéries *Fusobacterium* et *Akkermansia muciniphila*.

V. De la bactérie à l'écosystème intestinal

Les concepts d'holobionte et d'hologénome sont fréquemment utilisés pour désigner l'existence d'une coévolution entre l'hôte et la communauté microbienne qui le peuple. L'holobionte constituerait une unité évolutive particulière, qui expliquerait comment de la sélection émerge des caractéristiques favorables aux échanges symbiotiques entre des organismes hétérogènes. Cependant, envisager le couple hôte-microbiote comme un super-organisme, au niveau duquel se déroulerait la sélection, rend difficile la prise en compte de la diversité des interactions qui s'y déroulent à l'échelle individuelle. Les organismes sont les acteurs d'un réseau de relations, microbes-microbes, hôte-microbes ou encore microbes-hôte. Les rapports passent du commensalisme, au mutualisme, au parasitisme ou encore à la compétition dans un continuum. En fonction du contexte, les associations entre certains membres de la communauté intestinale peuvent passer du mutualisme à la compétition et lorsque les conditions changent à nouveau, revenir au mutualisme par exemple. De même, de nombreuses bactéries qui résident dans l'écosystème intestinal ont des relations avec l'hôte qui oscillent du mutualisme à la compétition avec l'hôte, selon l'environnement. Parmi ces bactéries appelées pathobiontes, on trouve *F. nucleatum*, *SFB*, *B. fragilis* ou *E. coli* (Lee and Mazmanian, 2010). La dynamique qui fait qu'un organisme commensal devient pathogène, dépend du fait que chacun des membres de ce biotope est adapté à des habitats spécifiques, établit des relations trophiques particulières et subit une pression de sélection qui lui est propre.

Certaines bactéries opportunistes, comme *C. difficile*, ne s'établissent que dans un contexte de profondes perturbations, où des niches sont disponibles. Différentes expériences de colonisation de souris axéniques par des communautés bactériennes plus ou moins éloignées du microbiote intestinale murin, ont montré que beaucoup d'espèces sont capables de s'établir dans de nouvelles niches intestinales. Elles sont cependant rapidement supplantées lorsque des espèces plus adaptées sont ajoutées (Seedorf et al., 2014). Dans cette perspective, le développement des pathobiontes apparaît davantage comme le résultat d'un déséquilibre de l'écosystème qu'ils contribuent à alimenter, que comme les initiateurs de la dysbiose. La lutte contre les pathobiontes, n'est souvent pas suffisante pour promouvoir la résilience de l'écosystème, en particulier lorsque les causes du déséquilibre premier ne sont pas éliminées. C'est ainsi que les antibiotiques qui éliminent les bactéries commensales favorisent la colonisation par *C. difficile* (Rousseau et al., 2011). La lutte directe contre *C. difficile* fonctionne mal tandis que la transplantation fécale, en favorisant le retour de bactéries mieux adaptées à la niche intestinale, suffit souvent à éliminer cette bactérie. La transplantation d'un écosystème total est également une piste thérapeutique envisagée pour aider les patients atteints de MICI et de certaines maladies métaboliques. Si cette technique est de fait efficace en clinique, comprendre comment et pourquoi elle fonctionne, est un enjeu majeur pour mettre au point des cibles thérapeutiques mieux ciblées et plus spécifiques.

Les concepts de colonisation successive, d'interaction trophique et de perturbation écologique permettent de replacer la description des mécanismes moléculaires d'interactions entre cellules épithéliales et bactéries, dans le fonctionnement plus global de cet écosystème. Chaque mécanisme ne peut être pris isolément mais il doit être mis en perspective avec les autres interactions qui se déroulent, de manière à obtenir un modèle plus global. Afin d'illustrer notre propos, prenons l'exemple d'un individu dont le microbiote abrite une large population de bactéries tolérologènes comme des *Clostridiales* et *Akkermansia muciniphila*. On peut supposer qu'il serait protégé par ces bactéries d'une inflammation intestinale induite par des facteurs exogènes. Cependant si en raison, de la présence de

certain substrats énergétiques ou de relations trophiques qui leur sont favorables, des bactéries au potentiel pro-inflammatoire se multiplient, comme les Proteobacteria, l'équilibre global dans l'intestin peut être malgré tout favorable à une maladie inflammatoire. Il est difficile de juger de l'influence d'une molécule ou d'une cytokine isolément. C'est l'équilibre entre les différents signaux, inflammatoires et non-inflammatoires, qui déterminent leur impact physiologique (Douglas and Werren, 2016; Guerrero et al., 2013; Werren et al., 2010).

Dans un article paru début 2018, Byndloss et Baümler proposent un cadre théorique pour penser les relations hôte-microbiote en relation avec les maladies non-infectieuses, par exemple, l'obésité ou les maladies du foie non alcoolique (Byndloss and Baümler, 2018). Ils suggèrent que l'hôte détermine profondément l'écosystème intestinal en maintenant des conditions d'hypoxie à la surface de l'épithélium et dans la lumière et en sécrétant de nombreuses molécules antimicrobiennes. Le taux d'oxygène est contenu à moins de 1% grâce à l'utilisation préférentielle de la β -oxydation par les colonocytes. Cette voie métabolique entretient des conditions propices à la colonisation et à la multiplication des bactéries anaérobies, qui produisent des acides gras utilisés comme substrat énergétique dans la β -oxydation. Différents facteurs peuvent altérer ces interactions trophiques bénéfiques pour l'hôte. Ils peuvent être d'origine exogène : antibiotiques, régime alimentaire, infection, ou endogène : dysfonction de l'épithélium, cicatrisation excessive, système immunitaire altéré. Les deux auteurs indiquent que l'un des marqueurs de la dysbiose est l'augmentation du taux d'oxygène dans l'intestin, qui favorise l'augmentation des Proteobacteria aérobies facultatives. Celles-ci ne sont pas forcément à l'origine du déséquilibre, d'ailleurs un grand nombre de Proteobacteria sont des commensales présentes en faible proportion dans un microbiote eubiotique. Néanmoins, ces bactéries sont très adaptées à l'utilisation d'accepteurs d'électron d'origine exogène ce qui leur permet de croître rapidement dans le contexte hyperoxique de la dysbiose. Ils proposent l'hypothèse que les métabolites bactériens soient des clefs dans le maintien de la symbiose intestinale. Un changement dans la concentration des acides gras, des dérivés de la choline, des indoles ou des acides biliaires par exemple, peut avoir des effets majeurs sur l'hôte, au niveau de l'intestin et bien au-delà. Cette réflexion est une piste intéressante pour appréhender le rôle des pathobiontes dans l'équilibre écologique de l'intestin, défini comme des organismes présents dans le microbiote eubiotique et inoffensif en temps normal, qui peuvent devenir pathogènes dans certaines conditions. Le fait que des bactéries, comme *Fusobacterium*, se multiplient lors des infections parodontiques, des appendicites ou des cancers du côlon, pourrait être lié à la plasticité de son métabolisme et à sa capacité à résister au stress hyperoxique. Etayant cette hypothèse, plusieurs études ont montré que *F. nucleatum* résiste à des conditions hyperoxiques pendant plusieurs heures. Ainsi l'expression de certains gènes de virulences et l'apparition d'un phénotype invasif chez cette bactérie, pourraient être régulés par le haut niveau d'oxygène rencontré dans les environnements dysbiotiques (Diaz et al., 2000; Silva et al., 2005).

Les relations de mutualisme qui existent entre un hôte et la communauté microbienne qui réside dans l'intestin sont un défi en termes de sélection et d'évolution. Pessimiste quant à nos chances d'expliquer en terme évolutif ces rapports, Charles Darwin écrivait en 1885 dans l'Origine des espèces, que toute preuve de coopération entre espèces, mettrait à mal la théorie de la sélection naturelle qu'il avait conçue. La mise en lumière ces dernières décennies, de l'importance des relations de symbioses dans le monde vivant et de leur diversité, suggèrent des principes d'évolution communs, stimulant les réflexions en matière d'écologie évolutive. De nombreux exemples de relations de coopération sont documentés, cependant rares sont les cas où l'on peut expliquer comment et pourquoi ces traits ont été sélectionnés (Rakoff-Nahoum et al., 2016).

Les travaux dans ce domaine montrent que l'hôte joue un rôle déterminant de stabilisation des relations mutualistes (Byndloss and Bäumlér, 2018; Foster et al., 2017; Schluter and Foster, 2012). De par sa capacité à agir sur l'ensemble de l'écosystème, l'hôte structure et sélectionne les micro-organismes et les fonctions qui lui sont favorables. L'intestin est une niche où les conditions sont fortement contrôlées par l'hôte : via le taux d'oxygène, la production de glycoprotéines, d'immunoglobulines ou encore des molécules antimicrobiennes. La composition et les fonctions de la population microbienne sont surveillées par l'hôte grâce aux systèmes de récepteurs de motifs microbiens (PRR), de métabolites comme les acides gras, les vitamines ou encore les indoles provenant du microbiote (GPR, AhR, FXR, TGR5). La présence du butyrate est un indicateur de la composition du microbiote et son absence déclencherait une réaction de l'hôte, en particulier du système immunitaire, visant à restructurer la communauté microbienne et à restaurer sa production.

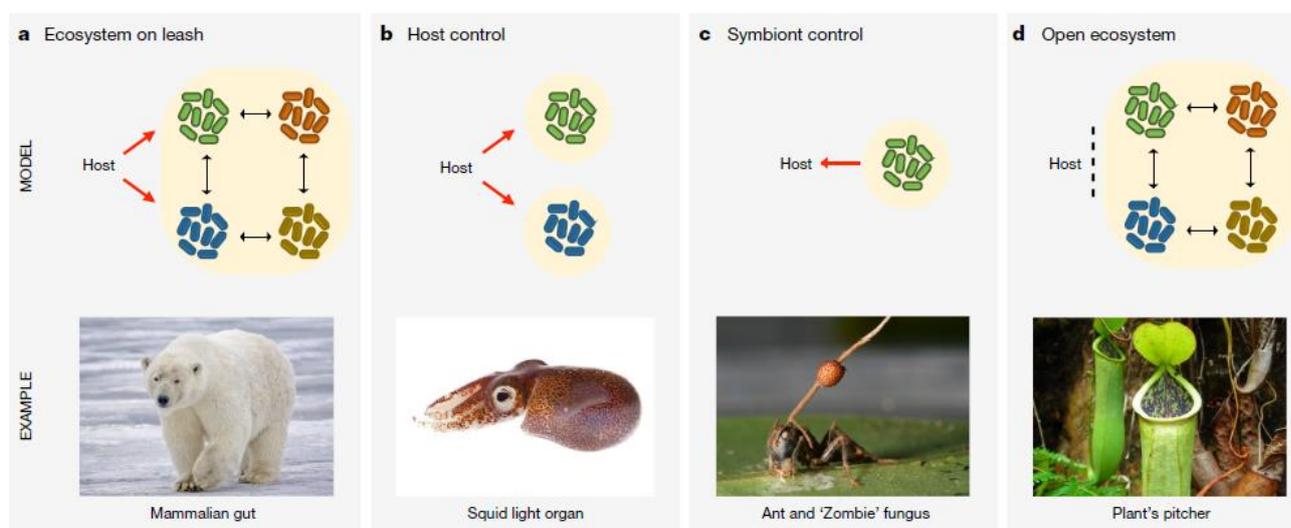


Figure V-1 : Illustration des différents modèles de relations hôte-microbiote : (A) écosystème en "laisse" dont l'évolution est contrôlé par l'hôte, (B) écosystème étroitement contrôlé par l'hôte, (C) microbiote qui contrôle l'hôte, (D) écosystème non contrôlé par l'hôte. Les flèches noires indiquent des interactions, les flèches rouges, des mécanismes de contrôle. Tire de Foster, Nature 2017

Dans le modèle proposé par Foster et Rakoff-Nahoum, d'écosystème « en laisse » (Figure V-1), la composition du microbiote intestinal évoluerait en fonction des relations microbes-microbes, dans un environnement déterminé par l'hôte afin qu'il lui soit bénéfique. Pour que l'hôte tire parti de l'écosystème, il n'est pas nécessaire de contrôler les espèces à l'échelle individuelle. Il lui suffit de favoriser l'émergence de certaines propriétés à l'échelle de communauté, telles que la productivité et la stabilité (Foster et al., 2017).

Pour parvenir à cet équilibre, le système immunitaire et les cellules épithéliales interagissent avec des espèces « clef de voûte » (keystone) de ces communautés, comme *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* ou potentiellement *A. muciniphila*. La caractéristique de ces espèces, est d'avoir un impact plus important sur leur écosystème que ne le laisse supposer leur abondance. Ce ne sont pas des espèces dominantes en proportion mais elles ont la capacité de structurer leur environnement et les communautés microbiennes (Hajishengallis et al., 2012). Ces travaux révèlent l'importance d'étudier en détail l'impact de l'hôte sur le microbiote afin de comprendre comment s'effectuent la sélection négative et positive des microbes. C'est à ce niveau que les travaux *in vitro* peuvent permettre de comprendre dans le détail les mécanismes d'interactions hôte-microbes. Pour aller plus loin, il est essentiel de mieux connaître les interactions entre les microbes eux-mêmes, les structures des communautés et leur biogéographie afin d'appréhender les conditions qui permettent à des pathogènes de s'établir. Les bactéries de la lumière intestinale ne

sont pas les mêmes que celles des cryptes, ce qui impose d'étudier les communautés des différentes niches intestinales et leurs interactions. L'approche systémique est une des clefs pour définir ce que restaurer un écosystème bénéfique pour l'hôte veut dire (Mark Welch et al., 2017).

Conclusion

Cette thèse explore les interactions entre les bactéries du microbiote et les cellules épithéliales de l'intestin humains. Elle vise à mettre en lumière la diversité des échanges qui contribuent à la mise en place et au maintien de l'homéostasie intestinale. Nous avons identifié des bactéries qui interviennent sur l'activité transcriptionnelle de *TGFBI*, *IDO1* et NFκB dans les cellules intestinales par différentes voies de signalisations. Ce travail devrait permettre de caractériser de nouveaux immuno-modulateurs bactériens. Parmi les métabolites bactériens, le butyrate a une importance particulière en tant que substrat métabolique des côlonocytes et par ses capacités de régulation transcriptionnelles très étendues. Nous avons mis en évidence que le butyrate sécrété par certains groupes bactériens comme les *Clostridiales* et les *Fusobacterium* est un puissant modulateur de *TGFBI* et d'*IDO1*. Par différentes techniques, nous avons montré que l'augmentation de la transcription de *TGFBI* en présence de butyrate passe par l'inhibition des HDAC et le facteur de transcription SP1. En outre, nos résultats indiquent que le butyrate inhibe la transcription d'*IDO1* par l'inhibition des HDAC par deux mécanismes distincts. Le premier, cible la voie d'activation d'*IDO1* par l'IFNγ en provoquant la diminution de STAT1 au niveau protéique. Dans un second mécanisme, le butyrate inhibe directement le promoteur d'*IDO1* ce qui bloque sa transcription, indépendamment de l'IFNγ. Plusieurs questions restent à étudier, en particulier, les interactions entre les protéines intermédiaires et le butyrate et sur leurs impacts dans un modèle s'approchant davantage de la physiologie intestinale.

Nos recherches révèlent que certaines bactéries intestinales libèrent des molécules activatrices de NFκB, indépendamment des acides gras à chaînes courtes, des TLR et de MYD88. Ces molécules stimulent la voie NOD1 ainsi que la voie ALPK1-TIFA-TRAF6. Dans son ensemble, ce travail met en valeur le rôle des cellules épithéliales intestinales dans la réponse immunitaire induite par les bactéries commensales et dans la régulation de la symbiose hôte-microbiote. L'activation de NOD1 par des *Clostridiales* ouvre la voie à une meilleure compréhension de la contribution de ce groupe majeur du microbiote à la régulation de NFκB dans l'intestin. De plus amples études sont nécessaires pour comprendre plus finement les mécanismes par lesquels ces bactéries stimulent NOD1. Le caractère le plus innovant de notre étude est de montrer que des bactéries intestinales libèrent des molécules activant ALPK1-TIFA-TRAF6, jusqu'ici uniquement mis en jeu par des pathogènes. Plusieurs questions restent non résolues à l'issue de ce projet, notamment concernant l'impact de ces voies de signalisation sur le maintien de l'homéostasie intestinale chez les sujets en bonne santé. Ces données ouvrent des pistes de recherche pour mieux comprendre l'impact des dysbioses du microbiote dans les inflammations intestinales, comme les MICI.

La relation de symbiose, entre notre organisme et le microbiote intestinal, est un défi permanent pour notre système immunitaire que nous sommes loin d'avoir décrypté. La caractérisation des mécanismes et des molécules contribuant à la stabilité de cette niche écologique est une piste de recherche prometteuse pour restaurer de manière thérapeutique l'équilibre de la relation hôte-microbiote.

