

## La Flore intestinale commensale : la balance sans le glaive ?

par Jean-Christophe Bambou, Antoine Giraud, Valérie Gaboriau, François Taddei & Nadine Cerf-Bensussan

INSERM EMI-0212, INSERM U571, Faculté de Médecine Necker-René Descartes, 156, rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15

Reu le 14 avril 2005

### RÉSUMÉ

L'intestin est colonisé par une masse considérable de bactéries avec lesquelles se sont établies au cours de l'évolution des relations mutualistes, progressant du commensalisme à une véritable symbiose. En effet, si les bactéries utilisent à leur profit les ressources disponibles chez l'hôte, il apparaît de plus en plus clairement qu'elles exercent sur l'hôte un effet bénéfique, en apportant des activités enzymatiques non codées par le génome de l'hôte, en favorisant la maturation de l'intestin et celle du système immunitaire, mais aussi en modifiant le métabolisme de l'hôte. Ces bactéries, dépourvues de facteurs de pathogénicité,

représentent cependant un danger potentiel pour l'hôte, susceptibles en cas de translocation d'infecter des organes vitaux ou de provoquer un choc septique, mais aussi d'acquérir des facteurs de pathogénicité les rendant agressives, ou d'induire des réactions inflammatoires délétères pour l'intestin. De façon remarquable, la flore commensale favorise la mise en place des défenses immunitaires innées et adaptives dans l'intestin de l'hôte. Celles-ci permettent en retour d'établir une situation d'équilibre entre l'hôte et sa flore qui permet la symbiose.

### SUMMARY The intestinal flora: the scales without the sword

The intestine is colonised by a vast population of resident bacteria which have established mutualistic relationships with their host throughout evolution, progressing from commensalism to symbiotic interactions. Intestinal bacteria benefit from resources available in their host, but reciprocally provide advantages to their host, by supplying enzymatic activities not encoded in the host genome, by promoting maturation of the intestine and of the gut associated immune system as well as by modifying the host

metabolism. The commensal bacteria, although deprived of pathogenic attributes, might however become a danger for the host in case of translocation, acquisition of pathogenic features or *via* the inappropriate activation of intestinal inflammation. Remarkably, the commensal flora promotes the onset of innate and adaptive immune defences which, in turn, allow to set up a subtle balance between the host and the flora that promotes the symbiosis.

### IMPLANTATION DE LA FLORE ET COMMENSALISME

L'implantation de la flore débute dans les heures suivant la naissance par un petit nombre d'espèces pionnières anaérobies facultatives (particulièrement *E. coli*), qui se multiplient très rapidement pour atteindre environ  $10^{14}$  bactéries. Ces premières bactéries sont ensuite remplacées par de nombreuses espèces qui s'implantent progressivement pendant les deux à six premières années de vie chez l'homme pour constituer un panel estimé à plus de 800 espèces bactériennes, en très grande majorité anaérobies strictes, réparties entre espèces dominantes (par définition en nombre à supérieur à  $10^8$  ou  $10^9$ /g de

fèces) et espèces sous-dominantes. Les études récentes en biologie moléculaire sur une cohorte de sujets européens révèlent notre connaissance encore très fragmentaire de la flore, puisque plus de 70 % des espèces détectées n'ont pas encore été cultivées. Ces espèces appartiennent à quatre groupes phylogénétiques présents chez tous les adultes étudiés. Deux groupes sont dominants chez l'adulte : 1) les bactéries Gram positif à faible contenu en GC représentant plus de 50-60 % de la flore et comportant en particulier des bactéries du genre *clostridium*-*eubacterium* et des *ruminococcus*, 2) les Bactéroïdes (Gram négatif) regroupant 30 % environ des bactéries commensales. Deux groupes contiennent des bactéries sous-dominantes chez l'adulte sain: 1) les  $\gamma$ -protéobac-

téries ( $\leq 1\%$ ) dont le prototype sont les *E. coli*, 2) les bactéries Gram positif à fort contenu en GC, essentiellement des bifidobactéries. A l'intérieur de ces grands groupes, la diversité est considérable, puisque, comme déjà indiqué, on estime à environ 800 le nombre d'espèces représentées. Le spectre des espèces commensales serait propre à chaque individu. Il resterait stable chez un adulte sain suivant le même régime alimentaire, les mêmes espèces persistant pendant de nombreuses années. Ce spectre pourrait même se rétablir après les modifications drastiques induites par un traitement antibiotique transitoire (revue dans Doré & Rigottier-Gois, 2004; Zoetendal *et al.*, 2004).

Les mécanismes qui contrôlent l'implantation de la flore sont mal connus, mais le fait que seul un petit nombre de groupes bactériens sont susceptibles de s'implanter suggère une sélection très forte au cours de la coévolution entre la flore et son hôte. Certains ont suggéré une contribution du patrimoine génétique de l'hôte en raison des observations faites chez la souris suggérant un lien avec le complexe majeur d'histocompatibilité (Toivanen *et al.*, 2001), puis chez des jumeaux monozygotes montrant une similarité de leurs flores très supérieure à celle observée entre des sujets d'une même famille (Doré & Rigottier-Gois, 2004; Zoetendal *et al.*, 2004), mais les mécanismes sous-jacents restent à élucider. Un mécanisme clé est certainement la nature des ressources disponibles chez l'hôte, qui permettent le commensalisme. Ces ressources dépendent de l'alimentation de l'hôte, un fait illustré par les caractéristiques de la flore chez les enfants allaités et les modifications de cette flore pendant et au décours du sevrage. L'implantation de la flore dépend aussi de la capacité des bactéries à s'adapter aux ressources disponibles chez l'hôte. Chang *et al.* (2004) ont montré les modifications massives de l'expression des gènes d'*E. coli* impliqués dans le métabolisme des sucres, lorsque *E. coli* est cultivé au contact de mucus, et l'incapacité des souches mutantes dans certains de ces gènes à s'implanter chez la souris. Certaines souches commensales ont en outre la capacité d'induire leurs propres ressources chez l'hôte. Le travail du groupe de J. Gordon a démontré la capacité d'une flore complexe et d'une espèce dominante, *B. thetaiotaomicron*, à induire l'expression de polysaccharides avec une terminaison fucose  $\alpha 1-2\text{gal}\beta$  sur l'épithélium de l'iléon terminal (Hooper *et al.*, 1999). Une  $\alpha$ -fucosidase sécrétée par la bactérie permet de libérer le L-fucose produit par l'hôte, qui sert alors de source d'énergie pour la bactérie. De façon remarquable, le gène *fucR* qui régule positivement l'expression des gènes bactériens impliqués dans le métabolisme du fucose par la bactérie, contrôle simultanément la capacité de celle-ci à induire l'expression des résidus fucosylés à travers un locus encore non identifié sur le chromosome bactérien. Ce locus, dont l'expression est régulée négativement par *FucR*, code pour une ou des molécules encore inconnue(s) mais capable(s) de donner un signal à l'hôte indépendamment de toute adhésion bactérienne, signal qui induit la synthèse d'une fucosyltransférase capable de fixer des résidus fucosylés sur les glycoprotéines exprimées au pôle apical des entérocytes

(Hooper *et al.*, 1999). Cette capacité des souches à utiliser les ressources disponibles chez l'hôte régule probablement la taille des populations susceptibles de s'implanter, mais aussi leur situation dans la lumière. On peut en effet distinguer la flore au contact de la muqueuse, dont la composition est stable tout le long du colon, et la flore présente dans la lumière dont la composition est différente et variable selon les niveaux, peut-être du fait des variations dans les ressources disponibles dans la lumière, que ces ressources dérivent de l'alimentation de l'hôte ou de métabolites produites par la flore en amont (Zoetendal *et al.*, 2002).

## EFFETS BÉNÉFIQUES DE LA FLORE SUR L'HÔTE ET SYMBIOSE HÔTE-FLORE

Si les bactéries ont pu s'implanter dans l'intestin des différentes espèces apparues au cours de l'évolution en utilisant à leur profit le métabolisme de l'hôte, l'avantage évolutif conféré par leur implantation apparaît désormais clairement, un nombre croissant d'études démontrant leur impact considérable et globalement bénéfique pour leurs hôtes. Ces échanges bénéfiques pour chacun des partenaires conduisent à définir les interactions hôte-flore comme une symbiose.

Un premier effet bénéfique de la flore, établi de longue date, est son rôle barrière contre les germes pathogènes. Cet effet longtemps attribué à une compétition pour les ressources disponibles chez l'hôte apparaît désormais la conséquence d'une série de mécanismes complexes induits par la colonisation, qui engagent les défenses immunes innées et adaptatives de l'hôte (*cf.* ci-dessous).

D'autres effets radicaux sur le développement de l'intestin et la physiologie de l'hôte ont été récemment mis en évidence par les travaux du groupe de J. Gordon. En étudiant le transcriptome iléal chez des souris gnotobiotiques colonisées soit par une flore complexe, soit par des espèces bactériennes isolées, ces auteurs ont montré que la colonisation induit l'expression d'un grand nombre de gènes épithéliaux impliqués dans des fonctions très diverses : absorption/digestion des nutriments (transporteur  $\text{Na}^+$ /glucose, co-lipase), formation des jonctions serrées (*Spr2*), détoxification de certains métabolites (*MDR*), fonctions de défense (récepteur polymérique pour les IgA, peptides anti-bactériens) (Hooper *et al.*, 2001). Les effets de la flore sont variables selon les bactéries concernées. L'action des bactéries s'exerce par des relais moléculaires non identifiés sur les entérocytes des villosités ou des cryptes, selon les gènes concernés (Hooper *et al.*, 2001). Elle s'exerce dans les cryptes de l'iléon plus particulièrement sur les cellules de Paneth, au sein desquelles la colonisation induit non seulement l'expression de certains peptides antibactériens (Hooper *et al.*, 2003), ou d'enzymes permettant d'activer ces peptides (Lopez-Boado *et al.*, 2000), mais aussi de facteurs angiogéniques non identifiés. Stappenbeck *et al.* (2002) ont ainsi observé que la colonisation par une flore complexe ou par la bactérie *B. thetaiotaomicron* stimule la prolifération du réseau capillaire irrigant les villosités

intestinales, un effet qui n'est pas observé chez des souris mutantes dont les cellules de Paneth ont été éliminées génétiquement. Ces effets de la colonisation contribuent en partie à expliquer l'augmentation massive (60 %) du stockage des graisses observée par Backhed *et al.* (2004), lors de la conventionnalisation d'animaux axéniques. L'augmentation de la disponibilité intestinale en glucose, libéré par les hydrolases bactériennes à partir des polysaccharides alimentaires, l'augmentation du flux sanguin intestinal et de l'expression du transporteur Na<sup>+</sup>/glucose, concourent à un accroissement de flux de glucose dans la circulation porte et, par une série de relais, à une stimulation de la synthèse hépatique des triglycérides. Simultanément, les bactéries intestinales inhibent l'expression entérocytaire de la *fiaf* (*fasting-inducing adipocyte factor*), une hormone exerçant un rétrocontrôle négatif sur la lipoprotéine lipase. L'inhibition de la *fiaf*, en favorisant l'activation de la lipoprotéine lipase, stimule l'incorporation des triglycérides dans les adipocytes (Backhed *et al.*, 2004). La flore, à travers ces différents effets, a probablement apporté un mécanisme d'épargne utile dans un contexte de disette et/ou d'alimentation peu diversifiée riche en polysaccharides d'origine végétale.