Liste de figures

Figure I-1 : Structure du côlon humain. (A) Muqueuse intestinale avec des cryptes formées par les replis de l'épithélium (10X). (B) Zoom sur les cellules formant l'épithélium, cellules à mucus, entérocytes (40X). Adapté du cours de Dr A. Conolly Stanford Medical School.....	12
Figure I-2 : Structure de l'intestin grêle (A) et du côlon (B) humain pris en microscopie électronique à balayage (Baker, 2004).....	13
Figure I-3 : Microscopie à fluorescence sur des sections d'iléum (A) et de côlon (B) de souris, fixées au Carnoy. Mucine 2 (rouge), noyau (bleu), bactérie (vert), cellules épithéliales (vert). Adaptée de Wells (2016)	14
Figure I-4 : Schéma de la structure d'une jonction serrée (TJ) intestinale. Adapté de Charlotte Schmitt d'après Pearson 2012	15
Figure II-1 : Localisation des TLR dans le côlon humain et polarisation. Adapté d' Abreu 2010.....	18
Figure II-2 : Inflammasome NLRP3 formé d'un heptamère de NLRP3, des protéines adaptatrices ASC et des procaspases 1 en son centre. La formation de l'inflammasome conduit l'activation de la caspase 1 et au clivage de l'IL1 β . ASC (Apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD). Tiré d'Hansson 2011.....	20
Figure II-3 : Représentation schématique des différentes voies de reconnaissance de signaux exogènes. Les récepteurs TLR, NOD et certains NLRP ont principalement une activité liée à NF κ B (en haute). Certains récepteurs NLR agissent sur la transcription des voies de présentations antigéniques (en bas à gauche) tandis que d'autres sont nécessaires à la formation de l'inflammasome (en bas à droite). Tiré de Motta, 2015	21
Figure III-1 : Structure d'un TLR, ici TLR4 avec un domaine extracellulaire LRR et un domaine cytoplasmique TIR. Tiré de Gomez 2014.....	22
Figure III-2 : Illustration des différentes voies de signalisation mises en jeux par l'activation des TLR et de leur interconnexions. Tiré d'O'Neill 2013.....	22
Figure III-3 : Schéma illustrant le mécanisme d'activation de la voie classique de NF κ B suite à l'activation d'un TLR.....	23
Figure III-4 : Des stimuli différents activent des voies NF κ B distinctes. Chacune est caractérisée par des sous-unités qui constituent le complexe NF κ Bn un mécanisme d'activation et des cibles transcriptionnelles qui leurs sont propres. Tiré de Perkins 2007.....	25
Figure III-5 : Schéma des différents domaines des récepteurs NOD. CARD: caspase recruitment domain, NBD Nucleotide-binding domain =NATCH, LRR : leucine-rich repeats. Adapté de Phipott, 2014.	26
Figure III-6 : Synthèse de l'heptose biphosphate chez les bactéries. L'HBP est encadré en rouge. Tiré de Valvano 2002	27

Figure III-7 : Mécanisme de formation du TIFAsome et d'induction de NFκB. Les points d'interrogation illustrent les points qui ne sont pas encore totalement compris.....	28
Figure IV-1 : Schéma illustrant l'action de certains régulateurs négatifs de la voie NFκB. La molécule IRAK-m n'est pas exprimée dans les cellules épithéliales. La molécule PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibe l'activation des TLR par différents mécanismes (p38, JNK, NFκB). TRAF3 ubiquitine les TLR. Illustration tirée de Liew 2005.....	30
Figure IV-2 : Mécanisme de compétition pour les ligands entre la forme soluble de TLR2 et le TLR2 membranaire. Tiré de Liew 2005.....	31
Figure V-1: Les cellules épithéliales intestinales (IEC) s'inscrivent à l'interface des micro-organismes intestinaux et des cellules immunitaires professionnelles présentes dans l'épithélium (IEL) et dans la lamina propria. Elles sécrètent de nombreuses molécules immuno-modulatrices comme TSLP ou encore TGFB. L'IL10 promeut la différenciation en Treg tout en induisant sa propre sécrétion. TLA : thymus leukaemia antigen; sIgA : secretory IgA; IEL : intra-epithelial lymphocyte; SEMA7A : IEC-expressed semaphorin 7A. Adapté de Peterson et Artis,201433	
Figure V-2 : Spécialisation des lymphocytes T naïfs en différents types fonctionnels selon les signaux immunomodulateurs présents dans l'environnement. Cette spécialisation peut avoir lieu dans le thymus ou en périphérie (iTreg). Tiré de Campbell 2011.....	34
Figure V-3 : L'acide rétinoïque produit par les cellules épithéliales dans l'intestin conditionne les cellules dendritiques de la lamina propria dans un phénotype tolérogène et favorise le maintien de la barrière intestinal en augmentant la polarisation des lymphocytes T en Treg et Th17. Tiré de Halle, 2011.	36
Figure V-4 : Voie de dégradation du Tryptophane chez l'humain. Tire de Vecsei 2013	38
Figure V-5 : Mécanismes d'action décrit pour la protéine IDO1. Le premier (centre) est un effet enzymatique dû au métabolisme du tryptophane. Les deux autres mécanismes régulent les voies de signalisation de TGFB et de l'IL17. Tiré de Fallarino 2012	39
Figure V-6 : Voie d'activation des IFN de type I et II. Tiré de Decker 2005	41
Figure V-7 : Résumé des différents types de régulation d'IDO1. Tiré de Mellor et Munn 2004	42
Figure V-8 : Boucle d'auto-induction classique de TGFB. R-Smad = SMad2/3, Co-Smad= Smad4. Massagué 2000	43
Figure V-9 : Illustration du processus de maturation, d'assemblage et d'action de TGFB. Tiré de Hayashi 201243	
Figure V-10 : TGFB joue sur la différenciation et l'expansion des cellules immunitaires dans le thymus et en périphérie. NK : natural killer, NKT : natural killer T, CTL : cytotoxic T lymphocyte, DC : dendritic cell, ILC : innate lymphoid cell ; TEC : thymic epithelial cell, IEL : intraepithelial lymphocyte, T _{RM} : T resident memory, T _{FH} : follicular helper. Tiré de Chen 2016.....	45

Figure VI-1 : Différentes stratégies pour démontrer que l'apparition d'un phénotype chez les animaux axéniques est due au microbiote (souris ou autre). HMA : human-microbiota associated. Tiré de Round 2018.....	48
Figure VI-2 : Composition et concentrations des bactéries le long du tractus digestif, en organisme/g de contenu instinal. Tiré de Strator 2008	50
Figure VI-3 : Distribution des bactéries du microbiote fécale humain selon leur phylum et leur genre. Les échantillons provenant des études HMP et MetaHit montrent qu'il existe une forte variabilité entre proportions des phyla selon les individus. Adapté d'Arora 2016	51
Figure VI-4 Représentation des réseaux de cooccurrences au sein de chaque entérotype. Les genres avec une *, n'ont pas d'assignation taxonomique précise. Tiré d'Arumugam 2011.....	51
Figure VI-5 : Diversité de structures et de natures des petites molécules provenant du microbiote intestinal humain. Tiré de Donia 2015	53
Figure VI-6 : Voies métaboliques qui mènent à la transformation des fibres alimentaires en métabolites. Des exemples de bactéries et d'archées pour lesquelles il y a des preuves expérimentales ou des informations métagénomiques sur l'utilisation de ces voies métaboliques. Les archées sont en orange, les Bacteroidetes en gris, les Proteobactéries en marron, les Firmicutes sont répartis en Lachnospiraceae en bleu, Ruminococcaceae en violet et Negativicutes en vert. DHAP : dihydroxyacetonephosphate;PEP : phosphoenolpyruvate. Tiré de Louis 201457	
Figure VI-7 : Voies de signalisation mis en jeu par l'activation des GPR selon les sous-unités auxquelles ils sont liés. Les deux voies induites par l'activation de GPR43 (Gq) et des GPR41,43 et 109 (Gi) sont indiquées avec des flèches. Adapté de Dorsam 2007	59
Figure VI-8 : Résumé simplifié de l'impact des AGCC produits par le microbiote sur l'immunité intestinale. Tiré de Louis 2014.	61
Figure VI-9 : Colonisation de SFB dans l'intestin d'une souris. Le cadre en bas à droite montre comment la bactérie s'attache dans l'épithélium. Tiré de Schnupf 2015	62
Figure VI-10 : Capacité de bactéries individuelles à promouvoir dans des souris axéniques l'expansion des Treg dans le côlon après 2 semaines de colonisation. Chaque point représente une souris. Les bactéries en gras ont une capacité significative à induire des Treg dans les souris colonisées. Souris axéniques (GF), souris conventionnelles sans pathogènes (SPF). Tiré de Sefik 2015.	63
Figure VI-11 : Importance de l'équilibre Th17 et Treg dans l'homéostasie intestinale et en particulier dans la régulation la réponse immunitaire. Adapté de Lee 2011.....	64
Figure VI-12 : Résumé des interactions entre certaines bactéries intestinales et le système immunitaire intestinal. Les cellules épithéliales, les cellules dendritiques (DC) et les macrophages induisent la différenciation en TH17, TH1 ou Treg en fonction du contexte moléculaire. Adapté de Kamada 2013.....	65

Figure III-1 : Mécanismes proposés d'activation de TGFB1 par le butyrate via SP1 et l'inhibition des histones et lysines déacétylases, dans les cellules épithéliales intestinales.	152
Figure III-2 : Schéma récapitulant les mécanismes de régulation d'IDO, dépendant de l'IFN γ et indépendant, dans les cellules HT29.	157
Figure III-3 : Tableau résumant les implications connues des différentes bactéries dans les MICI ainsi que les mécanismes proposé. Les Clostridiales sont encadrés en vert. Encadré en vert. Adapté de Nagao-Kitamoto et Kamada 2017	159
Figure IV-1 : A. muciniphila imaged by electron microscopy (Ottman PhD 2015)	168
Figure IV-2 : Effet de bactéries entières, vivantes ou mortes, de leur surnageant ou de protéines purifiées, sur la production de cytokines par des cellules mononuclées de sang humain. Ottamn 2017	171
Figure IV-3 : Phylogramme basés sur les séquences 16s montrant les relations génétiques entre différentes espèces et sous-espèces de Fusobacterium. Les bactéries testées sont dans le cadre jaune. Adapté de Gupta 2014..	174
Figure IV-4 : Représentation des différences entre les parois des bactéries à Gram+ et Gram- ainsi que des deux structures de peptidoglycane. GlcNAc (N-acétylaglucosamine), MurNAc(N-écetylmuramique)	178
Figure IV-5 : Résumé simplifié des différents mécanismes d'activation de NFkB dans les cellules épithéliales. La partie encadrée en rouge correspond à celle que nous avons explorée dans ce travail de thèse. Adapté de Perterson et Artis 2014	180
Figure V-1 : Illustration des différents modèles de relations hôte-microbiote : (A) écosystème en "laisse" dont l'évolution est contrôle par l'hôte, (B) écosystème étroitement contrôlé par l'hôte, (C) microbiote qui contrôle l'hôte, (D) écosystème non contrôlé par l'hôte. Les flèches noires indiquent des interactions, les flèches rouges, des mécanismes de contrôle. Tire de Foster, Nature 2017	183

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les PRR dans le côlon humain et murin. Spécificité des ligands reconnus, expression et localisation. NC : non connu, NE : Non exprimé, Texte* : résultats divergents. Mda- 5 (melanoma differentiation-associated protein 5), LPG2 (laboratory of physiology and genetics 2) 17

Tableau 2: Résumé des affinités des récepteurs et des caractéristiques des transporteurs des AGCC dans l'intestin humain ainsi que leur localisation 59

Bibliographie

- Abed, J., Emgård, J.E.M., Zamir, G., Faroja, M., Almogy, G., Grenov, A., Sol, A., Naor, R., Pikarsky, E., Atlan, K.A., et al. (2016). Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed GalGalNAc. *Cell Host Microbe* 20, 215–225.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144.
- Afonina, I.S., Zhong, Z., Karin, M., and Beyaert, R. (2017). Limiting inflammation - The negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 18, 861–869.
- Aktorics, K. (2011). Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 487–498.
- Al-mosauwi, H., Ryan, E., Mcgrane, A., Riveros, S., Walpole, C., Dempsey, E., Courtney, D., and Fearon, N. (2016). Differential protein abundance of a basolateral MCT1 transporter in the human gastrointestinal tract. *Cell Biol. Int.*
- Andoh, A., Yagi, Y., Shioya, M., Nishida, A., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2008). Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14, 5154–5161.
- Argenzio, R.A. (1981). Short-chain fatty acids and the colon. *Dig. Dis. Sci.* 26, 97–99.
- van der Ark, K.C.H., Aalvink, S., Suarez-Diez, M., Schaap, P.J., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2018). Model-driven design of a minimal medium for *Akkermansia muciniphila* confirms mucus adaptation. *Microb. Biotechnol.*
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeke, J., DeRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451–455.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M.M., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., et al. (2011a). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337–341.
- Atarashi, K., Umesaki, Y., and Honda, K. (2011b). Microbial influence on T cell subset development. *Semin. Immunol.* 23, 146–153.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., et al. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232–236.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., et al. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 163, 367–380.
- Autschbach, F., Braunstein, J., Helmke, B., Zuna, I., Schürmann, G., Niemi, Z.I., Wallich, R., Otto, H.F., Meuer, S.C., and Schäfermann, G. (1998). In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* 153, 121–130.
- Badawy, A.A.B. (2017). Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *Int. J. Tryptophan Res.* 10.
- Badawy, A.A.-B., Namboodiri, A.M.A., and Moffett, J.R. (2016). The end of the road for the tryptophan depletion concept in pregnancy and infection. *Clin. Sci.* 130, 1327–1333.
- Bai, L., and Merchant, J.L. (2000). Transcription factor ZBP-89 cooperates with histone acetyltransferase p300 during butyrate activation of p21(waf1) transcription in human cells. *J. Biol. Chem.* 275, 30725–30733.
- Balzola, F., Bernstein, C., Ho, G.T., Lees, C., Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary. *Nature* 464, 59–65.
- Barceló-Batllori, S., André, M., Servis, C., Lévy, N., Takikawa, O., Michetti, P., Reymond, M., Felley-Bosco, Emanuela, Servis, C., Lévy, N., Takikawa, O., et al. (2002). Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: Implications for inflammatory bowel diseases. *Proteomics* 2, 551–560.
- Barnich, N., Aguirre, J.E., Reinecker, H.C., Xavier, R., and Podolsky, D.K. (2005). Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J. Cell Biol.* 170, 21–26.
- Bauché, D., and Marie, J.C. (2017). Transforming growth factor β : a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clin. Transl. Immunol.* 6, e136.
- Belzer, C., and De Vos, W.M. (2012). Microbes inside from diversity to function: The case of

Akkermansia. ISME J. 6, 1449–1458.

Benomar, S., Ranava, D., Cardenas, M.L., Trably, E., Rafrafi, Y., Ducret, A., Hamelin, J., Lojou, E., Steyer, J.P., and Giudici-Orticoni, M.T. (2015). Nutritional stress induces exchange of cell material and energetic coupling between bacterial species. *Nat Commun* 6, 6283.

Berer, K., Gerdes, Li.A., Cekanaviciute, E., and Wekerle, H. (2017). Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 10719–10724.

Berndt, B.E., Zhang, M., Owyang, S.Y., Cole, T.S., Wang, T.W., Luther, J., Veniaminova, N.A., Merchant, J.L., Chen, C.-C., Huffnagle, G.B., et al. (2012). Butyrate increases IL-23 production by stimulated dendritic cells. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G1384–G1392.

Berrebi, D., Maudinas, R., Hugot, J., Chamaillard, M., Chareyre, F., Lagausie, P. De, Yang, C., Desreumaux, P., Giovannini, M., Cézard, J., et al. (2003). Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 840–847.

Bielig, H., Lautz, K., Braun, P.R., Menning, M., Machuy, N., Brüggmann, C., Barisic, S., Eisler, S.A., Andree, M., Zurek, B., et al. (2014). The Cofilin Phosphatase Slingshot Homolog 1 (SSH1) Links NOD1 Signaling to Actin Remodeling. *PLoS Pathog.* 10.

Birchenall-Roberts, M.C., Ruscetti, F.W., Kasper, J., Lee, H., Friedman, R., Geiser, A., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1990). Transcriptional Regulation of the Transforming Growth Factor Promotor by v-src Gene Products Is Mediated through the AP-1 Complex. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4978–4983.

Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., and Wells, J.M. (2014). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 14, 1–25.

Bista, P., Zeng, W., Ryan, S., Bailly, V., Browning, J.L., and Lukashov, M.E. (2010). TRAF3 controls activation of the canonical and alternative NFκB by the lymphotoxin beta receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 12971–12978.

Blander, J.M., Longman, R.S., Ilijev, I.D., Sonnenberg, G.F., and Artis, D. (2017). Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat. Immunol.* 18, 851–860.

Boffa, L.C., Vidali, G., Mann, R.S., and Allfrey, V.G. (1978). Suppression of Histone Deacetylation in Vivo and in Vitro by Sodium Butyrate*. *J. Biol. Chem.* 253, 3364–3366.

Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.-A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J.-P., Giovannini, M., et al. (2007). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 997–1002.