Les mécanismes moléculaires, qui sous-tendent les interactions évoquées plus haut, entre la flore et son hôte sont à ce jour inconnus. Néanmoins, les données décrites ci-dessus conduisent désormais à envisager les millions de gènes codés par les bactéries de la flore commensale comme un métagénome capable de compléter l'équipement métabolique de l'hôte et/ou de moduler l'expression de ses gènes, et d'exercer ainsi un impact considérable en physiologie et en pathologie. Une étude récente chez la drosophile a permis de démontrer le caractère bénéfique de cet impact tôt dans la vie, puisque l'axénisation précoce raccourcit la vie des individus (Brummel *et al.*, 2004). Cet impact pourrait être au contraire délétère en fin de vie, puisque l'axénisation tardive prolonge au contraire la survie des drosophiles. Cette observation souligne l'existence d'un équilibre précis entre l'hôte et sa flore, nécessaire pour maintenir une situation de symbiose. Elle suggère aussi que cet équilibre est fragile, et que sa rupture peut induire des effets délétères pour les deux partenaires, et pour l'hôte en particulier. L'étude des maladies inflammatoires intestinales, en révélant le rôle de la flore intestinale dans la rupture de l'homéostasie intestinale, établit l'existence de mécanismes actifs chez l'hôte capable de maintenir cet équilibre (balance), et d'éviter les effets pathogènes possibles de cette flore (glaive) (Bouma & Strober, 2003). Ces travaux, comme l'étude de certains modèles de déficits immunitaires, indiquent que cet équilibre fragile est très largement sous le contrôle du système immunitaire inné et acquis de l'hôte, celui-ci se développant sous l'effet de la flore et, en retour, assurant un contrôle efficace de certains effets potentiellement pathogènes de la flore, pullulation, translocation, inflammation. D'autres travaux très récents montrent que certaines bactéries de la flore commensale sont capables d'émettre des signaux inhibant les réponses inflammatoires de l'hôte, mais peut-être aussi de s'adapter pour éviter leur reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte.

## FLORE ET SYSTÈME IMMUNITAIRE : SI VIS PACEM, PARA BELLUM

Un nombre croissant de données indique que l'équilibre entre l'hôte et sa flore est maintenu par un dialogue entre les bactéries et le système immunitaire de l'hôte à travers l'épithélium intestinal. Celui-ci se comporte comme un « senseur » du contenu intestinal et exerce des fonctions rattachées à l'immunité innée.

### Flore intestinale et épithélium intestinal

L'épithélium intestinal contribue aux fonctions de défense de l'intestin et au maintien de l'homéostasie intestinale par plusieurs mécanismes dont certains sont régulés par la flore. Un premier rôle clé est celui de barrière physique. Les premiers composants de cette barrière physique sont représentés par le mucus sécrété par les cellules à mucus et le glycocalyx, un réseau complexe de glycoprotéines exprimées à la surface des microvillosités qui se projettent dans la lumière. En effet, si le mucus et le glycocalyx représentent une source d'énergie et/ou une niche favorable à l'implantation des bactéries de la flore (*cf.* ci-dessus), ils forment aussi une barrière limitant les contacts de la muqueuse avec la flore, et donc les risques de translocation ou de signaux proinflammatoires potentiellement délétères. Leur composition peut être modulée par la flore (*cf.* ci-dessus). La barrière physique épithéliale est aussi assurée par des jonctions serrées, dont l'étanchéité prévient efficacement l'entrée des macromolécules et des bactéries non invasives. De façon notable, la colonisation, à travers l'induction très forte de la protéine *sprr2* dans l'épithélium villositaire, semble capable de renforcer cette étanchéité (Hooper *et al.*, 2001).

Un second rôle important de l'épithélium est celui de barrière chimique liée à la production de peptides anti-bactériens ou défensives. Certains sont produits par l'ensemble des entérocytes ( $\beta$ -défensines); d'autres ( $\alpha$ -défensines ou cryptdines) sont uniquement produits par les cellules de Paneth. Ces cellules, situées dans le fond des cryptes de l'intestin grêle, apparaissent plus particulièrement spécialisées dans les défenses anti-bactériennes. Dans ces cellules, les peptides anti-bactériens sont stockés sous forme de propeptides inactifs dans des granules, avec d'autres facteurs anti-bactériens tels le lysozyme et la phospholipase A2. Ils sont libérés en réponse à des stimulations bactériennes (bactéries entières, LPS, muramyl dipeptide) et subissent alors un clivage qui les rend actifs dans la lumière de la crypte (Ayabe *et al.*, 2000). Ce clivage est assuré chez la souris par une métalloprotéase, la matrilysine (Wilson *et al.*, 1999). Celle-ci serait absente chez l'Homme où le clivage peut être effectué par la trypsine (Ghosh *et al.*, 2002). Certains peptides anti-bactériens sont synthétisés de façon constitutive. C'est le cas de HBD-1 dans les entérocytes des villosités, et de plusieurs cryptdines dans les cellules de Paneth. Néanmoins, l'expression de la matrilysine est induite par la flore (Lopez-Boado *et al.*, 2000), suggérant que la protection exercée par les crypt-

dines n'est opérante qu'après un premier contact avec les bactéries. D'autres peptides sont induits sous l'effet de la flore. L'exemple le mieux documenté est celui de l'angiogénine 4 (Hooper *et al.*, 2003). Ce peptide, absent chez les souris axéniques, apparaît dans les granules des cellules de Paneth dans les jours suivant la colonisation par une flore complexe ou par *B. thetaiotaomicron*. De façon intéressante, son spectre de bactéricidie montre que ce peptide est beaucoup plus toxique pour des bactéries gram positives et particulièrement pour des pathogènes comme *L. monocytogenes* et *E. faecalis* que pour des bactéries gram négatives (*E. coli*, *B. thetaiotaomicron*) ou positives (*L. innocua*) de la flore commensale (Hooper *et al.*, 2003). De tels peptides anti-bactériens induits par la flore, mais principalement actifs sur les germes pathogènes, pourraient jouer un rôle important dans l'effet barrière de la flore vis-à-vis des agents pathogènes (Salzman *et al.*, 2003). Des travaux récents suggèrent qu'une anomalie de production des cryptdines pourrait, en diminuant la barrière anti-bactérienne créée par les cellules de Paneth, favoriser la translocation de bactéries dans l'iléon et ainsi la rupture de l'homéostasie intestinale au cours de la maladie de Crohn. Cette hypothèse repose sur l'observation, d'une part d'une expression préférentielle dans le cytosol des cellules de Paneth, de la molécule NOD2, un récepteur au muramyl-dipeptide dont certaines mutations prédisposent à la maladie de Crohn, d'autre part, chez les souris dont le gène NOD2 est inactivé, d'une diminution de l'expression de certaines cryptdines en particulier lors de l'infection par *L. monocytogenes* (Kobayashi *et al.*, 2005). Cette observation nécessite cependant d'être confirmée.

Une troisième fonction de l'épithélium, qui complète ce rôle de défense immédiate, est la sécrétion de chimiokines capables de recruter les cellules plus classiques de l'immunité innée, polynucléaires et/ou macrophages. L'expression de ces chimiokines est inductible à travers une cascade de signalisation déclenchée par la liaison de motifs bactériens (PAMPs) incluant en particulier LPS, flagelline, acide lipotéchoïque, CpG non méthylés d'origine bactérienne), à des récepteurs dont les mieux caractérisés sont les récepteurs Toll (Takeda & Akira, 2005), associés à la membrane, et les récepteurs NOD1 et NOD2 cytosoliques ((Girardin *et al.*, 2002). L'activation de ces récepteurs, en induisant la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et l'activation des MAP-kinases, permet la transcription et la traduction de nombreux gènes cibles, dont les gènes des chimiokines IL-8 et CCL20, impliquées respectivement dans le recrutement de polynucléaires et de cellules dendritiques (Takeda & Akira, 2005). Le recrutement de ces effecteurs de l'immunité en réponse à des germes pathogènes peut aboutir à une réaction inflammatoire explosive, délétère pour la bactérie et donc utile pour favoriser son éviction mais au prix de destructions tissulaires sévères et parfois létales pour l'hôte (Sansonetti, 2004). De nombreux facteurs concourent à contenir cette réaction vis-à-vis de la flore commensale. Mucus, glycocalyx et IgA (ci-dessous) limitent l'accès de ces bactéries dépourvues de facteurs d'adhérence et de leurs produits aux récepteurs

entérocytaires exprimés à la membrane, alors que les molécules NOD1 et NOD2, du fait de leur situation dans le cytosol, restent largement inaccessibles. En situation normale, les récepteurs Toll exprimés par les cellules épithéliales semblent en outre peu activables par la flore commensale. Ainsi le LPS n'induit pas de signal proinflammatoire, lorsqu'il est appliqué à la face luminale de muqueuse iléale normale de souris montée en chambre de Ussing (Bambou *et al.*, 2004). Plusieurs raisons ont été invoquées : expression faible de son récepteur TLR4 et absence d'expression du corécepteur MD2 dans les entérocytes (Abreu, 2003), expression de la protéine Tollip, qui en se fixant à la kinase IRAK, bloque la cascade de signalisation et maintient TLR4 mais aussi TLR2 dans un état désensibilisé (Otte *et al.*, 2004). Une autre hypothèse évoquée pour TLR5 est une compartimentalisation de ce récepteur au pôle basolatéral des entérocytes prévenant son contact avec des bactéries non invasives (Gewirtz *et al.*, 2001). Le ligand de ce récepteur, la flagelline, est cependant capable d'activer la production de chimiokines par la muqueuse iléale montée en chambre de Ussing et cette induction est observée avec de la flagelline d'un *E. coli* commensal, une observation compatible avec la conservation très forte de cette protéine entre espèces flagellées commensales et pathogènes (Bambou *et al.*, 2004). Deux mécanismes pourraient éviter une réponse inappropriée à la flagelline. D'une part, 15 % des individus ont un TLR5 non fonctionnel suggérant que ce trait génétique, qui confère par ailleurs une sensibilité à la légionellose, a pu être sélectionné au cours de l'évolution (Hawn *et al.*, 2003). D'autre part, nos résultats non publiés suggèrent que *E. coli* pourrait être capable de moduler négativement l'expression de la flagelline lors de la colonisation, protégeant ainsi l'hôte de l'induction d'une réponse inflammatoire potentiellement délétère. Enfin, d'autres études montrent que la flore peut induire des signaux de rétrocontrôle. Plusieurs études ont identifié, chez des pathogènes, des protéines capables d'inhiber la cascade NK- $\kappa$ B (Collier-Hyams *et al.*, 2002 ; Ingersoll *et al.*, 2003). Celles-ci, en inhibant la réponse proinflammatoire de défense de l'hôte, favorisent le processus invasif. Une stratégie identique semble être utilisée par la flore commensale pour moduler les réponses de l'hôte et préserver l'homéostasie intestinale. Ainsi, *B. thetaiotaomicron* peut inhiber la cascade NF- $\kappa$ B induite par *S. enteritidis*, par la flagelline et la PMA. Cet effet passerait par une redistribution cytosolique de PPAR $\gamma$ , qui se lierait à la sous-unité RelA de NF- $\kappa$ B et l'entraînerait hors du noyau, prévenant l'activation de la transcription des gènes cibles de NF- $\kappa$ B (Kelly *et al.*, 2004). De façon notable, l'expression de PPAR $\gamma$  est régulée par la flore. PPAR $\gamma$  est induit dans les cellules coliques par la colonisation, et les études *in vitro* à l'aide de cellules transfectées suggèrent que l'effet de la flore s'exerce à travers des signaux passant par les TLR (Dubuquoy *et al.*, 2003). Cet effet anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$  est conforté par les études de modèles expérimentaux de colite. Dans ces modèles, les agonistes de PPAR $\gamma$  ont un effet anti-inflammatoire très efficace (Desreumaux *et al.*, 2001 ; Su *et al.*, 1999). L'effet des