Bonnegarde-Bernard, A., Jee, J., Fial, M.J., Aeffner, F., Cormet-Boyaka, E., Davis, I.C., Lin, M., Tomé, D., Karin, M., Sun, Y., et al. (2014). IKKβ in intestinal epithelial cells regulates allergen-specific IgA and allergic inflammation at distant mucosal sites. *Br. Dent. J.* 217, 257–267.

Borges-Canha, M., Portela-Cidade, J.P., Dinis-Ribeiro, M., Leite-Moreira, A.F., and Pimentel-Nunes, P. (2015). Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 107, 659–671.

Borthakur, A., Priyamvada, S., Kumar, A., Natarajan, A.A., Gill, R.K., Alrefai, W.A., and Dudeja, P.K. (2012). A novel nutrient sensing mechanism underlies substrate-induced regulation of monocarboxylate transporter-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303, G1126–G1133.

Boulard, O., Kirchberger, S., Royston, D.J., Maloy, K.J., and Powrie, F.M. (2012). Identification of a genetic locus controlling bacteria-driven colitis and associated cancer through effects on innate inflammation. *J. Exp. Med.* 209, 1309–1324.

Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., and Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456, 507–510.

Brand, M.W., Wannemuehler, M.J., Phillips, G.J., Proctor, A., Overstreet, A.M., Jergens, A.E., Orcutt, R.P., and Fox, J.G. (2015). The altered schaedler flora: Continued applications of a defined murine microbial community. *ILAR J.* 56, 169–178.

Brandacher, G., Perathoner, A., Ladurner, R., Schneeberger, S., Obrist, P., Winkler, C., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Weiss, H.G., Göbel, G., et al. (2006). Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: Effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin. Cancer Res.* 12, 1144–1151.

Brestoff, J.R.J., and Artis, D. (2013). Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat. Immunol.* 14, 676–684.

Breyner, N.M., Michon, C., de Sousa, C.S., Vilas Boas, P.B., Chain, F., Azevedo, V.A., Langella, P., and Chatel, J.M. (2017). Microbial anti-inflammatory molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF-κB pathway. *Front. Microbiol.* 8, 1–8.

- Briassouli, P., Chan, F., Savage, K., Reis-Filho, J.S., and Linardopoulos, S. (2007). Aurora-A Regulation of Nuclear Factor- κ B Signaling by Phosphorylation of I κ B. *Cancer Res.* *67*, 1689–1695.
- Brint, E.K., MacSharry, J., Fanning, A., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2011). Differential Expression of Toll-Like Receptors in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 329–336.
- Bronner, D.N., Faber, F., Olsan, E.E., Byndloss, M.X., Sayed, N.A., Xu, G., Yoo, W., Kim, D., Ryu, S., Lebrilla, C.B., et al. (2018). Genetic Ablation of Butyrate Utilization Attenuates Gastrointestinal Salmonella Disease. *Cell Host Microbe* *23*, 266–273.e4.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., et al. (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* *278*, 11312–11319.
- Brown, R.L., Sequeira, R.P., and Clarke, T.B. (2017). The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat. Commun.* *8*.
- Browne, H.P., Forster, S.C., Anonye, B.O., Kumar, N., Neville, B.A., Stares, M.D., Goulding, D., and Lawley, T.D. (2016). Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* *533*, 543–546.
- Buttó, L.F., Schaubeck, M., and Haller, D. (2015). Mechanisms of microbe-host interaction in Crohn’s disease: Dysbiosis vs. Pathobiont Selection. *Front. Immunol.* *6*.
- Byndloss, M.X., and Bäuml, A.J. (2018). The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nat. Publ. Gr.*
- Byndloss, M.X., Olsan, E.E., Rivera-Chávez, F., Tiffany, C.R., Cevallos, S.A., Lokken, K.L., Torres, T.P., Byndloss, A.J., Faber, F., Gao, Y., et al. (2017). Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* (80-.). *357*, 570–575.
- Campbell, B.M., Charych, E., Lee, A.W., and Möller, T. (2014). Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front. Neurosci.* *8*, 1–22.
- Canali, M.M., Porporatto, C., Aoki, M.P., Bianco, I.D., and Correa, S.G. (2010). Signals elicited at the intestinal epithelium upon chitosan feeding contribute to immunomodulatory activity and biocompatibility of the polysaccharide. *Vaccine* *28*, 5718–5724.
- Candido, E.P.M., Reeves, R., and Davie, J.R. (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* *14*, 105–113.
- Cario, E., Rosenberg, I.M., Brandwein, S.L., Beck, P.L., Reinecker, H.-C., and Podolsky, D.K. (2000). Lipopolysaccharide Activates Distinct Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cell Lines Expressing Toll-Like Receptors. *J. Immunol.* *164*, 966–972.
- Caro-Quintero, A., and Konstantinidis, K.T. (2012). Bacterial species may exist, metagenomics reveal. *Environ. Microbiol.* *14*, 347–355.
- Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., and Núñez, G. (2014). NOD1 and NOD2: Signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* *41*, 898–908.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Warren, L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Castellarin, M., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., et al. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* *22*, 299–306.
- Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., et al. (2004). Unbiased Mapping of Transcription Factor Binding Sites along Human Chromosomes 21 and 22 Points to Widespread Regulation of Noncoding RNAs. *Cell* *116*, 499–509.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., et al. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* *4*, 702–707.
- Chang, P. V., Hao, L., Offermanns, S., and Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 2247–2252.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M.M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* *500*, 541–546.
- Chelakkot, C., Choi, Y., Kim, D.-K., Park, H.T.H.-S., Ghim, J., Kwon, Y., Jeon, J., Kim, M.-S., Jee, Y.-K., Gho, Y.S., et al. (2018). Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Exp. Mol. Med.* *50*, e450.
- Chen, W., and Ten Dijke, P. (2016). Immunoregulation by members of the TGF β superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 723–740.
- Chen, G.Y., Shaw, M.H., Redondo, G., and Núñez, G. (2008). Innate immune receptor nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. *Cancer Res.* *68*, 10060–10067.

- Chen, L.-W., Egan, L., Li, Z.-W., Greten, F.R., Kagnoff, M.F., and Karin, M. (2003). The two faces of IKK and NF- κ B inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 9, 548–553.
- Cheng, L.S., Chiang, S., Tu, H., Chang, S., Wang, T., Ko, A.M., Chakraborty, R., and Ko, Y. (2004). Genomewide Scan for Gout in Taiwanese Aborigines Reveals Linkage to Chromosome 4q25. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 498–503.
- Chon, S.Y., Hassanain, H.H., and Gupta, S.L. (1996). Cooperative Role of Interferon Regulatory Factor 1 and p91 (STAT1) Response Elements in Interferon- γ -inducible Expression of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene. *J. Biol. Chem.* 271, 17247–17252.
- Cimermancic, P., Medema, M.H., Claesen, J., Kurita, K., Wieland Brown, L.C., Mavrommatis, K., Pati, A., Godfrey, P.A., Koehrsen, M., Clardy, J., et al. (2014). Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. *Cell* 158, 412–421.
- Ciorba, M.A. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase in intestinal disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29, 146–152.
- Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y., and Weiser, J.N. (2010). Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat. Med.* 16, 228–231.
- Claus, S.P., Tsang, T.M., Wang, Y., Cloarec, O., Skordi, E., Martin, F.P., Rezzi, S., Ross, A., Kochhar, S., Holmes, E., et al. (2008). Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes. *Mol. Syst. Biol.* 4, 1–14.
- Clavel, T., Lagkouvardos, I., and Stecher, B. (2017). From complex gut communities to minimal microbiomes via cultivation. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 148–155.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., et al. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.* 201, 19–25.
- Cohen, L.J., Kang, H.-S., Chu, J., Huang, Y.-H., Gordon, E. a., Reddy, B.V.B., Ternei, M. a., Craig, J.W., and Brady, S.F. (2015). Functional metagenomic discovery of bacterial effectors in the human microbiome and isolation of commendamide, a GPCR G2A/132 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E4825–E4834.
- Cohen, L.J., Esterhazy, D., Kim, S.H., Lemetre, C., Aguilar, R.R., Gordon, E.A., Pickard, A.J., Cross, J.R., Emiliano, A.B., Han, S.M., et al. (2017). Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signalling molecules. *Nature* 549, 48–53.
- Collado, M.C., Derrien, M., Isolauri, E., De Vos, W.M., and Salminen, S. (2007). Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7767–7770.
- Collins, M.D., Lawson, P. a, Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A., New, F., et al. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812–826.
- Conrads, G., Claros, M.C., Citron, D.M., Tyrrell, K.L., Merriam, V., and Goldstein, E.J.C. (2002). 16S – 23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic. 493–499.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C. V, Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764.
- Copenhagen-Glazer, S., Sol, A., Abed, J., Naor, R., Zhang, X., Han, Y.W., and Bachrach, G. (2015). Fap2 of *Fusobacterium nucleatum* is a galactose-inhibitable adhesin involved in coaggregation, cell adhesion, and preterm birth. *Infect. Immun.* 83, 1104–1113.
- Correa, R.G., Khan, P.M., Askari, N., Zhai, D., Gerlic, M., Brown, B., Magnuson, G., Spreafico, R., Albani, S., Sergienko, E., et al. (2011). Discovery and Characterization of 2-Aminobenzimidazole Derivatives as Selective NOD1 Inhibitors. *Chem. Biol.* 18, 825–832.
- Costea, P.I., Hildebrand, F., Manimozhiyan, A., Bäckhed, F., Blaser, M.J., Bushman, F.D., de Vos, W.M., Ehrlich, S.D., Fraser, C.M., Hattori, M., et al. (2018). Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* 3, 8–16.
- Cummings, J.H. (1981). Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 22, 763–779.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P.E., Macfarlane, G.T., Branch, H.W.J., Naylor, C.P.E., and Macfarlane, T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227.
- Dai, X., and Zhu, B.T. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: Implications for its biological functions. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 17–28.
- Dalmaso, G., Nguyen, H.T., Charrier-Hisamuddin, L., Yan, Y., Laroui, H., Demoulin, B., Sitaraman, S. V, and Merlin, D. (2010). PepT1 mediates transport of the

proinflammatory bacterial tripeptide L-Ala- g -D-Glu-meso -DAP in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G687–G696.

Dao, M.C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E.O., Kayser, B.D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., et al. (2016). *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 65, 426–436.

Davidson, N.J., Leach, M.W., Fort, M.M., Thompson-Snipes, L., Kühn, R., Müller, W., Berg, D.J., and Rennick, D.M. (1996). T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184, 241–251.

Davie, J.R., He, S., Li, L., Sekhvat, A., Espino, P., Drobic, B., Dunn, K.L., Sun, J.M., Chen, H.Y., Yu, J., et al. (2008). Nuclear organization and chromatin dynamics - Sp1, Sp3 and histone deacetylases. *Adv. Enzyme Regul.* 48, 189–208.

Davila, A.M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P.H., Sanz, Y., and Tomé, D. (2013). intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol. Res.* 69, 114–126.

Derrien, M., Van Baarlen, P., Hooiveld, G., Norin, E., Müller, M., and de Vos, W.M. (2011). Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front. Microbiol.* 2, 1–14.

Derrien, M., Belzer, C., and de Vos, W.M. (2017). *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb. Pathog.* 106, 171–181.

Desvignes, L., and Ernst, J.D. (2009). Interferon-g-Responsive Nonhematopoietic Cells Regulate the Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 31, 974–985.

Dethlefsen, L., and Relman, D.A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 4554–4561.

Diaz, P.I., Zilm, P.S., and Rogers, a H. (2000). The response to oxidative stress of *Fusobacterium nucleatum* grown in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 187, 31–34.

Dlugosz, A., Zakikhany, K., Acevedo, N., D'Amato, M., and Lindberg, G. (2017). Increased Expression of Toll-Like Receptors 4, 5, and 9 in Small Bowel Mucosa from Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Biomed Res. Int.* 2017, 1–7.

Dokmanovic, M., Clarke, C., and Marks, P. a (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and

perspectives. *Mol. Cancer Res.* 5, 981–989.

Donia, M.S., and Fischbach, M.A. (2015). Small molecules from the human microbiota. *Science* (80-.). 349, 1254766–1254766.

Donia, M.S., Cimermanic, P., Schulze, C.J., Wieland Brown, L.C., Martin, J., Mitreva, M., Clardy, J., Linington, R.G., and Fischbach, M.A. (2014). A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. *Cell* 158, 1402–1414.

Dorrestein, P.C., Mazmanian, S.K., and Knight, R. (2014). Finding the Missing Links among Metabolites, Microbes, and the Host. *Immunity* 40, 824–832.

Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79–94.

Douglas, A.E., and Werren, J.H. (2016). Holes in the hologenome: Why host-microbe symbioses are not holobionts. *MBio* 7, 1–7.

Dubuquoy, L., Jansson, E.A., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J.-F., Auwerx, J., Pettersson, S., and Desreumaux, P. (2003). Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 1265–1276.

Dubuquoy, L., Rousseaux, C., Thuru, X., Peyrin-Biroulet, L., Romano, O., Chavatte, P., Chamaillard, M., and Desreumaux, P. (2006). PPARγ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* 55, 1341–1349.

Duncan, S.A., Baganizi, D.R., Sahu, R., Singh, S.R., and Dennis, V.A. (2017). SOCS proteins as regulators of inflammatory responses induced by bacterial infections: A review. *Front. Microbiol.* 8, 1–15.

Duncan, S.H., Holtrop, G., Lobley, G.E., Calder, A.G., Stewart, C.S., and Flint, H.J. (2004). Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br. J. Nutr.* 91, 915–923.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* (80-.). 302, 1635–1639.

Eckmann, L., Nebelsiek, T., Fingerle, A.A., Dann, S.M., Mages, J., Lang, R., Robine, S., Kagnoff, M.F., Schmid, R.M., Karin, M., et al. (2008). Opposing functions of IKKbeta during acute and chronic intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15058–15063.

Efimov, I., Basran, J., Sun, X., Chauhan, N., Chapman, S.K., Mowat, C.G., and Raven, E.L. (2012). The mechanism of substrate inhibition in human indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 3034–3041.

- Ellis, R.D., Goodlad, J.R., Limb, G.A., Powell, J.J., Thompson, R.P.H., and Pouchard, N.A. (1998). Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm. Res.* *47*, 440–445.
- Fagerberg, L., Hallström, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., et al. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 397–406.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 1206–1212.
- Fallarino, F., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase: From catalyst to signaling function. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1932–1937.
- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., et al. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* (80-). *352*, 560–564.
- Fantini, M.C., Monteleone, G., and MacDonald, T.T. (2007). New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *13*, 1419–1423.
- Ferdinande, L., Demetter, P., Perez-Novo, C., Waeytens, A., Taideman, J., Rottiers, I., Rottiers, P., De Vos, M., and Cuvelier, C.A. (2008). Inflamed intestinal mucosa features a specific epithelial expression pattern of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *21*, 289–295.
- Fleming, S.E., and Yeo, S. (1990). Production and Absorption of Short-Chain Fatty Acids. *Dig. Dis. Sci.* *301–315*.
- Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira-Silva, S., Gudmundsdottir, V., Krogh Pedersen, H., et al. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* *528*, 262–266.
- Foster, K.R., Schluter, J., Coyte, K.Z., and Rakoff-Nahoum, S. (2017). The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature* *548*, 43–51.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R. a, Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13780–13785.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J. Exp. Med.* *196*, 459–468.
- Fujigaki, S., Saito, K., Sekikawa, K., Tone, S., Takikawa, O., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., and Seishima, M. (2001). Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2313–2318.
- Fukunaga, M., Yamamoto, Y., Kawasoe, M., Arioka, Y., Murakami, Y., Hoshi, M., and Saito, K. (2012). Studies on tissue and cellular distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase 2: The absence of IDO1 upregulates IDO2 expression in the epididymis. *J. Histochem. Cytochem.* *60*, 854–860.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446–450.
- Furuzawa-Carballeda, J., Fonseca-Camarillo, G., Lima, G., and Yamamoto-Furusho, J.K. (2013). Indoleamine 2,3-dioxygenase: expressing cells in inflammatory bowel disease—a cross-sectional study. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*, 278035.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., et al. (2009). The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* *31*, 677–689.
- Gagliani, N., Vesely, M.C.A., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N.W., de Zoete, M.R., Licona-Limón, P., Paiva, R.S., Ching, T., et al. (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* *523*, 221–225.
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., and Steinkühler, C. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: From molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res.* *17*, 195–211.
- Gallo, R.L., and Hooper, L. V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 503–516.
- Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E.J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D., Weiner, H.L., and Quintana, F.J. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 846–853.
- Ganji-Arjenaki, M., and Rafieian-Kopaei, M. (2018). Probiotics are a good choice in remission of

inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J. Cell. Physiol.* 233, 2091–2103.

Gao, W., Yang, J., Liu, W., Wang, Y., and Shao, F. (2016). Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pyrin inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E4857–E4866.

Garret, W.S., Garrett, W.S., Garret, W.S., and Garrett, W.S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science* (80-.). 348, 80–86.

Gaudet, R.G., Sintsova, A., Buckwalter, C.M., Leung, N., Cochrane, A., Li, J., Cox, A.D., Moffat, J., and Gray-Owen, S.D. (2015). Cytosolic detection of the bacterial metabolite HBP activates TIFA-dependent innate immunity. *Science* (80-.). 348, 1251–1255.

Gaudet, R.G., Guo, C.X., Molinaro, R., Kottwitz, H., Rohde, J.R., Dangeard, A.S., Arrieumerlou, C., Girardin, S.E., and Gray-Owen, S.D. (2017). Innate Recognition of Intracellular Bacterial Growth Is Driven by the TIFA-Dependent Cytosolic Surveillance Pathway. *Cell Rep.* 19, 1418–1430.

Genser, L., Poitou, C., Brot-Laroche, É., Rousset, M., Vaillant, J.-C., Clément, K., Thenet, S., and Leturque, A. (2016). L'altération de la perméabilité intestinale : chaînon manquant entre dysbiose et inflammation au cours de l'obésité ? *Médecine/sciences* 32, 461–469.

Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230.

Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M. a E., Ng, D.C.K., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2011). Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity* 34, 794–806.

Geva-Zatorsky, N., Sefik, E., Kua, L., Pasman, L., Tan, T.G., Ortiz-Lopez, A., Yanortsang, T.B., Yang, L., Jupp, R., Mathis, D., et al. (2017). Mining the Human Gut Microbiota for Immunomodulatory Organisms. *Cell* 168, 928–943.e11.

Giacomin, P.R., Moy, R.H., Noti, M., Osborne, L.C., Siracusa, M.C., Alenghat, T., Liu, B., McCorkell, K.A., Troy, A.E., Rak, G.D., et al. (2015). Epithelial-intrinsic IKK α expression regulates group 3 innate lymphoid cell responses and antibacterial immunity. *J. Exp. Med.* 212, 1513–1528.

Gibson, M.K., Pesesky, M.W., and Dantas, G. (2014). The Yin and Yang of bacterial resilience in the human gut microbiota. *J. Mol. Biol.* 426, 3866–3876.

Gill, R.K., Saksena, S., Alrefai, W.A., Sarwar, Z., Goldstein, J.L., Carroll, R.E., Ramaswamy, K., and Dudeja, P.K. (2005). Expression and membrane

localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289, C846–C852.

Ginter, T., Bier, C., Knauer, S.K., Sughra, K., Hildebrand, D., Münz, T., Liebe, T., Heller, R., Henke, A., Stauber, R.H., et al. (2012). Histone deacetylase inhibitors block IFN γ -induced STAT1 phosphorylation. *Cell. Signal.* 24, 1453–1460.

Girardin, S.E. (2003). Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science* (80-.). 300, 1584–1587.

Gonçaves, P., Araújo, J.R., and Martel, F. (2011). Characterization of butyrate uptake by nontransformed intestinal epithelial cell lines. *J. Membr. Biol.* 240, 35–46.

Goodrich, J.K., Davenport, E.R., Beaumont, M., Jackson, M.A., Knight, R., Ober, C., Spector, T.D., Bell, J.T., Clark, A.G., and Ley, R.E. (2016). Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* 19, 731–743.

Gorvel, L., Korenfeld, D., Tung, T., and Klechevsky, E. (2017). Dendritic Cell-Derived IL-32 α : A Novel Inhibitory Cytokine of NK Cell Function. *J. Immunol.* 199, 1290–1300.

Gourbeyre, P., Berri, M., Lippi, Y., Meurens, F., Vincent-Naulleau, S., Laffitte, J., Rogel-Gaillard, C., Pinton, P., and Oswald, I.P. (2015). Pattern recognition receptors in the gut: Analysis of their expression along the intestinal tract and the crypt/villus axis. *Physiol. Rep.* 3, 1–15.

Goverse, G., Molenaar, R., Macia, L., Tan, J., Erkelens, M.N., Konijn, T., Knippenberg, M., Cook, E.C.L., Hanekamp, D., Veldhoen, M., et al. (2017). Diet-Derived Short Chain Fatty Acids Stimulate Intestinal Epithelial Cells To Induce Mucosal Tolerogenic Dendritic Cells. *J. Immunol.* 198.

Grohmann, U., and Bronte, V. (2010). Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunol. Rev.* 236, 243–264.

Grohmann, U., Fallarino, F., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Vacca, C., Orabona, C., Uyttenhove, C., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2001). IL-6 Inhibits the Tolerogenic Function of CD8 + Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J. Immunol.* 167, 708–714.

Groslambert, M., Py, B.F., and Lyon, U. (2018). un inflammasome sous contrôle. *34*, 47–53.

Guerrero, R., Margulis, L., and Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: The holobiont as a unit of evolution. *Int. Microbiol.* 16, 133–143.

Guo, C.J., Chang, F.Y., Wyche, T.P., Backus, K.M., Acker, T.M., Funabashi, M., Taketani, M., Donia, M.S., Nayfach, S., Pollard, K.S., et al. (2017a). Discovery of Reactive Microbiota-Derived

Metabolites that Inhibit Host Proteases. *Cell* 168, 517–526.e18.

Guo, X., Liang, Y., Zhang, Y., Lasorella, A., Kee, B.L., and Fu, Y.X. (2015). Innate Lymphoid Cells Control Early Colonization Resistance against Intestinal Pathogens through ID2-Dependent Regulation of the Microbiota. *Immunity* 42, 731–743.

Guo, X., Li, S., Zhang, J., Wu, F., Li, X., Wu, D., Zhang, M., Ou, Z., Jie, Z., Yan, Q., et al. (2017b). Genome sequencing of 39 *Akkermansia muciniphila* isolates reveals its population structure, genomic and functional diversity, and global distribution in mammalian gut microbiotas. *BMC Genomics* 18, 1–12.

Gupta, R.S., and Sethi, M. (2014). Phylogeny and molecular signatures for the phylum Fusobacteria and its distinct subclades. *Anaerobe* 28, 182–198.

Gur, C., Ibrahim, Y., Isaacson, B., Yamin, R., Abed, J., Gamliel, M., Enk, J., Bar-On, Y., Stanitsky-Kaynan, N., Copenhagen-Glazer, S., et al. (2015). Binding of the Fap2 protein of fusobacterium nucleatum to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 42, 344–355.

Gurtner, G.J., Newberry, R.D., Schloemann, S.R., McDonald, K.G., and Stenson, W.F. (2003). Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Augments Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis in Mice. *Gastroenterology* 125, 1762–1773.

Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nuñez, G., and Fernandez-Luna, J.L. (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 277, 41701–41705.

Gutiérrez-Vázquez, C., and Quintana, F.J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* 48, 19–33.

Hajishengallis, G., Darveau, R.P., and Curtis, M. a (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 717–725.

Hall, J. a, Grainger, J.R., Spencer, S.P., and Belkaid, Y. (2011). The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 35, 13–22.

Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., and Brummer, R.-J. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27, 104–119.

Han, Y.W. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 141–147.

Han, D., Walsh, M.C., Cejas, P.J., Dang, N.N., Kim, Y.F., Kim, J., Charrier-Hisamuddin, L., Chau, L., Zhang, Q., Bittinger, K., et al. (2013). Dendritic Cell Expression of the Signaling Molecule TRAF6 Is

Critical for Gut Microbiota-Dependent Immune Tolerance. *Immunity* 38, 1211–1222.

Han, M., Rajput, C., Hong, J.Y., Lei, J., Hinde, J.L., Wu, Q., Bentley, J.K., and Hershenson, M.B. (2017a). The Innate Cytokines IL-25, IL-33, and TSLP Cooperate in the Induction of Type 2 Innate Lymphoid Cell Expansion and Mucous Metaplasia in Rhinovirus-Infected Immature Mice. *J. Immunol.* ji1700216.

Han, Y.M., Koh, J., Kim, J.S.J.W.J.S., Lee, C., Koh, S.J., Kim, B.G., Lee, K.L., Im, J.P., and Kim, J.S.J.W.J.S. (2017b). NF- κ B activation correlates with disease phenotype in Crohn's disease. *PLoS One* 12, 1–13.

Hanson, E.P., Monaco-Shawver, L., Solt, L.A., Madge, L.A., Banerjee, P.P., May, M.J., and Orange, J.S. (2008). Hypomorphic nuclear factor- κ B essential modulator mutation database and reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 1169–1193.

Harrington, L., Srikanth, C. V., Antony, R., Rhee, S.J., Mellor, A.L., Hai, N.S., and Cherayil, B.J. (2008). Deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances commensal-induced antibody responses and protects against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect. Immun.* 76, 3045–3053.

Hasegawa, M., Yang, K., Hashimoto, M., Park, J.H., Kim, Y.G., Fujimoto, Y., Nuñez, G., Fukase, K., and Inohara, N. (2006). Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J. Biol. Chem.* 281, 29054–29063.

Hasegawa, M., Yamazaki, T., Kamada, N., Tawaratsumida, K., Kim, Y.-G., Nunez, G., and Inohara, N. (2011). Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1 Mediates Recognition of *Clostridium difficile* and Induces Neutrophil Recruitment and Protection against the Pathogen. *J. Immunol.* 186, 4872–4880.

Hayakawa, K., Formica, A.M., Zhou, Y., Ichikawa, D., Asano, M., Li, Y.-S., Shinton, S.A., Brill-Dashoff, J., Nuñez, G., and Hardy, R.R. (2017). NLR Nod1 signaling promotes survival of BCR-engaged mature B cells through up-regulated Nod1 as a positive outcome. *J. Exp. Med.* 214, 3067–3083.

Hayashi, A., Sato, T., Kamada, N., Mikami, Y., Matsuoka, K., Hisamatsu, T., Hibi, T., Roers, A., Yagita, H., Ohteki, T., et al. (2013). A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe* 13, 711–722.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132, 344–362.

He, Y.W., Wang, H.-S.S., Zeng, J., Fang, X., Chen, H.-Y.Y., Du, J., and Yang, X.Y. (2013). Sodium

- butyrate inhibits interferon-gamma induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression via STAT1 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sci.* 93, 509–515.
- Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Chin, W.P., Crockford, T.L., Cornall, R.J., et al. (2008). Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 5, 0440–0460.
- Van Heel, D.A., Ghosh, S., Hunt, K.A., Mathew, C.G., Forbes, A., Jewell, D.P., and Playford, R.J. (2005). Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* 54, 1553–1557.
- Heilig, R., and Broz, P. (2018). Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur. J. Immunol.* 48, 230–238.
- Hergott, C.B., Roche, A.M., Tamashiro, E., Clarke, T.B., Bailey, A.G., Laughlin, A., Bushman, F.D., and Weiser, J.N. (2016). Peptidoglycan from the gut microbiota governs the lifespan of circulating phagocytes at homeostasis. *Blood* 127, 2460–2471.
- Hinnebusch, B., Meng, S., and Wu, J. (2002). The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J. Nutr.* 1012–1017.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H.C., Nadeau, W.J., McCormick, B.A., and Podolsky, D.K. (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 993–1000.
- Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol. Rev.* 210, 171–186.
- Hooper, L. V. (2015). *Epithelial Cell Contributions to Intestinal Immunity* (Elsevier Inc.).
- Hooper, L. V., Littman, D.R., Macpherson, A.J., and Program, M.P. (2012). Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* (80-.). 336, 1268–1273.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168, 4531–4537.
- Hosomi, S., Kaser, A., and Blumberg, R.S. (2015). Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 31, 81–88.
- Huang, C.-C.F., Weng, J.-H., Wei, T.-Y.W., Wu, P.-Y.G., Hsu, P.-H., Chen, Y.-H., Wang, S.-C., Qin, D., Hung, C.-C., Chen, S.-T., et al. (2012). Intermolecular Binding between TIFA-FHA and TIFA-pT Mediates Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulation and NF- κ B Activation. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3800–3800.
- Huang, N., Katz, J.P., Martin, D.R., and Wu, G.D. (1997). Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine* 9, 27–36.
- Huang, W., Zhao, S., Ammanamanchi, S., Brattain, M., Venkatasubbarao, K., and Freeman, J.W. (2005). Trichostatin A induces transforming growth factor- β type II receptor promoter activity and acetylation of Sp1 by recruitment of PCAF/p300 to a Sp1/NF- κ B complex. *J. Biol. Chem.* 280, 10047–10054.
- Hudson, B.D., Tikhonova, I.G., Pandey, S.K., Ulven, T., and Milligan, G. (2012). Extracellular ionic locks determine variation in constitutive activity and ligand potency between species orthologs of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. *J. Biol. Chem.* 287, 41195–41209.
- Human, T., Project, M., and The Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214.
- Hungate, R.E. (1950). The Anaerobic Mesophilic Cellulolytic Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14, 1–49.
- Hyun, J., Romero, L., Riveron, R., Flores, C., Kanagavelu, S., Chung, K.D., Alonso, A., Sotolongo, J., Ruiz, J., Manukyan, A., et al. (2015). Human intestinal epithelial cells express interleukin-10 through Toll-like receptor 4-mediated epithelial-macrophage crosstalk. *J. Innate Immun.* 7, 87–101.
- Icardi, L., De Bosscher, K., and Tavernier, J. (2012). The HAT/HDAC interplay: Multilevel control of STAT signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 283–291.
- Ignacio, A., Morales, C.I., Câmara, N.O.S., and Almeida, R.R. (2016). Innate sensing of the gut microbiota: Modulation of inflammatory and autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 7, 1–11.
- Ihara, S., Hirata, Y., and Koike, K. (2017). TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J. Gastroenterol.* 52, 777–787.
- Iliev, I.D., Spadoni, I., Mileti, E., Matteoli, G., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Foschi, D., Caprioli, F., Viale, G., Rescigno, M., et al. (2009). Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 58, 1481–1489.
- Imaeda, H., Andoh, A., Aomatsu, T., Osaki, R., Bamba, S., Inatomi, O., Shimizu, T., and Fujiyama, Y. (2011). A new isoform of interleukin-32 suppresses IL-8 mRNA expression in the intestinal epithelial cell line HT-29. *Mol. Med. Rep.* 4, 483–487.

- Ishiguro, K., Ando, T., Maeda, O., Watanabe, O., and Goto, H. (2014). Suppressive action of acetate on interleukin-8 production via tubulin-acetylation. *Immunol. Cell Biol.* *92*, 624–630.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, V., Tanoue, T., et al. (2009). Induction of the intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* *139*, 485–498.
- Iwamura, C., Bouladoux, N., Belkaid, Y., Sher, A., and Jankovic, D. (2017). Sensing of the microbiota by NOD1 in mesenchymal stromal cells regulates murine hematopoiesis. *Blood* *129*, 171–176.
- James, S.L., Christophersen, C.T., Bird, A.R., Conlon, M.A., Rosella, O., Gibson, P.R., and Muir, J.G. (2015). Abnormal fibre usage in UC in remission. *Gut* *64*, 562–570.
- Jamilloux, Y., and Henry, T. (2013). [The inflammasomes: platforms of innate immunity]. *Med Sci* *29*, 975–984.
- Jaronen, M., and Quintana, F.J. (2014). Immunological Relevance of the Coevolution of IDO1 and AHR. *Front. Immunol.* *5*, 1–7.
- Jarry, A., Bossard, C., Bou-Hanna, C., Masson, D., Espaze, E., Denis, M.G., and Laboisse, C.L. (2008). Mucosal IL-10 and TGF- β play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN- γ -mediated epithelial damage in human colon explants. *J. Clin. Invest.* *118*, 1132–1142.
- Jarry, A., Bossard, C., Sarrabayrouse, G., Mosnier, J.-F., and Laboisse, C.L. (2011). Loss of interleukin-10 or transforming growth factor β signaling in the human colon initiates a T-helper 1 response via distinct pathways. *Gastroenterology* *141*, 1887–96-2.
- Jeon, S.G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, N.M., Kiyono, H., Ma, J.S., Kusu, T., et al. (2012). Probiotic *Bifidobacterium breve* Induces IL-10-Producing Tr1 Cells in the Colon. *PLoS Pathog.* *8*, e1002714.
- Jia, Y.P., Wang, K., Zhang, Z.J., Tong, Y.N., Han, D., Hu, C.Y., Li, Q., Xiang, Y., Mao, X.H., and Tang, B. (2017). TLR2/TLR4 activation induces Tregs and suppresses intestinal inflammation caused by *Fusobacterium nucleatum* in vivo. *PLoS One* *12*, 1–12.
- Jiang, G.-M.M., He, Y.-W.W., Fang, R., Zhang, G., Zeng, J., Yi, Y.-M.M., Zhang, S., Bu, X.-Z.Z., Cai, S.-H.H., and Du, J. (2010). Sodium butyrate down-regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 1840–1846.
- Jiang, L., Shen, Y., Guo, D., Yang, D., Liu, J., Fei, X., Yang, Y., Zhang, B., Lin, Z., Yang, F., et al. (2016). EpCAM-dependent extracellular vesicles from intestinal epithelial cells maintain intestinal tract immune balance. *Nat. Commun.* *7*, 1–15.
- Johansson, K.R., and Sarles, W.B. (1949). SOME CONSIDERATIONS OF THE BIOLOGICAL IMPORTANCE OF INTESTINAL MICROORGANISMS. *Bacteriol. Rev.* *13*, 25–45.
- Kaiko, G.E., Ryu, S.H., Koues, O.I., Collins, P.L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E.J.E.L., Pearce, E.J.E.L., Oltz, E.M., and Stappenbeck, T.S. (2016). The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell* *167*, 1137.
- Kaisar, M.M.M., Pelgrom, L.R., van der Ham, A.J., Yazdanbakhsh, M., and Everts, B. (2017). Butyrate Conditions Human Dendritic Cells to Prime Type 1 Regulatory T Cells via both Histone Deacetylase Inhibition and G Protein-Coupled Receptor 109A Signaling. *Front. Immunol.* *8*, 1–14.
- Kanai, T., Mikami, Y., and Hayashi, A. (2015). A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.*
- Kang, C. sung, Ban, M., Choi, E.J., Moon, H.G., Jeon, J.S., Kim, D.K., Park, S.K., Jeon, S.G., Roh, T.Y., Myung, S.J., et al. (2013). Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially *Akkermansia muciniphila*, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *PLoS One* *8*.
- Kang, S., Okuno, T., Takegahara, N., Takamatsu, H., Nojima, S., Kimura, T., Yoshida, Y., Ito, D., Ohmae, S., You, D.-J., et al. (2012). Intestinal Epithelial Cell-Derived Semaphorin 7A Negatively Regulates Development of Colitis via α 1 Integrin. *J. Immunol.* *188*, 1108–1116.
- Kaoutari, A. El, Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., and Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 497–504.
- Kaser, A., and Blumberg, R.S. (2014). ATG16L1 Crohn's disease risk stresses the endoplasmic reticulum of Paneth cells. *Gut* *63*, 1038–1039.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.*
- Kashiwagi, I., Morita, R., Schichita, T., Komai, K., Saeki, K., and Matsumoto, M. (2015). Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- β Autoinduction in *Clostridium butyricum*-Activated Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- β Autoinduction in *Clostridium butyricum*-Activated Dendritic Cells. *Immunity* 1–15.
- Katsha, A., Soutto, M., Sehdev, V., Peng, D., Washington, M.K., Piazuelo, M.B., Tantawy, M.N., Manning, H.C., Lu, P., Shyr, Y., et al. (2013). Aurora kinase A promotes inflammation and tumorigenesis in

mice and human gastric neoplasia. *Gastroenterology* 145, 1312–1322.e8.