agonistes semble nécessiter la fixation de PPAR $\gamma$  dans le noyau et impliquerait un mécanisme différent de celui induit par *B. thetaiotaomicron* (Dubuquoy *et al.*, 2002). De nouvelles études sont cependant nécessaires pour éclaircir le ou les mécanismes des effets anti-inflammatoires de PPAR $\gamma$ .

Dans leur ensemble, ces données montrent que la colonisation par la flore a des effets dichotomiques qui contribuent ensemble à maintenir l'homéostasie intestinale. D'une part, la flore renforce la barrière épithéliale physique et chimique, contribuant ainsi à l'effet de barrière vis-à-vis des pathogènes. D'autre part, certains composants de la flore induisent des mécanismes régulateurs qui évitent des réponses inflammatoires innées. L'hypothèse d'un défaut de régulation par le PPAR $\gamma$  a été évoquée au cours de la rectocolite hémorragique du fait de l'expression anormalement faible de cette protéine dans l'épithélium colique des patients. Il ne semble pas cependant s'agir d'une anomalie primitive (Dubuquoy *et al.*, 2003).

Une dernière fonction clé de l'épithélium intestinal est d'assurer l'échantillonnage des antigènes intraluminaux. Celui-ci est nécessaire à la mise en jeu des réponses immunes spécifiques (immunité adaptative). Le rôle de l'épithélium est double. D'une part, les cellules M spécialisées de l'épithélium des plaques de Peyer assurent le transport d'antigènes intacts vers les cellules immunitaires sous-jacentes. D'autre part, l'épithélium synthétise des chimiokines capables de recruter des cellules dendritiques qui peuvent entrer dans l'épithélium et prélever des bactéries dans la lumière intestinale, puis les transporter vers les ganglions mésentériques.

### Flore intestinale et système lymphoïde associé à l'intestin

L'intestin de l'adulte contient un nombre considérable de cellules immunitaires rassemblées au sein du système lymphoïde associé à l'intestin. L'anatomie fonctionnelle de ce système explique son rôle clé dans la réponse aux bactéries intraluminales, et permet de comprendre comment celles-ci contribuent à stimuler son développement post-natal, celui-ci en retour contribuant à maintenir des relations harmonieuses avec la flore en limitant les translocations bactériennes et en assurant une régulation précise des réponses inflammatoires. Le système lymphoïde associé à l'intestin peut schématiquement être divisé en deux compartiments. Le premier compartiment, nécessaire à l'initiation des réponses intestinales T et B spécifiques (immunité adaptative), est formé par les follicules lymphoïdes intramuqueux isolés ou regroupés en plaques de Peyer et par les ganglions mésentériques. Le second compartiment, dit effecteur, est formé par les lymphocytes T matures, par les plasmocytes et les cellules de l'immunité innée (en majorité des macrophages en situation normale), dispersés dans le chorion et l'épithélium. Ces deux compartiments sont reliés par les voies lymphatiques et sanguines.

Deux études récentes permettent de comprendre comment les bactéries de la flore peuvent initier les réponses