Kawai, T., Nishikomori, R., and Heike, T. (2012). Diagnosis and Treatment in Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. *Allergol. Int.* 61, 207–217.

Kawamoto, S., Maruya, M., Kato, L.M., Suda, W., Atarashi, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Qin, H., Honda, K., Okada, T., et al. (2014). Foxp3⁺ T Cells Regulate Immunoglobulin A Selection and Facilitate Diversification of Bacterial Species Responsible for Immune Homeostasis. *Immunity* 41, 152–165.

Keestra, A.M., and Bäumlner, A.J. (2014). Detection of enteric pathogens by the nodosome. *Trends Immunol.* 35, 123–130.

Keestra-Gounder, A.M., and Tsohis, R.M. (2017). NOD1 and NOD2: Beyond Peptidoglycan Sensing. *Trends Immunol.* 38, 758–767.

Keestra-Gounder, A.M., Byndloss, M.X., Seyffert, N., Young, B.M., Chávez-Arroyo, A., Tsai, A.Y., Cevallos, S.A., Winter, M.G., Pham, O.H., Tiffany, C.R., et al. (2016). NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature* 532, 394–397.

Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G.P., Pettersson, S., and Conway, S. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nat. Immunol.* 5, 104–112.

Khawar, M.B., Mukhtar, M., Abbasi, M.H., and Sheikh, N. (2017). IL-32 θ : A recently identified anti-inflammatory variant of IL-32 and its preventive role in various disorders and tumor suppressor activity. *Am. J. Transl. Res.* 9, 4726–4737.

Kieser, K.J., and Kagan, J.C. (2017). Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 376–390.

Kim, J.G., Lee, S.J., and Kagnoff, M.F. (2004). Nod1 Is an Essential Signal Transducer in Intestinal Epithelial Cells Infected with Bacteria That Avoid Recognition by Toll-Like Receptors Nod1 Is an Essential Signal Transducer in Intestinal Epithelial Cells Infected with Bacteria That Avoid Recognition. *Infect. Immun.* 72, 1487–1495.

Kim, M., Qie, Y., Park, J., and Kim, C.H. (2016). Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host Microbe* 20, 202–214.

Kim, M.L., Jeong, H.G., Kasper, C.A., and Arrieumerlou, C. (2010). IKK α contributes to canonical NF- κ B activation downstream of Nod1-mediated peptidoglycan recognition. *PLoS One* 5.

Kim, S.-J., Glick, A., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1989a). Characterization of the Promoter Region of the Human Transforming Growth Factor- β 1 Gene. *J.*

Biol. Chem. 264, 402–408.

Kim, S.J., Jeang, K.T., Glick, A.B., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1989b). Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *J Biol Chem* 264, 7041–7045.

Kirkland, D., Benson, A., Mirpuri, J., Pifer, R., Hou, B., Defranco, A.L., and Yarovinsky, F. (2012). B Cell-Intrinsic MyD88 Signaling Prevents the Lethal Dissemination of Commensal Bacteria during Colonic Damage. *Immunity* 36, 228–238.

Klein, J., Ju, W., Heyer, J., Wittek, B., Haneke, T., Knaus, P., Kucherlapati, R., Bottinger, E.P., Nitschke, L., and Kneitz, B. (2006). B Cell-Specific Deficiency for Smad2 In Vivo Leads to Defects in TGF- β -Directed IgA Switching and Changes in B Cell Fate. *J. Immunol.* 176, 2389–2396.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., and Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* 165, 1332–1345.

Konan, K. V., and Taylor, M.W. (1996). Importance of the Two Interferon-stimulated Response Element (ISRE) Sequences in the Regulation of the Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene. *J. Biol. Chem.* 271, 19140–19145.

Konstantinidis, K.T., Rosselló-Móra, R., and Amann, R. (2017). Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *ISME J.* 11, 2399–2406.

Kotlarz, D., Marquardt, B., Barøy, T., Lee, W.S., Konnikova, L., Hollizeck, S., Magg, T., Lehle, A.S., Walz, C., Borggraefe, I., et al. (2018). Human TGF- β 1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy. *Nat. Genet.* 50, 1–5.

Krug, S.M., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 166–176.

Krüger, I., Vollmer, M., Simmons, D., Elsässer, H.P., Philipsen, S., and Suske, G. (2007). Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: Impaired erythropoiesis and severe placental defects. *Dev. Dyn.* 236, 2235–2244.

Kruis, W., Frič, P., Pokrotnieks, J., Lukáš, M., Fixa, B., Kaščák, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., et al. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617–1623.

Kwong, K.Y.C., Literat, A., Zhu, N.L., Huang, H.H., Li, C., Jones, C.A., and Minoo, P. (2004). Expression of transforming growth factor beta (TGF- β 1) in human epithelial alveolar cells: A pro-inflammatory mediator independent pathway. *Life Sci.* 74, 2941–2957.

- Lagier, J.C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P.E., La Scola, B., and Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 237–264.
- Lagier, J.C., Khelaifia, S., Alou, M.T., Ndongo, S., Dione, N., Hugon, P., Caputo, A., Cadoret, F., Traore, S.I., Seck, E.H., et al. (2016). Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol* 1, 16203.
- Lagkouvardos, I., Overmann, J., and Clavel, T. (2017). Cultured microbes represent a substantial fraction of the human and mouse gut microbiota. *Gut Microbes* 976, 1–11.
- Lakhdari, O., Cultrone, A., Tap, J., Gloux, K., Bernard, F., Ehrlich, S.D., Lefèvre, F., Doré, J., and Blottière, H.M. (2010). Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF- κ B modulation in the human gut. *PLoS One* 5, 1–10.
- Lakhdari, O., Tap, J., Béguet-Crespel, F., Le Roux, K., De Wouters, T., Cultrone, A., Nepelska, M., Lefvre, F., Doré, J., and Blottière, H.M. (2011). Identification of NF- κ B modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria. *J. Biomed. Biotechnol.*
- Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nuñez, G., and Keshav, S. (2003). Crohn's disease and the NOD2 gene: A role for paneth cells. *Gastroenterology* 125, 47–57.
- Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M., Costa, G. Da, Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T.W., Natividad, J.M., et al. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.*
- Landström, M. (2010). The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 585–589.
- Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y.S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., Nielsen, J., Ley, R.E., and Bäckhed, F. (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, 1124–1131.
- Lathrop, S.K., Bloom, S.M., Rao, S.M., Nutsch, K., Chang-Lio, W., Santacruz, N., Peterson, D.A., and Stappenbeck, T.S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478, 250–254.
- Lawley, T.D., Bouley, D.M., Hoy, Y.E., Gerke, C., Relman, D.A., and Monack, D.M. (2008). Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infect. Immun.* 76, 403–416.
- Lawrence, T., Bebie, M., Liu, G.Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005). IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434, 1138–1143.
- Lech, M., Avila-Ferrufino, A., Skuginna, V., Susanti, H.E., and Anders, H.J. (2010). Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int. Immunol.* 22, 717–728.
- Lecona, E., Olmo, N., Turnay, J., Santiago-Gómez, A., López de Silanes, I., Gorospe, M., and Lizarbe, M.A. (2008). Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms. *Biochem. J.* 409, 311–320.
- Lécuyer, E., Rakotobe, S., Lengliné-Garnier, H., Lebreton, C., Picard, M., Juste, C., Fritzen, R., Eberl, G., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., et al. (2014). Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity* 40, 608–620.
- Lee, P., and Tan, K.S. (2014). *Fusobacterium nucleatum* activates the immune response through retinoic acid-inducible gene i. *J. Dent. Res.* 93, 162–168.
- Lee, Y.K., and Mazmanian, S.K. (2010). Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System? *Science* (80-.). 330, 1768–1773.
- Lee, H., Lee, Y., Kim, J., An, J., Lee, S., Kong, H., Song, Y., Lee, C.K., and Kim, K. (2018). Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice. *Gut Microbes* 976, 1–11.
- Lee, J., Mo, J.-H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.-T., Lee, H.-K., Shen, C., Cojocar, G., Shenouda, S., et al. (2006a). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1327–1336.
- Lee, K.Y., Ito, K., Hayashi, R., Jazrawi, E.P.I., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2006b). NF- κ B and Activator Protein 1 Response Elements and the Role of Histone Modifications in IL-1 β -Induced TGF- β 1 Gene Transcription. *J. Immunol.* 176, 603–615.
- Lee, S.M., Donaldson, G.P., Mikulski, Z., Boyajian, S., Ley, K., and Mazmanian, S.K. (2013). Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature* 501, 426–429.
- Lees, C.W., Barrett, J.C., Parkes, M., and Satsangi, J. (2011). New IBD genetics: Common pathways with other diseases. *Gut* 60, 1739–1753.
- Lei-Leston, A.C., Murphy, A.G., and Maloy, K.J.

- (2017). Epithelial Cell Inflammasomes in Intestinal Immunity and Inflammation. *Front. Immunol.* 8, 1–17.
- Lepage, P., Häslér, R., Spehlmann, M.E., Rehman, A., Zvirbliene, A., Begun, A., Ott, S., Kupcinkas, L., Doré, J., Raedler, A., et al. (2011). Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 141, 227–236.
- Levy, M., Thaïss, C.A., Zeevi, D., Dohnalová, L., Zilberman-Schapira, G., Mahdi, J.A., David, E., Savidor, A., Korem, T., Herzog, Y., et al. (2015). Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* 163, 1428–1443.
- Lewis, S.J., Heaton, K.W., Royal, B., Park, H., Cf, C. V, Lewis, S.J., and Heaton, K.W. (1997). Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut* 41, 245–251.
- Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11070–11075.
- Li, M.O., and Flavell, R.A. (2008). TGF- β : A Master of All T Cell Trades. *Cell* 134, 392–404.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J.R., Prifti, E., Nielsen, T., et al. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32, 834–841.
- Li, Q., Harden, J., and Anderson, C. (2016). Tolerogenic Phenotype of IFN- γ -Induced IDO+ Dendritic Cells Is Maintained via an Autocrine IDO–Kynurenine/AhR–IDO Loop. *J. Immunol.* 197, 962–970.
- Li, Z.W., Chu, W.M., Hu, Y.L., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). The IKK beta subunit of I kappa B kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappa B activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 189, 1839–1845.
- Liao, H.F., Lee, H.H., Chang, Y.S., Lin, C.Y.C.L., Liu, T.Y., Chen, Y.C., Yen, J.C., Lee, Y.T., Lin, C.Y.C.L., Wu, S.H., et al. (2016). Down-regulated and Commonly mutated ALPK1 in Lung and Colorectal Cancers. *Sci. Rep.* 6, 1–9.
- Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., and O’Neill, L.A.J. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 446–458.
- Lin, T.-Y., Wei, T.-Y.W., Li, S., Wang, S.-C., He, M., Martin, M., Zhang, J., Shentu, T.-P., Xiao, H., Kang, J., et al. (2016). TIFA as a crucial mediator for NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201618773.
- Lin, W., Tsai, W.L., Shao, R.X., Wu, G., Peng, L.F., Barlow, L.L., Chung, W.J., Zhang, L., Zhao, H., Jang, J.Y., et al. (2010). Hepatitis C Virus Regulates Transforming Growth Factor β 1 Production Through the Generation of Reactive Oxygen Species in a Nuclear Factor κ B-Dependent Manner. *Gastroenterology* 138, 2509–2518.
- Lippens, C., Duraes, F. V, Dubrot, J., Brighthouse, D., Lacroix, M., Irla, M., Aubry-Lachainaye, J.P., Reith, W., Mandl, J.N., and Hugues, S. (2016). IDO-orchestrated crosstalk between pDCs and Tregs inhibits autoimmunity. *J. Autoimmun.* 1–11.
- Litzenburger, U.M., Opitz, C. a, Sahn, F., Rauschenbach, K.J., Trump, S., Winter, M., Ott, M., Ochs, K., Lutz, C., Liu, X., et al. (2014). Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget* 5, 1038–1051.
- Liu, L., Li, L., Min, J., Wang, J., Wu, H., Zeng, Y., Chen, S., and Chu, Z. (2012). Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell. Immunol.* 277, 66–73.
- Loesche, W.J. (1969). Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* 18, 723–727.
- Louis, P., Duncan, S.H., Mccrae, S.I., Jackson, M.S., Flint, H.J., and Millar, J. (2004). Restricted Distribution of the Butyrate Kinase Pathway among Butyrate-Producing Bacteria from the Human Colon. *J. Bacteriol.* 186, 2099–2106.
- Louis, P., Hold, G.L., and Flint, H.J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Lu, P., Burger-Van Paassen, N., Van Der Sluis, M., Witte-Bouma, J., Kerckaert, J.P., Van Goudoever, J.B., Van Seuningen, I., and Renes, I.B. (2011). Colonic gene expression patterns of mucin muc2 knockout mice reveal various phases in colitis development. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2047–2057.
- Lu, Q., Yang, Y.-T., Chen, C.-S.C.-S.C., Davis, M., Byrd, J.C., Etherton, M.R., Umar, A., and Chen, C.-S.C.-S.C. (2003). Zn²⁺-Chelating Motif-Tethered Short-Chain Fatty Acids as a Novel Class of Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 47, 467–474.
- Lu, Y., Chen, J., Zheng, J., Hu, G., Wang, J., Huang, C., Lou, L., Wang, X., and Zeng, Y. (2016). Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas. *Sci. Rep.* 6, 26337.
- De Luca, A., Bozza, S., Zelante, T., Zagarella, S., D’Angelo, C., Perruccio, K., Vacca, C., Carvalho, A., Cunha, C., Aversa, F., et al. (2010). Non-hematopoietic cells contribute to protective tolerance to *Aspergillus fumigatus* via a TRIF pathway converging on IDO.

Cell. Mol. Immunol. 7, 459–470.

Maarifi, G., Maroui, M.A., Dutrieux, J., Dianoux, L., Nisole, S., and Chelbi-Alix, M.K. (2015). Small Ubiquitin-like Modifier Alters IFN Response. *J. Immunol.* 195, 2312–2324.

Macfarlane, S., and Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 67–72.

Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijis, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., et al. (2014). A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 1275–1283.

Macia, L., Tan, J., Vieira, A.T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., Ian McKenzie, C., Hijikata, A., Wong, C., et al. (2015). Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat. Commun.* 6, 6734.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 478–485.

Malvin, N.P., Seno, H., and Stappenbeck, T.S. (2012). Colonic epithelial response to injury requires Myd88 signaling in myeloid cells. *Mucosal Immunol.* 5, 194–206.

Manfredo Vieira, S., Hiltensperger, M., Kumar, V., Zegarra-Ruiz, D., Dehner, C., Khan, N., Costa, F.R.C., Tiniakou, E., Greiling, T., Ruff, W., et al. (2018). Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science* (80-). 359, 1156–1161.

Mangaonkar, A., Mondal, A.K., Fulzule, S., Pundkar, C., Park, E.J., Jillella, A., Kota, V., Xu, H., Savage, N.M., Shi, H., et al. (2017). A novel immunohistochemical score to predict early mortality in acute myeloid leukemia patients based on indoleamine 2,3 dioxygenase expression. *Sci. Rep.* 7, 12892.

Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., et al. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211.

Mao, X., Phanavanh, B., Hamdan, H., Moerman-Herzog, A.M., and Barger, S.W. (2016). NFκB-inducing kinase inhibits NFκB activity specifically in neurons of the CNS. *J. Neurochem.* 137, 154–163.

Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., Hall, N., Peters, W.H.M., Roelofs, R., Boleij, A., and Tjalsma, H. (2011). Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome. *PLoS One* 6, e20447.

Marcobal, A., Kashyap, P.C., Nelson, T.A.,

Aronov, P.A., Donia, M.S., Spormann, A., Fischbach, M.A., and Sonnenburg, J.L. (2013). A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. *ISME J.* 7, 1933–1943.

Mark Welch, J.L., Hasegawa, Y., McNulty, N.P., Gordon, J.I., and Borisy, G.G. (2017). Spatial organization of a model 15-member human gut microbiota established in gnotobiotic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201711596.

Marques, R., and Boneca, I.G. (2011). Expression and functional importance of innate immune receptors by intestinal epithelial cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3661–3673.

Marteau, P., Pochart, P., Doré, J., Bernalier, A., Corthier, G., and Dore, L. (2001). Comparative Study of Bacterial Groups within the Human Cecal and Fecal Microbiota Comparative Study of Bacterial Groups within the Human Cecal and Fecal Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4939–4942.

Martin, F.P.J., Dumas, M.E., Wang, Y., Legido-Quigley, C., Yap, I.K.S., Tang, H., Zirah, S., Murphy, G.M., Cloarec, O., Lindon, J.C., et al. (2007). A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 3.

Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadoux, J.J., Sokol, H., Verdu, E.F., Bercik, P., Bermúdez-Humarán, L.G., and Langella, P. (2014). The commensal bacterium *faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 417–430.

Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. *Mol. Cell* 10, 417–426.

Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., et al. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282–1286.

Matsen, F.A. (2015). Phylogenetics and the human microbiome. *Syst. Biol.* 64, e26–e41.

Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I.D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M., and Rescigno, M. (2010). Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 59, 595–604.

Mazmanian, S.K., Cui, H.L., Tzianabos, A.O., and Kasper, D.L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107–118.

- Mazmanian, S.K., Round, J.L., and Kasper, D.L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* *453*, 620–625.
- Mcarthur, F., Andersson, C.E., Loutet, S., Mowbray, S.L., and Valvano, M. a (2005). Functional Analysis of the glycerol-3-phosphate 6-Phosphate Kinase Domain from the Bifunctional HldE Protein , Which Is Involved in ADP-1- glycerol -d- manno Functional Analysis of the glycerol-3-phosphate 6-Phosphate Kinase Domain from the Bifunctional. *187*, 5292–5300.
- McGovern, D.P.B., Hysi, P., Ahmad, T., van Heel, D.A., Moffatt, M.F., Carey, A., Cookson, W.O.C., and Jewell, D.P. (2005). Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 1245–1250.
- Meijer, K., de Vos, P., and Priebe, M.G. (2010). Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *13*, 715–721.
- Messer, J.S., Liechty, E.R., Vogel, O.A., and Chang, E.B. (2017). Evolutionary and ecological forces that shape the bacterial communities of the human gut. *Mucosal Immunol.* 1–13.
- Metchnikoff, E. (1901). *Sur la Flore du Corps Humain*.
- Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., and Bradfield, C.A. (2010). An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *185*, 3190–3198.
- Milivojevic, M., Dangeard, A.S., Kasper, C.A., Tschon, T., Emmenlauer, M., Pique, C., Schnupf, P., Guignot, J., and Arrieumerlou, C. (2017). ALPK1 controls TIFA/TRAF6-dependent innate immunity against heptose-1,7-bisphosphate of gram-negative bacteria. *PLoS Pathog.* *13*, 1–28.
- Millard, C.J., Watson, P.J., Fairall, L., and Schwabe, J.W.R. (2017). Targeting Class I Histone Deacetylases in a “Complex” Environment. *Trends Pharmacol. Sci.* *38*, 363–377.
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 240–73, Table of Contents.
- Molgora, M., Supino, D., Mantovani, A., and Garlanda, C. (2018). Tuning inflammation and immunity by the negative regulators IL-1R2 and IL-1R8. *Immunol. Rev.* *281*, 233–247.
- Von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* *529*, 221–225.
- Mondanelli, G., Bianchi, R., Pallotta, M.T., Orabona, C., Albini, E., Iacono, A., Belladonna, M.L., Vacca, C., Fallarino, F., Macchiarulo, A., et al. (2017). A Relay Pathway between Arginine and Tryptophan Metabolism Confers Immunosuppressive Properties on Dendritic Cells. *Immunity* *46*, 233–244.
- Mondot, S., Kang, S., Furet, J.P., Aguirre de Carcer, D., McSweeney, C., Morrison, M., Marteau, P., Doré, J., and Leclerc, M. (2011). Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn’s disease microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 185–192.
- Mondot, S., de Wouters, T., Doré, J., and Lepage, P. (2013). The human gut microbiome and its dysfunctions. *Dig. Dis.* *31*, 278–285.
- Monteleone, G., Mann, J., Monteleone, I., Vavassori, P., Bremner, R., Fantini, M., Del Vecchio Blanco, G., Tersigni, R., Alessandrini, L., Mann, D., et al. (2004). A Failure of Transforming Growth Factor- β 1 Negative Regulation Maintains Sustained NF- κ B Activation in Gut Inflammation. *J. Biol. Chem.* *279*, 3925–3932.
- Monteleone, G., Boirivant, M., Pallone, F., and MacDonald, T.T. (2008). TGF- β 1 and smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol.* *1*, 50–53.
- Moore, W.E.C., and Moore, L.H. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 3202–3207.
- Motta, J.P., Bermúdez-Humarán, L.G., Deraison, C., Martin, L., Rolland, C., Rousset, P., Boue, J., Dietrich, G., Chapman, K., Kharrat, P., et al. (2012). Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci. Transl. Med.* *4*.
- Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* *14*, 667–685.
- Muller, A.J., DuHadaway, J.B., Donover, P.S., Sutanto-Ward, E., and Prendergast, G.C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat. Med.* *11*, 312–319.
- Munn, D.H. (1998). Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* (80-.). *281*, 1191–1193.
- Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* *34*, 137–143.
- Naqvi, K.F., Patin, D., Wheatley, M.S., Savka, M.A., Dobson, R.C.J., Gan, H.M., Barreteau, H., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., and Hudson, A.O. (2016). Identification and partial characterization of a novel UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase/UDP-N-acetylmuramate: L-alanine ligase fusion enzyme from *Verrucomicrobium spinosum*

DSM 4136T. *Front. Microbiol.* 7.

Nava, G.M., and Stappenbeck, T.S. (2011). Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut Microbes* 2, 99–104.

Naviglio, S., Arrigo, S., Martellosi, S., Villanacci, V., Tommasini, A., Loganes, C., Fabretto, A., Vignola, S., Lonardi, S., and Ventura, A. (2014). Severe inflammatory bowel disease associated with congenital alteration of transforming growth factor beta signaling. *J. Crohn's Colitis* 8, 770–774.

Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., Van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., et al. (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446, 557–561.

Nepelska, M., Cultrone, A., Béguet-Crespel, F., Le Roux, K., Doré, J., Arulampalam, V., Blottière, H.M., Béguet-Crespel, F., Le Roux, K., Doré, J., et al. (2012). Butyrate Produced by Commensal Bacteria Potentiates Phorbol Esters Induced AP-1 Response in Human Intestinal Epithelial Cells. *PLoS One* 7, 1–10.

Nepelska, M., De Wouters, T., Jacouton, E., Béguet-Crespel, F., Lapaque, N., Doré, J., Arulampalam, V., and Blottière, H.M. (2017). Commensal gut bacteria modulate phosphorylation-dependent PPAR γ transcriptional activity in human intestinal epithelial cells. *Sci. Rep.* 33.

Netea, M.G., Wijmenga, C., and O'Neill, L.A.J. (2012). Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 13, 535–542.

Nguyen, H.T.T., Dalmasso, G., Powell, K.R., Yan, Y., Bhatt, S., Kalman, D., Sitaraman, S. V., and Merlin, D. (2009). Pathogenic Bacteria Induce Colonic PepT1 Expression: An Implication in Host Defense Response. *Gastroenterology* 137, 1435–1447.e2.

Nguyen, N.T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., and Kishimoto, T. (2010). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19961–19966.

Nielsen, D.S., Krych, L., Buschard, K., Hansen, C.H.F., and Hansen, A.K. (2014). Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. *FEBS Lett.* 588, 4234–4243.

van Niftrik, L., and Devos, D.P. (2017). Editorial: Planctomycetes-verrucomicrobia-chlamydiae bacterial superphylum: New model organisms for evolutionary cell biology. *Front. Microbiol.* 8, 1–3.

Nishio, H., Kanno, S., Onoyama, S., Ikeda, K., Tanaka, T., Kusuhara, K., Fujimoto, Y., Fukase, K., Sueishi, K., and Hara, T. (2011). Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1093–1099.

Nishio, J., Baba, M., Atarashi, K., Tanoue, T., Negishi, H., Yanai, H., Habu, S., Hori, S., Honda, K., and Taniguchi, T. (2015). Requirement of full TCR repertoire for regulatory T cells to maintain intestinal homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201516617.

O'Keefe, S.J.D. (2016). Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 691–706.

O'Neill, L.A.J., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 353–364.

O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460.

Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J.H., Hart, J., et al. (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: A possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52, 1591–1597.

Ohkusa, T., Sato, N., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M., and Okayasu, I. (2002). *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 849–853.

Ohkusa, T., Yoshida, T., Sato, N., Watanabe, S., Tajiri, H., and Okayasu, I. (2009). Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: A possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J. Med. Microbiol.* 58, 535–545.

Ohnmacht, C., Park, J.-H., Cording, S., Wing, J.B., Atarashi, K., Obata, Y., Gaboriau-Routhiau, V., Marques, R., Dulauroy, S., Fedoseeva, M., et al. (2015). The microbiota regulates type 2 immunity through ROR t+ T cells. *Science* (80-.). 349, 989–993.

Okumura, R., and Takeda, K. (2017). Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 49, e338.

Olson, D.E., Sleiman, S.F., Bourassa, M.W., Wagner, F.F., Gale, J.P., Zhang, Y.L., Ratan, R.R., and Holson, E.B. (2015). Hydroxamate-based histone deacetylase inhibitors can protect neurons from oxidative stress via a histone deacetylase-independent catalase-like mechanism. *Chem. Biol.* 22, 439–445.

Omenetti, S., and Pizarro, T.T. (2015). The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front. Immunol.* 6, 639.

Orabona, C., Pallotta, M.T., Volpi, C., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2008). SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105,

20828–20833.

Otte, J.M., Cario, E., and Podolsky, D.K. (2004). Mechanisms of Cross Hyporesponsiveness to Toll-Like Receptor Bacterial Ligands in Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* *126*, 1054–1070.

Ottman, N., Huuskonen, L., Reunanen, J., Boeren, S., Klievink, J., Smidt, H., Belzer, C., and De Vos, W.M. (2016). Characterization of outer membrane proteome of *Akkermansia muciniphila* reveals sets of novel proteins exposed to the human intestine. *Front. Microbiol.* *7*, 1–13.

Ottman, N., Reunanen, J., Meijerink, M., Pietila, T.E., Kainulainen, V., Klievink, J., Huuskonen, L., Aalvink, S., Skurnik, M., Boeren, S., et al. (2017). Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. *PLoS One* *12*, 1–18.

Paciolla, M., Pescatore, A., Conte, M.I., Esposito, E., Incoronato, M., Lioi, M.B., Fusco, F., and Ursini, M. V. (2015). Rare mendelian primary immunodeficiency diseases associated with impaired NF- κ B signaling. *Genes Immun.* *16*, 239–246.

Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.* *12*, 870–878.

Pantouris, G., Serys, M., Yuasa, H.J., Ball, H.J., and Mowat, C.G. (2014). Human indoleamine 2,3-dioxygenase-2 has substrate specificity and inhibition characteristics distinct from those of indoleamine 2,3-dioxygenase-1. *Amino Acids* *46*, 2155–2163.

Pascual, G., and Glass, C.K. (2006). Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol. Metab.* *17*, 321–327.

Pasparakis, M. (2012). Role of NF-kappa B in epithelial biology. *Immunol. Rev.* *246*, 346–358.

van Passel, M.W.J., Kant, R., Zoetendal, E.G., Plugge, C.M., Derrien, M., Malfatti, S.A., Chain, P.S.G., Woyke, T., Palva, A., de Vos, W.M., et al. (2011). The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PLoS One* *6*.

Patnala, R., Arumugam, T. V., Gupta, N., and Dheen, S.T. (2017). HDAC Inhibitor Sodium Butyrate-Mediated Epigenetic Regulation Enhances Neuroprotective Function of Microglia During Ischemic Stroke. *Mol. Neurobiol.* *54*, 6391–6411.

Patrascu, O., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Le Chatelier, E., Abraham, A.L., Leclerc, M., Klopp, C., Terrapon, N., Henrissat, B., Blottière, H.M., et al. (2017). A fibrolytic potential in the human ileum

mucosal microbiota revealed by functional metagenomic. *Sci. Rep.* *7*, 40248.

Peart, M.J., Smyth, G.K., van Laar, R.K., Bowtell, D.D., Richon, V.M., Marks, P. a, Holloway, A.J., and Johnstone, R.W. (2005). Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3697–3702.

Pédron, T., Mulet, C., Dauga, C., Frangeul, L., Chervaux, C., and Grompone, G. (2012). A Crypt-Specific Core Microbiota Resides in the Mouse Colon. *MBio* *3*, 1–7.

Perez-Muñoz, M.E., Arrieta, M.C., Ramer-Tait, A.E., and Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* *5*, 1–19.

Perkins, N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 49–62.

Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 141–153.

Pezzini, A., Del Zotto, E., Giossi, A., Volonghi, I., Costa, P., and Padovani, A. (2012). Transforming growth factor β signaling perturbation in the Loeys-Dietz syndrome. *Curr. Med. Chem.* *19*, 454–460.

Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 908–912.

Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K., and Girardin, S.E. (2014). NOD proteins: Regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 9–23.

Pitt, J.M., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Kroemer, G., Chamainard, M., Boneca, I.G., and Zitvogel, L. (2016). Fine-tuning cancer immunotherapy: Optimizing the gut microbiome. *Cancer Res.* *76*, 4602–4607.

Plovier, H., Everard, A., Druart, C., Depommier, C., Van Hul, M., Geurts, L., Chilloux, J., Ottman, N., Duparc, T., Lichtenstein, L., et al. (2017). A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat. Med.* *23*, 107–113.

Png, C.W., Lindén, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., McGuckin, M.A., and Florin, T.H.J. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* *105*, 2420–2428.

Popoff, M.R. (2014). Clostridial pore-forming

- toxins: Powerful virulence factors. *Anaerobe* 30, 220–238.
- Popoff, M.R., and Geny, B. (2011). Rho/Ras-GTPase-dependent and -independent activity of clostridial glucosylating toxins. *J. Med. Microbiol.* 60, 1057–1069.
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.-Y., Lannoy, V., Decobecq, M.-E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., et al. (2003). Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. *J. Biol. Chem.* 278, 25481–25489.
- Pradipta, A.R., Fujimoto, Y., Hasegawa, M., Inohara, N., and Fukase, K. (2010). Characterization of natural human nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (Nod1) ligands from bacterial culture supernatant for elucidation of immune modulators in the environment. *J. Biol. Chem.* 285, 23607–23613.
- Prendergast, G.C., Metz, R., Muller, A.J., Merlo, L.M.F., and Mandik-Nayak, L. (2014). IDO2 in immunomodulation and autoimmune disease. *Front. Immunol.* 5, 1–6.
- Prendergast, G.C., Malachowski, W.P., DuHadaway, J.B., and Muller, A.J. (2017). Discovery of IDO1 Inhibitors: From bench to bedside. *Cancer Res.* 77, 6795–6811.
- Presser, L.D., McRae, S., and Waris, G. (2013). Activation of TGF- β 1 Promoter by Hepatitis C Virus-Induced AP-1 and Sp1: Role of TGF- β 1 in Hepatic Stellate Cell Activation and Invasion. *PLoS One* 8.
- De Preter, V., Machiels, K., Joossens, M., Arijis, I., Matthys, C., Vermeire, S., Rutgeerts, P., and Verbeke, K. (2015). Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. *Gut* 64, 447–458.
- Pryde, S.E., Duncan, S.H., Hold, G.L., Stewart, C.S., and Flint, H.J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 133–139.
- Puccetti, P., and Grohmann, U. (2007). IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF- κ B activation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 817–823.
- Puccetti, P., Fallarino, F., Italiano, A., Soubeyran, I., MacGrogan, G., Debled, M., Velasco, V., Bodet, D., Eimer, S., Veldhoen, M., et al. (2015). Accumulation of an Endogenous Tryptophan-Derived Metabolite in Colorectal and Breast Cancers. *PLoS One* 10, e0122046.
- Put, K., Brisse, E., Avau, A., Imbrechts, M., Mitera, T., Janssens, R., Proost, P., Fallarino, F., Wouters, C.H., and Matthys, P. (2016). IDO1 Deficiency Does Not Affect Disease in Mouse Models of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis and Secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *PLoS One* 11, e0150075.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary. *Nature* 464, 59–65.
- Qin, N., Yang, F., Li, A., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., Guo, J., Le Chatelier, E., Yao, J., Wu, L., et al. (2014). Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 513, 59–64.
- Qiu, J., Heller, J.J., Guo, X., Chen, Z.M.E., Fish, K., Fu, Y.X., and Zhou, L. (2012). The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 36, 92–104.
- Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermúdez-Humarán, L.G., Pigneur, B., et al. (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65, 415–425.
- Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71.
- Rada-iglesias, A., Enroth, S., Ameer, A., Koch, C.M., Clelland, G.K., Respuela-alonso, P., Wilcox, S., Dovey, O.M., Ellis, P.D., Langford, C.F., et al. (2007). Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome ...* 708–719.
- Rahman, M.M., and McFadden, G. (2011). Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 291–306.
- Raisch, J., Dalmasso, G., Bonnet, R., Barnich, N., Bonnet, M., and Bringer, M. (2016). Certaines bactéries de la flore commensale exacerberaient-elles la carcinogenèse colorectale? *Médecine/Sciences* 32, 175–182.
- Rajilić-Stojanović, M., and de Vos, W.M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 996–1047.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241.
- Rakoff-Nahoum, S., Foster, K.R., and Comstock, L.E. (2016). The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature* 533, 255–259.
- Rambeau, J.L., Kripke, S.A., and Settle, R.G. (1987). Short-Chain Fatty Acids Production ,

Absorption, Metabolism, and Intestinal Effects.