T et B intestinales. La première étude de A. Macpherson montre que des bactéries commensales (*E. cloacae*) fluorescentes, administrées par voie gastrique, pénètrent préférentiellement à travers l'épithélium intestinal des plaques de Peyer et sont captées par les cellules dendritiques et les macrophages du dôme (Macpherson *et al.*, 2001). L'épithélium qui surplombe le follicule, possède en effet une différenciation induite par les lymphocytes sous-jacents, qui favorise à la fois l'accès des antigènes et leur transport sous forme native (Kerneis *et al.*, 1997). Ainsi, l'épithélium folliculaire prend naissance dans des cryptes dépourvues de cellules de Paneth; il est pauvre en cellules à mucus et ne synthétise pas de récepteur polymérique pour les IgA. Enfin, cet épithélium contient environ 10 % de cellules M, les cellules épithéliales du follicule qui présentent la différenciation la plus caractéristique de ce site. Ces cellules ont perdu leurs microvillosités et donc leur activité de digestion. Elles sont dépourvues de membrane basale, ce qui permet aux cellules immunitaires sous-jacentes de refouler leur cytoplasme et de s'insinuer ainsi très près de la lumière au sein de replis cytoplasmiques. Surtout, ces cellules ont acquis une activité intense d'endocytose (Kerneis *et al.*, 1997; Sierro *et al.*, 2000). Leur rôle dans le transport d'antigènes intraluminaux, bien établi, est confirmé pour les bactéries commensales par Mac Pherson, qui fait des plaques de Peyer la porte d'entrée principale de ces bactéries, les bactéries ayant pénétré pouvant soit être détruites sur place, soit être convoyées dans des cellules dendritiques jusqu'aux ganglions mésentériques. Un second mode d'entrée des bactéries, décrit d'abord par le groupe de M. Rescigno (Rescigno *et al.*, 2001), puis très récemment par celui de Reinecker (Niess *et al.*, 2005), implique les cellules dendritiques du chorion intestinal. Celles-ci sont capables d'ouvrir transitoirement les jonctions serrées épithéliales pour insinuer dans la lumière intestinale des prolongements qui captent les bactéries et les ramènent dans le chorion. Le groupe de Reinecker a montré de façon convaincante que l'épithélium de l'iléon exprime une chimiokine, la fractalkine, indispensable au recrutement de ces cellules dendritiques. Celles-ci transportent alors les bactéries commensales vers les ganglions mésentériques. Les données de Reinecker suggèrent que cette voie est indispensable à la translocation bactérienne dans les ganglions mésentériques (Niess *et al.*, 2005), contrairement à Macpherson, qui suggère que cette translocation se fait après une étape de captation dans les plaques de Peyer (Macpherson *et al.*, 2001). Même s'il reste difficile d'établir actuellement la part précise de ces deux voies, il est probable qu'elles concourent toutes deux à l'entrée des bactéries commensales et à l'information du système immunitaire.

Macpherson a ensuite étudié le devenir des bactéries commensales ainsi transloquées. Il montre que ces bactéries, contrairement à certaines bactéries pathogènes, sont rapidement et efficacement éliminées par les macrophages des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques, ces organes représentant un filtre prévenant la dissémination systémique de ces bactéries (Macpherson *et al.*, 2001). Le système immunitaire inné assure ainsi

une barrière efficace complétant la barrière épithéliale. Comparant souris axéniques et conventionnelles, Macpherson confirme ensuite les travaux déjà anciens de D. Guy-Grand et de C. Moreau en montrant que l'entrée des bactéries commensales enclenche la réponse immunitaire adaptative. En effet, l'intestin de souris axéniques est quasiment dépourvu de lymphocytes T et de plasmocytes à IgA, ceux-ci peuplant l'intestin après une exposition d'environ trois semaines à un environnement conventionnel. Les travaux de D. Guy-Grand (1974) ont montré que les bactéries intraluminales induisent une prolifération intense de blastes T et de blastes IgA dans les plaques de Peyer (mais aussi probablement dans les ganglions mésentériques), que ces blastes sensibilisés empruntent les voies lymphatiques qui drainent les plaques de Peyer vers les ganglions mésentériques, puis les ganglions mésentériques vers le canal thoracique et gagnent ainsi la circulation sanguine avant d'essaimer dans la muqueuse intestinale où ils achèvent leur maturation, les plasmocytes à IgA se localisant dans le chorion, les lymphocytes T se répartissant dans le chorion (principalement pour ceux de type CD4<sup>+</sup>) et dans l'épithélium (principalement les CD8<sup>+</sup>). D'autres travaux complémentaires ont montré que la migration élective des blastes sensibilisés aux antigènes intraluminaux est guidée par des récepteurs pour l'endothélium des vaisseaux intestinaux, en particulier l'intégrine  $\alpha 4 \beta 7$  et le récepteur CCR9 pour la chimiokine TECK synthétisée par l'épithélium intestinal. Ces récepteurs sont acquis dans les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer lors de la sensibilisation des lymphocytes au contact des cellules dendritiques présentes dans ces organes à travers une voie de transduction impliquant l'acide rétinoïque (Iwata *et al.*, 2004 ; Mora *et al.*, 2005).

La mise en place de la réponse adaptative permet de compléter les dispositifs qui assurent un équilibre harmonieux entre l'hôte et sa flore intestinale. Les IgA, synthétisées dans le chorion sous forme dimérique associées par une pièce J, sont transportées rapidement dans la lumière intestinale par transcytose. Elles se fixent sur le récepteur polymérique des immunoglobulines exprimé au pôle latérobasal des entérocytes. Elles sont alors chargées dans des vésicules à clathrine, puis relarguées au pôle apical de l'entérocyte, associées à la partie extracellulaire clivée de ce récepteur qui prend alors le nom de pièce sécrétoire. Une quantité considérable (estimée à 40 mg/kg/j) d'IgA sécrétoires est ainsi libérée dans la lumière intestinale. Leur structure compacte favorise leur résistance aux protéases bactériennes, alors que la pièce sécrétoire favorise leur ancrage au mucus (Phalipon *et al.*, 2002), dans lequel elles peuvent piéger les bactéries, diminuant ainsi leur contact avec la muqueuse et le risque de translocation. Les IgA jouent ainsi un rôle bien documenté pour prévenir les translocations, la fréquence et l'intensité de ces dernières diminuant considérablement après mise en place de la réponse IgA sous l'effet de la colonisation (Macpherson *et al.*, 2001). Le rôle des IgA dans le maintien de l'homéostasie hôte-flore est illustré par les observations du groupe de S. Fagarasan chez des souris déficientes dans la production d'IgA du

fait de l'absence de l'enzyme AICD (nécessaire à la commutation de classe et à l'acquisition des mutations hypersomatiques), puisque ces souris déficientes ont des pullulations microbiennes sévères et une hyperplasie folliculaire, témoin probable de l'entrée accrue des bactéries dans les follicules lymphoïdes dont elles induisent alors l'activation excessive.