Raqib, R., Sarker, P., Bergman, P., Ara, G., Lindh, M., Sack, D.A., Nasirul Islam, K.M., Gudmundsson, G.H., Andersson, J., and Agerberth, B. (2006). Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 9178–9183.

Ravishankar, B., Liu, H., Shinde, R., Chandler, P., Baban, B., Tanaka, M., Munn, D.H., Mellor, A.L., Karlsson, M.C.I., and McGaha, T.L. (2012). Tolerance to apoptotic cells is regulated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 3909–3914.

Reunanen, J., Kainulainen, V., Huuskonen, L., Ottman, N., Belzer, C., Huhtinen, H., de Vos, W.M., and Satokaria, R. (2015). Akkermansia muciniphila adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 3655–3662.

Reyniers, J.A., Gledhill, A.W., and Reyniers, J.A. (1959). Germ-free vertebrates: Present status. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *184*, 1–400.

Rhee, S.H., Im, E., Riegler, M., Kokkotou, E., O'Brien, M., and Pothoulakis, C. (2005a). Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13610–13615.

Rhee, S.J., Walker, W.A., and Cherayil, B.J. (2005b). Developmentally Regulated Intestinal Expression of IFN- and Its Target Genes and the Age-Specific Response to Enteric Salmonella Infection. *J. Immunol.* *175*, 1127–1136.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* *6*, 507–514.

Ritzhaupt, A., Ellis, A., Hosie, K.B., and Shirazi-Beechey, S.P. (1998a). The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. *J. Physiol.* *507*, 819–830.

Ritzhaupt, a, Wood, I.S., Ellis, a, Hosie, K.B., and Shirazi-Beechey, S.P. (1998b). Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J. Physiol.* *513* (Pt 3, 719–732.

Riva, A.A., Borgo, F., Lassandro, C., Verduci, E., Morace, G., Borghi, E., and Berry, D. (2016). Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ. Microbiol.* *19*, 95–105.

Rivera-Chávez, F., Zhang, L.F., Faber, F., Lopez,

C.A., Byndloss, M.X., Olsan, E.E., Xu, G., Velazquez, E.M., Lebrilla, C.B., Winter, S.E., et al. (2016). Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host Microbe* *19*, 443–454.

Robertson, S.J., Zhou, J.Y., Geddes, K., Rubino, S.J., Cho, J.H., Girardin, S.E., and Philpott, D.J. (2013). Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut Microbes* *4*, 222–231.

Robinson, C.M., Shirey, K.A.N.N., and Carlin, J.M. (2003). Synergistic Transcriptional Activation of Indoleamine Dioxygenase by IFN- γ and Tumor Necrosis Factor- α . *J. Interf. Cytokine Res* *23*, 413–421.

Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P.I., Godneva, A., Kalka, I.N., Bar, N., Zmora, N., et al. (2017). Environmental factors dominate over host genetics in shaping human gut microbiota composition. *bioRxiv* *555*, 150540.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 313–323.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2010). Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 12204–12209.

Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., and Mazmanian, S.K. (2011a). The Toll-like receptor pathway establishes commensal gut colonization. *Science* (80-.). *332*, 974–977.

Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. a, and Mazmanian, S.K. (2011b). The Toll-Like Receptor 2 Pathway Commensal of the Human Microbiota. *Science* (80-.). *1007172*, 974–977.

Rousseau, C., Levenez, F., Fouqueray, C., Doré, J., Collignon, A., and Lepage, P. (2011). Clostridium difficile colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 858–865.

Routy, B., and Kroemer, G. (2017). Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (80-.). *3706*, 1–13.

Rubinstein, M.R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., and Han, Y.W. (2013). Fusobacterium nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host Microbe* *14*, 195–206.

Ruijter, A.J.M. De, Meinsma, R.J., Bosma, P., Kemp, S., Caron, H.N., Kuilenburg, B.P. Van, De Ruijter, A.J.M., Meinsma, R.J., Bosma, P., Kemp, S., et al. (2005). Gene expression profiling in response to the histone deacetylase inhibitor BL1521 in neuroblastoma. *Exp. Cell Res.* *309*, 451–467.

- Sadabad, M.S., Von Martels, J.Z.H., Khan, M.T., Blokzijl, T., Paglia, G., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., and Faber, K.N. (2015). A simple coculture system shows mutualism between anaerobic faecalibacteria and epithelial Caco-2 cells. *Sci. Rep.* *5*, 2–4.
- Saenz, S.A., Taylor, B.C., and Artis, D. (2008). Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev.* *31*, 62.
- Saha, S., Shalova, I.N., and Biswas, S.K. (2017). Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. *Immunol. Rev.* *280*, 102–111.
- Sánchez-Muñoz, F., Fonseca-Camarillo, G., Villeda-Ramírez, M.A., Miranda-Pérez, E., Mendivil, E.J., Barreto-Zúñiga, R., Uribe, M., Bojalil, R., Domínguez-López, A., and Yamamoto-Furusho, J.K. (2011). Transcript levels of Toll-Like receptors 5, 8 and 9 correlate with inflammatory activity in Ulcerative Colitis. *BMC Gastroenterol.* *11*, 138.
- Saraiva, M., and O’Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 170–181.
- Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Fröhlich, A., Adelman, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., et al. (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* *513*, 564–568.
- Schilderink, R., Verseijden, C., Seppen, J., Muncan, V., Van Den Brink, G.R., Lambers, T.T., van Tol, E.A., and de Jonge, W.J. (2016). The SCFA butyrate stimulates the epithelial production of retinoic acid via inhibition of epithelial HDAC. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *1*, ajpgi.00411.2015.
- Schluter, J., and Foster, K.R. (2012). The Evolution of Mutualism in Gut Microbiota Via Host Epithelial Selection. *PLoS Biol.* *10*.
- Schneeberger, M., Everard, A., Gómez-valadés, A.G., Claret, M., and Cani, P.D. (2015). Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Nat. Publ. Gr.* 1–14.
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Gros, M., Friedman, R., Moya-Nilges, M., Nigro, G., Cerf-Bensussan, N., and Sansonetti, P.J. (2015). Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro. *Nature* *520*, 99–103.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., and Hampe, J. (1998). Activation of nuclear factor kappaB in inflammatory bowel disease. *Gut* *42*, 477–484.
- Schroeder, B.O., and Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* *22*, 1079–1089.
- Sealy, L., and Chalkley, R. (1978). The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* *14*, 115–121.
- Sears, C.L., and Garrett, W.S. (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe* *15*, 317–328.
- Seedorf, H., Griffin, N.W., Ridaura, V.K., Reyes, A., Cheng, J., Rey, F.E., Smith, M.I., Simon, G.M., Scheffrahn, R.H., Woebken, D., et al. (2014). Bacteria from diverse habitats colonize and compete in the mouse gut. *Cell* *159*, 253–266.
- Sefik, E., Geva-Zatorsky, N., Oh, S., Konnikova, L., Zemmour, D., McGuire, A.M., Burzyn, D., Ortiz-Lopez, A., Lobera, M., Yang, J., et al. (2015). Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ ⁺ regulatory T cells. *Science* (80-). *349*, 993–997.
- Sellers, R.S., Morton, D., Sluis, V. Der, and Microbiome, T. (2014). The colon: From banal to brilliant. *Toxicol. Pathol.* *42*, 67–81.
- Seregin, S.S., Golovchenko, N., Schaf, B., Chen, J., Pudlo, N.A., Mitchell, J., Baxter, N.T., Zhao, L., Schloss, P.D., Martens, E.C., et al. (2017). NLRP6 Protects Il10^{-/-} Mice from Colitis by Limiting Colonization of Akkermansia muciniphila. *Cell Rep.* *19*, 733–745.
- Sharma, D., Malik, A., Guy, C.S., Karki, R., Vogel, P., and Kanneganti, T.D. (2018). Pyrin Inflammasome Regulates Tight Junction Integrity to Restrict Colitis and Tumorigenesis. *Gastroenterology* *154*, 948–964.e8.
- Sharon, G., Garg, N., Debelius, J., Knight, R., Dorrestein, P.C., and Mazmanian, S.K. (2014). Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab.* *20*, 719–730.
- Shaw, P.J., Barr, M.J., Lukens, J.R., McGargill, M.A., Chi, H., Mak, T.W., and Kanneganti, T.D. (2011). Signaling via the RIP2 Adaptor Protein in Central Nervous System-Infiltrating Dendritic Cells Promotes Inflammation and Autoimmunity. *Immunity* *34*, 75–84.
- Shen, Y., Torchia, M.L.G., Lawson, G.W., Karp, C.L., Ashwell, J.D., Mazmanian, S.K., Letizia, M., Torchia, G., Lawson, G.W., Karp, C.L., et al. (2012). Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe* *12*, 509–520.
- Shibolet, O., and Podolsky, D.K. (2007). TLRs in the Gut.IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *292*, G1469–G1473.
- Shioya, M., Nishida, A., Yagi, Y., Ogawa, A., Tsujikawa, T., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., Shimizu, N., Fujiyama, Y., and Andoh, A. (2007). Epithelial overexpression of interleukin-32 α in

- inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* *149*, 480–486.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* *122*, 787–795.
- Silva, V.L., Diniz, C.G., Cara, D.C., Santos, S.G., Nicoli, J.R., Carvalho, M.A.R., and Farias, L.M. (2005). Enhanced pathogenicity of *Fusobacterium nucleatum* adapted to oxidative stress. *Microb. Pathog.* *39*, 131–138.
- Simms, L.A., Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E. V., and Radford-Smith, G.L. (2008). Reduced α -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* *57*, 903–910.
- Sloutskin, A., Danino, Y.M., Orenstein, Y., Zehavi, Y., Doniger, T., Shamir, R., and Juven-Gershon, T. (2015). ElementNT: a computational tool for detecting core promoter elements. *Transcription* *6*, 41–50.
- Smith, A.J., Toledo, C.M., Wietgreffe, S.W., Duan, L., Schacker, T.W., Reilly, C.S., and Haase, A.T. (2011a). The Immunosuppressive Role of IL-32 in Lymphatic Tissue during HIV-1 Infection. *J. Immunol.* *186*, 6576–6584.
- Smith, K., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* *19*, 59–69.
- Smith, N.J., Ward, R.J., Stoddart, L. a, Hudson, B.D., Kostenis, E., Ulven, T., Morris, J.C., Tränkle, C., Tikhonova, I.G., Adams, D.R., et al. (2011b). Extracellular loop 2 of the free fatty acid receptor 2 mediates allosterism of a phenylacetamide ago-allosteric modulator. *Mol. Pharmacol.* *80*, 163–173.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* (80-). *341*, 569–573.
- Sokol, H. (2008). Supporting Information. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1–5.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Doré, J. (2009). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 1183–1189.
- Spanogiannopoulos, P., Bess, E.N., Carmody, R.N., and Turnbaugh, P.J. (2016). The microbial pharmacists within us: A metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* *14*, 273–287.
- Spits, H., and Mjösberg, J. (2012). The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Sentinel Safeguarding the Survival of Immune Cells in the Gut. *Immunity* *36*, 5–7.
- Stephen, A.M., Wiggins, H.S., and Cummings, J.H. (1987). Effect of changing transit time on colonic microbial metabolism in man. *Gut* *28*, 601–609.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 9–20.
- Sun, C.-M., Hall, J. a, Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* *204*, 1775–1785.
- Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* *238*, 291–300.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-baucke, V., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005). Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease.
- Swidsinski, A., Dörffel, Y., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Rückert, J.C., Ismail, M., Rau, W.A., Gaschler, D., Weizenegger, M., Kühn, S., et al. (2011). Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut* *60*, 34–40.
- Syed, V. (2016). TGF- β Signaling in Cancer. *J. Cell. Biochem.* *117*, 1279–1287.
- Taggart, A.K.P.P., Kero, J., Gan, X., Cai, T.-Q.Q., Cheng, K., Ippolito, M., Ren, N., Kaplan, R., Wu, K., Wu, T.-J.J., et al. (2005). (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J. Biol. Chem.* *280*, 26649–26652.
- Tahara, T., Yamamoto, E., Suzuki, H., Maruyama, R., Chung, W., Garriga, J., Jelinek, J., Yamano, H.O., Sugai, T., An, B., et al. (2014). *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res.* *74*, 1311–1318.
- Tailford, L.E., Crost, E.H., Kavanaugh, D., and Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* *5*.
- Takahashi, N., Vereecke, L., Bertrand, M.J.M., Duprez, L., Berger, S.B., Divert, T., Gonçalves, A., Sze, M., Gilbert, B., Kourula, S., et al. (2014). RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature* *513*, 95–99.
- Takamatsu, M., Hirata, A., Ohtaki, H., Hoshi, M., Hatano, Y., Tomita, H., Kuno, T., Saito, K., and Hara, A. (2013). IDO1 Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice. *J. Immunol.* *191*, 3057–3064.
- Takikawa, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yoshida, R., and Truscott, R.J. (1999). Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-

dioxygenase. Studies with interferon-gamma-knockout mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* *467*, 553–557.

Tan, J., McKenzie, C., Vuillermin, P.J., Goverse, G., Vinuesa, C.G., Mebius, R.E., Macia, L., and Mackay, C.R. (2016a). Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell Rep.* *15*, 2809–2824.

Tan, T.G., Sefik, E., Geva-Zatorsky, N., Kua, L., Naskar, D., Teng, F., Pasman, L., Ortiz-Lopez, A., Jupp, R., Wu, H.-J.J., et al. (2016b). Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E8141–E8150.

Tanoue, T., Atarashi, K., and Honda, K. (2016). Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 295–309.

Tas, S.W., Tas, S.W., May, M.J., May, M.J., Ghosh, S., Ghosh, S., Kapsenberg, M.L., Kapsenberg, M.L., Tak, P.P., Tak, P.P., et al. (2007). Noncanonical NF- κ B signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood* *110*, 1540–1549.

Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., and Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* *206*, 655–667.

Tazoe, H., Otomo, Y., Karaki, S.-I., Kato, I., Fukami, Y., Terasaki, M., and Kuwahara, A. (2009). Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed. Res.* *30*, 149–156.

Terness, P., Kallikourdis, M., Betz, A.G., Rabinovich, G.A., Saito, S., and Clark, D.A. (2007). Tolerance signaling molecules and pregnancy: IDO, galectins, and the renaissance of regulatory T cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* *58*, 238–254.

Thakur, B.K., Dasgupta, N., Ta, A., and Das, S. (2016). Physiological TLR5 expression in the intestine is regulated by differential DNA binding of Sp1/Sp3 through simultaneous Sp1 dephosphorylation and Sp3 phosphorylation by two different PKC isoforms. *Nucleic Acids Res.* *44*, 5658–5672.

Thangaraju, M., Cresci, G. a., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J.P., Browning, D.D., Mellinger, J.D., Smith, S.B., Digby, G.J., Lambert, N. a., et al. (2009). GPR109A Is a G-protein-Coupled Receptor for the Bacterial Fermentation Product Butyrate and Functions as a Tumor Suppressor in Colon. *Cancer Res.* *69*, 2826–2832.

Thorburn, A.N., Macia, L., and Mackay, C.R. (2014). Diet, Metabolites, and “Western-Lifestyle” Inflammatory Diseases. *Immunity* *40*, 833–842.

Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh,

B.E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 575–582.