La mise en place de la réponse IgA lors de la colonisation est associée à celle d'une réponse T, moins bien explorée à ce jour. Un premier rôle de ces lymphocytes est, vraisemblablement à travers la sécrétion de différentes cytokines et surtout d'interféron gamma, de favoriser l'activation de macrophages et de polynucléaires et de permettre ainsi l'élimination de bactéries qui franchiraient la barrière épithéliale, un mode d'action qui complète le dispositif de prévention des translocations. Outre ces lymphocytes aux propriétés proinflammatoires, il est probable que d'autres lymphocytes, ceux-ci régulateurs, sont induits pour modérer la réponse proinflammatoire induite par les premiers. Nos données non publiées suggèrent que les deux populations sont mises en place simultanément dans l'iléon. Ces deux populations sont indispensables pour maintenir en permanence une réponse de défense aux bactéries tout en évitant une réponse inflammatoire excessive. L'importance de cette balance a été bien illustrée dans des modèles expérimentaux de colites chez la souris, où le transfert de lymphocytes régulateurs capables de migrer dans l'intestin est nécessaire pour éviter l'emballement de la réponse proinflammatoire induite par des LT TH1 spécifiques de la flore (revue dans Coombes *et al.*, 2005).

## CONCLUSION

Les travaux récents ont renouvelé l'intérêt pour la flore intestinale en montrant les interactions réciproques qui se sont mises en place au cours de l'évolution entre la flore et son hôte au bénéfice des deux partenaires. Ces travaux suggèrent aussi que la flore a très largement contribué à modeler au niveau de l'intestin les fonctions immunitaires de l'hôte, aboutissant à la mise en place d'un réseau de défenses immunitaires innées et adaptatives qui concourent pour maintenir l'équilibre entre l'hôte et sa flore. Le renforcement ou l'induction de ce réseau de défenses lors de la colonisation paraît désormais comme l'un des mécanismes clé sous-tendant l'effet de barrière de la flore contre les pathogènes. La balance entre réponses immunes proinflammatoires nécessaires pour contenir la flore et mécanismes régulateurs est néanmoins fragile. Elle peut être rompue par l'irruption de pathogènes, la réponse inflammatoire de l'hôte étant alors nécessaire pour favoriser l'éviction de la bactérie pathogène, même au prix d'un coût important pour l'hôte. Elle peut aussi se rompre de façon pathologique, du fait d'un déficit de l'immunité innée ou adaptative de l'hôte. Ce déficit peut, selon la nature du mécanisme altéré, soit permettre aux bactéries commensales d'attaquer l'hôte de façon anormale, soit à l'inverse conduire