Toossi, Z., Young, T.G., Averill, L.E., Hamilton, B.D., Shiratsuchi, H., and Ellner, J.J. (1995). Induction of transforming growth factor 1 by purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* *63*, 224.

Toussi, D.N., Liu, X., and Massari, P. (2012). The FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* is a toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity. *Clin. Vaccine Immunol.* *19*, 1093–1101.

Treem, W.R., Ahsan, N., Shoup, M., and Hyams, J.S. (1994). Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *18*, 159–164.

Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 179–190.

Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Yadava, K., Sichelstiel, A.K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L.P., Harris, N.L., et al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* *20*, 159–166.

Turer, E.E., Tavares, R.M., Mortier, E., Hitotsumatsu, O., Advincula, R., Lee, B., Shifrin, N., Malynn, B.A., and Ma, A. (2008). Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J. Exp. Med.* *205*, 451–464.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M. a, Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* *444*, 1027–1031.

Tytgat, K.M. a J., Van Der Wal, J.G., Einerhand, A.W.C., Dekker, J., and Buller, H.A. (1996). Quantitative Analysis of MUC2 Synthesis in Ulcerative Colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *405*, 397–405.

Valladares, R., Bojilova, L., Potts, A.H., Cameron, E., Gardner, C., Lorca, G., and Gonzalez, C.F. (2013). *Lactobacillus johnsonii* inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase and alters tryptophan metabolite levels in BioBreeding rats. *FASEB J.* *27*, 1711–1720.

Valvano, M.A., Messner, P., and Kosma, P. (2002). Novel pathways for biosynthesis of nucleotide-activated glycerol-manno-heptose precursors of bacterial glycoproteins and cell surface polysaccharides. *Microbiology* *148*, 1979–1989.

Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., and Toldi, J. (2013). Kynurenes in the CNS: Recent advances and new questions. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 64–82.

Veldhoen, M., and Ferreira, C. (2015). Influence of nutrient-derived metabolites on lymphocyte immunity.

Nat. Med. 21, 709–718.

Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106–109.

Venkatraman, A., Ramakrishna, B.S., Shaji, R. V., Kumar, N.S.N., Pulimood, A., and Patra, S. (2003). Amelioration of dextran sulfate colitis by butyrate: role of heat shock protein 70 and NF- κ B. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G177–G184.

Vereecke, L., Vieira-Silva, S., Billiet, T., Van Es, J.H., Mc Guire, C., Slowicka, K., Sze, M., Van Den Born, M., De Hertogh, G., Clevers, H., et al. (2014). A20 controls intestinal homeostasis through cell-specific activities. *Nat. Commun.* 5, 1–12.

Vermaa, R., Vermaa, N., and Paul, J. (2013). Expression of inflammatory genes in the colon of ulcerative colitis patients varies with activity both at the mRNA and protein level. *Eur. Cytokine Netw.* 24, 130–138.

Vetizou, M., Pitt, J.M., Daillere, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., et al. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* (80-.). 350, 1079–1084.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Mémet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J., et al. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* 5, 1166–1174.

Vigsnaes, L.K., van den Abbeele, P., Sulek, K., Frandsen, H.L., Steenholdt, C., Brynskov, J., Vermeiren, J., van de Wiele, T., and Licht, T.R. (2013). Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of LAB to colonize mucus. *Sci. Rep.* 3, 1–10.

Vijay-kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S. V, Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R., et al. (2007). Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *Matam. J. Clin. Invest.* 117, 3909–3921.

Vlantis, K., Polykratis, A., Welz, P.S.P.-S., Van Loo, G., Pasparakis, M., Wullaert, A., Loo, G. Van, Pasparakis, M., Wullaert, A., Van Loo, G., et al. (2015). TLR-independent anti-inflammatory function of intestinal epithelial TRAF6 signalling prevents DSS-induced colitis in mice. *Gut* 65, 935–943.

Vlantis, K., Wullaert, A., Polykratis, A., Kondylis, V., Dannappel, M., Schwarzer, R., Welz, P., Corona, T., Walczak, H., Weih, F., et al. (2016). NEMO Prevents RIP Kinase 1-Mediated Epithelial Cell Death and Chronic Intestinal Inflammation by NF- κ B-Dependent and -Independent Functions. *Immunity* 44,

553–567.

Wahlström, A., Sayin, S.I., Marschall, H.U., and Bäckhed, F. (2016). Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab.* 24, 41–50.

Walker, G.E., Wilson, E.M., Powell, D., Health, O., Oh, Y., and Health, O. (2001). Butyrate , a Histone Deacetylase Inhibitor , Activates the Human IGF Binding Protein-3 Promoter in Breast Cancer Cells : Molecular Mechanism Involves an Sp1 / Sp3 Multiprotein Complex. *Endocrinology* 142, 3817–3827.

Walsh, M.C., Lee, J., and Choi, Y. (2015). Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol. Rev.* 266, 72–92.

Walters, W.A., Xu, Z., and Knight, R. (2014). Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett.* 588, 4223–4233.

Wanaga, T.I., Akebe, K.T., Ato, I.K., Araki, S.K., Uwahara, A.K., Iwanaga, T., Takebe, K., Kato, I., Karaki, S.-I., and Kuwahara, A. (2006). Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8. *Biomed. Res.* 27, 243–254.

Wang, S.J., Tu, H.P., Ko, A.M.S., Chiang, S.L., Chiou, S.J., Lee, S.S., Tsai, Y.S., Lee, C.P., and Ko, Y.C. (2011). Lymphocyte α -kinase is a gout-susceptible gene involved in monosodium urate monohydrate-induced inflammatory responses. *J. Mol. Med.* 89, 1241–1251.

Wang, W., Qiao, Y., and Li, Z. (2018). New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 1–20.

Watson, P.J., Millard, C.J., Riley, A.M., Robertson, N.S., Wright, L.C., Godage, H.Y., Cowley, S.M., Jamieson, A.G., Potter, B.V.L., Schwabe, J.W.R.R., et al. (2016). Insights into the activation mechanism of class I HDAC complexes by inositol phosphates. *Nat. Commun.* 7, 1–7.

Wei, T.W., Wu, P., Wu, T., Hou, H., Chou, W., Teng, C.J., Lin, C., Chen, J.M., Lin, T., Su, H., et al. (2017). Aurora A and NF- κ B Survival Pathway Drive Chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia via the TRAF-Interacting Protein TIFA. *Cancer Res.* 77, 494–508.

Weigert, C., Sauer, U., Brodbeck, K., Pfeiffer, a, Häring, H.U., and Schleicher, E.D. (2000). AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF-beta1 promoter in mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2007–2016.

Wells, J.M., Brummer, R.J., Derrien, M., MacDonald, T.T., Troost, F., Cani, P.D., Theodorou, V., Dekker, J., Méheust, A., de Vos, W.M., et al.

- (2017). Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *312*, G171–G193.
- Werren, J.H., Richards, S., Desjardins, C.A., Niehuis, O., Gadau, J., Colbourne, J.K., Nasonia Genome Working Group, J.H., Werren, J.H., Richards, S., Desjardins, C.A., et al. (2010). Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science* *327*, 343–348.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 6578–6583.
- Wikoff, W.R., Anfora, A.T., Liu, J., Schultz, P.G., Lesley, S. a, Peters, E.C., and Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3698–3703.
- Winter, S.E., Thiennimitr, P., Winter, M.G., Butler, B.P., Huseby, D.L., Crawford, R.W., Russell, J.M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tsolis, R.M., et al. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* *467*, 426–429.
- Wolf, A.M., Wolf, D., Rumpold, H., Moschen, A.R., Kaser, A., Obrist, P., Fuchs, D., Brandacher, G., Winkler, C., Geboes, K., et al. (2004). Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin. Immunol.* *113*, 47–55.
- Wu, W., Sun, M., Chen, F., Cao, A.T., Liu, H., Zhao, Y., Huang, X., Xiao, Y., Yao, S., Zhao, Q., et al. (2017a). Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunol.* *10*, 946–956.
- Wu, W., Lv, L., Shi, D., Ye, J., Fang, D., Guo, F., Li, Y., He, X., and Li, L. (2017b). Protective effect of *Akkermansia muciniphila* against immune-mediated liver injury in a mouse model. *Front. Microbiol.* *8*, 1–13.
- Xiao, Y.Q., Freire-de-Lima, C.G., Schiemann, W.P., Bratton, D.L., Vandivier, R.W., and Henson, P.M. (2008). Transcriptional and translational regulation of TGF-beta production in response to apoptotic cells. *J. Immunol.* *181*, 3575–3585.
- Yang, Q., Wei, J., Zhong, L., Shi, M., Zhou, P., Zuo, S., Wu, K., Zhu, M., Huang, X., Yu, Y., et al. (2015). Cross talk between histone deacetylase 4 and STAT6 in the transcriptional regulation of arginase 1 during mouse dendritic cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 63–75.
- Yang, Y., Weng, W., Peng, J., Hong, L., Yang, L., Toiyama, Y., Gao, R., Liu, M., Yin, M., Pan, C., et al. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- κ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology* *152*, 851–866.
- Yeung, A.W.S.S., Terentis, A.C., King, N.J.C.C., and Thomas, S.R. (2015). Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clin. Sci.* *129*, 601–672.
- Yoshida, R., Nukiwa, T., Watanabe, Y., Fujiwara, M., Hirata, F., and Hayaishi, O. (1980). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Arch. Biochem. Biophys.* *203*, 343–351.
- Yu, T.C., Guo, F., Yu, Y., Sun, T., Ma, D., Han, J., Qian, Y., Kryczek, I., Sun, D., Nagarsheth, N., et al. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* *170*, 548–563.e16.
- Zaph, C., Troy, A.E., Taylor, B.C., Berman-Booty, L.D., Guild, K.J., Du, Y., Yost, E.A., Gruber, A.D., May, M.J., Greten, F.R., et al. (2007). Epithelial-cell-intrinsic IKK- β expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* *446*, 552–556.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* *56*, 61–72.
- Zhang, M., Fraser, D., and Phillips, A. (2006). ERK, p38, and Smad signaling pathways differentially regulate transforming growth factor- β 1 autoinduction in proximal tubular epithelial cells. *Am. J. Pathol.* *169*, 1282–1293.
- Zhang, M., Qiu, X., Zhang, H., Yang, X., Hong, N., Yang, Y., Chen, H., and Yu, C. (2014). *Faecalibacterium prausnitzii* inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PLoS One* *9*, 6–15.
- Zhang, P., Jiang, G., Gao, J., Li, L., Du, J., and Jiao, X. (2013). SAHA down-regulates the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase via inhibition of the JAK/STAT1 signaling pathway in gallbladder carcinoma cells. *Oncol. Rep.* *29*, 269–275.
- Zhang, Q., Lenardo, M.J., and Baltimore, D. (2017a). 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell* *168*, 37–57.
- Zhang, W., Teng, G., Wu, T., Tian, Y., and Wang, H. (2017b). Expression and Clinical Significance of Elafin in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *23*, 2134–2141.
- Zhang, Z., Li, J., Zheng, W., Zhao, G., Zhang, H., Wang, X., Guo, Y., Qin, C., and Shi, Y. (2016). Peripheral Lymphoid Volume Expansion and Maintenance Are Controlled by Gut Microbiota via

RALDH+ Dendritic Cells. *Immunity* 44, 330–342.

Zheng, L., Kelly, C.J., Battista, K.D., Schaefer, R., Lanis, J.M., Alexeev, E.E., Wang, R.X., Onyiah, J.C., Kominsky, D.J., and Colgan, S.P. (2017). Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2. *J. Immunol.* *ji1700105*.

Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Tigchelaar, E.F., Schirmer, M., Vatanen, T., Mujagic, Z., Vila, A.V., Falony, G., Vieira-Silva, S., et al. (2016). Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* (80-.). 352, 565–569.

Zhou, K. (2017). Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies. *J. Funct. Foods* 33, 194–201.

Zhou, L., Chen, H., Wen, Q., and Zhang, Y. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol.*

Hepatol. 24, 695–701.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* 238, 247–262.

Zilberman-Rudenko, J., Shawver, L.M., Wessel, A.W., Luo, Y., Pelletier, M., Tsai, W.L., Lee, Y., Vonortas, S., Cheng, L., Ashwell, J.D., et al. (2016). Recruitment of A20 by the C-terminal domain of NEMO suppresses NF- κ B activation and autoinflammatory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 1612–1617.

Zimmermann, S., Pfannkuch, L., Al-Zeer, M.A., Bartfeld, S., Koch, M., Liu, J., Rechner, C., Soerensen, M., Sokolova, O., Zamyatina, A., et al. (2017). ALPK1- and TIFA-Dependent Innate Immune Response Triggered by the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System. *Cell Rep.* 20, 2384–2395.

Annexes des articles

Données supplémentaires des deux articles

Supplementary 1 A

Les données concernant les milieux de cultures bactériens utilisés sont communes aux deux publications

Short name	Recipe name	Origin	Composition
BHI aerobic	Brain Heart Infusion	BD Difco	
LB	Luria-Bertani	BD Difco	
LYBHI 1	Liquid Yeast Brain Heart Infusion.1	Homemade	BHI 37g/L +Yeast extract 5g/ml+ Hemin 0.1% 10mL/L+Resazurin 0.1% 1ml/L+ Cystein HCL 0.6g/L
LYBHI 1 mucin	Liquid Yeast Brain Heart Infusion.1 mucin	Homemade	BHI 37g/L +Yeast extract 5g/ml+ Hemin 0.1% 10mL/L+Resazurin 0.1% 1ml/L+ Cystein HCL 0.6g/L + mucin type II 1g/L
LYBHI 2	Liquid Yeast Brain Heart Infusion.2	Homemade	BHI 37g/L +Yeast extract 5g/ml+ Hemin 0.1% 10mL/L+Resazurin 0.1% 1ml/L+ Cystein HCL 0.6g/L+ cellobiose 0.5g/L + maltose 0.5g/L
LYBHI 3	Liquid Yeast Brain Heart Infusion.3	Homemade	BHI 37g/L +Yeast extract 5g/ml+ Hemin 0.1% 10mL/L+Resazurin 0.1% 1ml/L+ Cystein HCL 0.6g/L+ cellobiose 0.5g/L + maltose 0.5g/L + K1 Vit
LYBHI 4	Liquid Yeast Brain Heart Infusion.4	Homemade	BHI 37g/L +Yeast extract 5g/ml+ Hemin 0.1% 10mL/L+Resazurin 0.1% 1ml/L+ Cystein HCL 0.6g/L+ cellobiose 0.5g/L + maltose 0.5g/L + starch 0.5g/L
LYBHI 4 mucin	Liquid Yeast Brain Heart Infusion.4 mucin	Homemade	BHI 37g/L +Yeast extract 5g/ml+ Hemin 0.1% 10mL/L+Resazurin 0.1% 1ml/L+ Cystein HCL 0.6g/L+ cellobiose 0.5g/L + maltose 0.5g/L + starch 0.5g/L + mucin type II 1g/L
LYBHI 4 CH/PL	Liquid Yeast Brain Heart Infusion.4 cholesterol phospholipids (adapted from ATCC® Medium 1872: Base cholesterol medium)	Homemade	BHI 37g/L +Yeast extract 5g/ml+ Hemin 0.1% 10mL/L+Resazurin 0.1% 1ml/L+ Cystein HCL 0.6g/L+ cellobiose 0.5g/L + maltose 0.5g/L + starch 0.5g/L + cholesterol + phospholides
LYBHI 4 RJ	Liquid Yeast Brain Heart Infusion.4 rumen juce (RJ)	Homemade	BHI 37g/L +Yeast extract 5g/ml+ Hemin 0.1% 10mL/L+Resazurin 0.1% 1ml/L+ Cystein HCL 0.6g/L+ cellobiose 0.5g/L + maltose 0.5g/L + starch 0.5g/L + cud liquor 10% (v/v)
M1	DSMZ NUTRIENT AGAR	Homemade	
M104	DSMZ PYG MEDIUM + VitK1	Homemade	
M104 C	DSMZ PY + X MEDIUM	Homemade	
M110	DSMZ CHOPPED MEAT MEDIUM WITH CARBOHYDRATES	Homemade	
M110 K1	DSMZ CHOPPED MEAT MEDIUM WITH CARBOHYDRATES WITH VITK1	Homemade	
M110 RJ	DSMZ CHOPPED MEAT MEDIUM WITH CARBOHYDRATES WITH RUMEN JUCE	Homemade	
M215c	BHI MEDIUM FOR STRICT ANAEROBES	Homemade	
M3	DSMZ	Homemade	
M412	DSMZ ACETOMICROBIUM FAECALIS MEDIUM	Homemade	
M436	DSMZ RUMINOCOCCUS ALBUS MEDIUM	Homemade	
M58	DSMZ BIFIDOBACTERIUM MEDIUM	Homemade	
M78	DSMZ CHOPPED MEAT MEDIUM	Homemade	
M339	DSMZ WILKINS-CHALGREN ANAEROBE BROTH	Homemade	

Supplementary 1 B des publications 1 et 2

Les données des cribles ont été fusionnées pour des raisons pratiques afin de représenter les activités sur TGFB1 et sur IDO1 dans un même tableau. Ils apparaîtront de manière séparée dans les publications.