l'hôte à répondre de façon excessive à la flore, conduisant au déclenchement de maladies inflammatoires intestinales, maladie de Crohn et rectocolite hémorragique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abreu M. T., Immunologic regulation of toll-like receptors in gut epithelium. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2003, 19, 559-564.
- Ayabe T., Satchell D. P., Wilson C. L., Parks W. C., Selsted M. E. & Ouellette A. J., Secretion of microbicidal  $\alpha$ -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.*, 2000, 1, 113-118.
- Backhed F., Ding H., Wang T., Hooper L. V., Koh G. Y., Nagy A., Semenkovich C. F. & Gordon J. I., The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 15718-15723.
- Bambou J. C., Giraud A., Menard S., Begue B., Rakotobe S., Heyman M., Taddei F., Cerf-Bensussan N. & Gaboriau-Routhiau V., *In vitro* and *ex vivo* activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 42984-42992.
- Bouma G. & Strober W., The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, 3, 521-533.
- Brummel T., Ching A., Seroude L., Simon A. F. & Benzer S., *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 12974-12979.
- Chang D. E., Smalley D. J., Tucker D. L., Leatham M. P., Norris W. E., Stevenson S. J., Anderson A. B., Grissom J. E., Laux D. C., Cohen P. S. & Conway T., Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 7427-7432.
- Collier-Hyams L. S., Zeng H., Sun J., Tomlinson A. D., Bao Z. Q., Chen H., Madara J. L., Orth K. & Neish A. S., Cutting edge: Salmonella AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF- $\kappa$ B pathway. *J. Immunol.*, 2002, 169, 2846-2850.
- Coombes J. L., Robinson N. J., Maloy K. J., Uhlig H. H. & Powrie F., Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol. Rev.*, 2005, 204, 184-194.
- Desreumaux P., Dubuquoy L., Nutton S., Peuchmaur M., Englaro W., Schoonjans K., Derijard B., Desvergne B., Wahli W., Chambon P., Leibowitz M. D., Colombel J. F. & Auwerx J., Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.*, 2001, 193, 827-838.
- Doré J. & Rigottier-Gois L., Flore microbienne intestinale. Méthodes d'étude. In: Flore microbienne intestinale. Physiologie et Pathologie digestives. Rambaud J.-C., Buts J.-P., Corthier G. & Flourie B., editors. John Libbey Eurotext, 2004, Paris, pp. 3-17.
- Dubuquoy L., Dharancy S., Nutton S., Pettersson S., Auwerx J. & Desreumaux P., Role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet*, 2002, 360, 1410-1418.
- Dubuquoy L., Jansson E. A., Deeb S., Rakotobe S., Karoui M., Colombel J. F., Auwerx J., Pettersson S. & Desreumaux P., Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2003, 124, 1265-1276.
- Gewirtz A. T., Navas T. A., Lyons S., Godowski P. J. & Madara J. L., Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.*, 2001, 167, 1882-1885.
- Ghosh D., Porter E., Shen B., Lee S. K., Wilk D., Drazba J., Yadav S. P., Crabb J. W., Ganz T. & Bevins C. L., Paneth cell tryptase is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat. Immunol.*, 2002, 3, 583-590.
- Girardin S., Sansonetti P. & Philpott D., Intracellular vs extracellular recognition of pathogens-common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.*, 2002, 10, 193-199.
- Guy-Grand D., Griscelli C. & Vassalli P., The gut-associated-lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. *Eur. J. Immunol.*, 1974, 4, 435-443.
- Hawn T. R., Verbon A., Lettinga K. D., Zhao L. P., Li S. S., Laws R. J., Skerrett S. J., Beutler B., Schroeder L., Nachman A., Ozinsky A., Smith K. D. & Aderem A., A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J. Exp. Med.*, 2003, 198, 1563-1572.
- Hooper L. V., Stappenbeck T. S., Hong C. V. & JGordon J. I., Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.*, 1999, 4, 269-273.
- Hooper L. V., Wong M. H., Thelin A., Hansson L., Falk P. G. & Gordon J. I., Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 2001, 291, 881-884.
- Hooper L. V., Xu J., Falk P. G., Midtvedt T. & Gordon J. I., A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 9833-9838.
- Ingersoll M. A., Moss J. E., Weinrauch Y., Fisher P. E., Groisman E. A. & Zychlinsky A., The ShiA protein encoded by the *Shigella flexneri* SHI-2 pathogenicity island attenuates inflammation. *Cell Microbiol.*, 2003, 5, 797-807.
- Iwata M., Hirakiyama A., Eshima Y., Kagechika H., Kato C. & Song S. Y., Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 2004, 21, 527-538.
- Kelly D., Campbell J. I., King T. P., Grant G., Jansson E. A., Coutts A. G., Pettersson S. & Conway S., Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA. *Nat. Immunol.*, 2004, 5, 104-112.
- Kerneis S., Bogdanova A., Krahenbuhl J.-P. & Pringault E., Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science*, 1997, 277, 949-952.
- Kobayashi K. S., Chamaillard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nunez G. & Flavell R. A., Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 2005, 307, 731-734.
- Lopez-Boado Y. S., Wilson C. L., Hooper L. V., Gordon J. I., Hultgren S. J. & Parks W. C., Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 2000, 148, 1305-1315.
- Macpherson A., Hunziker L., McCoy K. & Lamm A., IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.*, 2001, 3, 1021-1035.
- Mora J. R., Cheng G., Picarella D., Briskin M., Buchanan N. & von Andrian U. H., Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J. Exp. Med.*, 2005, 201, 303-316.
- Niess J. H., Brand S., Gu X., Landsman L., Jung S., McCormick B. A., Vyas J. M., Boes M., Ploegh H. L., Fox J. G., Littman D. R. & Reinecker H. C., CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 2005, 307, 254-258.
- Otte J. M., Cario E. & Podolsky D. K., Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 2004, 126, 1054-1070.

- Phalipon A., Cardona A., Kraehenbuhl J. P., Edelman L., Sansonetti P. J. & Corthesy B., Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion *in vivo*. *Immunity*, 2002, 17, 107-115.
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J. P. & Ricciardi-Castagnoli P., Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.*, 2001, 4, 361-367.
- Salzman N. H., Ghosh D., Huttner K. M., Paterson Y. & Bevins C. L., Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*, 2003, 422, 522-526.
- Sansonetti P. J., War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, 4, 953-964.
- Sierro F., Pringault E., Assman P. S., Kraehenbuhl J. P. & Debarb N., Transient expression of M-cell phenotype by enterocyte-like cells of the follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patches. *Gastroenterology*, 2000, 119, 734-743.
- Stappenbeck T. S., Hooper L. V. & Gordon J. I., Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 15451-15455.
- Su C. G., Wen X., Bailey S. T., Jiang W., Rangwala S. M., Keilbaugh S. A., Flanigan A., Murthy S., Lazar M. A. & Wu G. D., A novel therapy for colitis utilizing PPAR- $\gamma$  ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J. Clin. Invest.*, 1999, 104, 383-389.
- Takeda K. & Akira S., Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.*, 2005, 17, 1-14.
- Toivanen P., Vaahtovuori J. & Eerola E., Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. *Infect. Immun.*, 2001, 69, 2372-2377.
- Wilson C. L., Ouellette A. J., Satchell D. P., Ayabe T., Lopez-Boado Y. S., Stratman J. L., Hultgren S. J., Matrisian L. M. & Parks W. C., Regulation of intestinal defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*, 1999, 286, 113-117.
- Zoetendal E. G., Cheng B., Koike S. & Mackie R. I., Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2004, 5, 31-47.
- Zoetendal, E.G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A. D. & de Vos W. M., Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 3401-3407.