

Les défis du microbiote

Patrice Debré

Département d'Immunologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, CIMI Paris, UPMC/ Inserm, U1135, Bâtiment CERV1, 4^{ème} étage, 83 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

Auteur correspondant : Patrice Debré, patrice.debre@aphp.fr

Reçu le 24 mars 2017

Résumé – Le microbiote désigne les diverses flores des microbes commensaux des espèces vivantes. Les recherches portant principalement chez l'homme sur le microbiote intestinal, nous nous limiterons à sa description et rôle en physiologie et pathologie. Le microbiote intestinal intervient de fait sur la digestion et le système immunitaire. Il semble responsable, au moins pour une part, de l'obésité, de cancers digestifs, de certaines pathologies auto-immunes et allergiques, et de pathologies du système nerveux. Le rôle des probiotiques, prébiotiques, xénobiotiques et des transplantations de selles sera discuté.

Mots clés : Microbiote / symbiose / pathologie

Abstract – Challenges set by the microbiota.

The microbiota designates the various flora of commensal microbes of living species. Most research in human focusing mainly on the intestinal microbiota, we will limit ourselves to its description and role in physiology and pathology. The intestinal microbiota acts on digestion and the immune system. It seems responsible, at least in part, for obesity, digestive cancers, several autoimmune and allergic pathologies, and pathologies of the nervous system. The role of prebiotics, probiotics, xenobiotics and stool transplantations will be discussed.

Key words: Microbiota / symbiosis / pathology

Le terme microbiote désigne l'ensemble des bactéries qui habitent l'homme et cohabitent avec lui, et ce, quelle que soit leur localisation anatomique, sur la peau, dans le conduit auditif, les bronches, la cavité vaginale, etc. . . (Debré, 2014). Les recherches sur ces bactéries ont cependant essentiellement porté sur le microbiote intestinal parce que c'est dans le tube digestif qu'elles sont en plus grand nombre, mais aussi parce c'est là que leur influence sur la physiologie de l'organisme semble déterminante.

Il y a 100 milliards de bactéries dans 1 g de selles, autant que de cellules qui constituent notre cerveau, même si les neurones sont de plus grande taille. Entre la bouche et l'anus, sur une surface considérable de près de 400 m², plusieurs centaines de milliards de bactéries cohabitent, sans compter les virus et les champignons. Les microbes qui habitent l'homme ont ainsi fait la conquête d'un autre environnement. Les

effets heureux de la sélection naturelle ont sans doute aussi apporté leur contribution à l'humanité en passant du parasitisme agressif à la symbiose. Hommes, animaux, ou plantes abritent depuis leur apparition sur terre des virus, bactéries ou champignons qui leur préexistaient et dont ils assurent de manière asymétrique l'habitat, la nourriture, parfois la défense. Au fur et à mesure de l'évolution, l'inverse s'est pourtant produit. L'hôte exige la réciprocité. On passe alors à un état de mutualisme ou de symbiose, forme sans doute la plus aboutie de la coévolution.

Les territoires du microbiote digestif

La bouche héberge plus de 320 espèces différentes de bactéries commensales, réparties entre la salive, les lèvres, les joues, le palais, la langue, les dents et la

gencive. Plusieurs millions de germes sont présents par millilitres de salive. Des espèces peuvent encore être découvertes : en 2008, faisant le recensement des bactéries de la cavité buccale, des chercheurs britanniques ont isolé une espèce de bactéries inconnue baptisée *Prevotella histicola* pour sa capacité à ne vivre que dans les tissus (Downes *et al.*, 2008). Certaines espèces colonisent également la muqueuse œsophagienne et sont capables de produire une œsophagite. La plus célèbre des bactéries qui prolifèrent dans cette région du corps est indiscutablement *Helicobacter pylori*. Découvert en 1875 par des scientifiques allemands (http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori), ce germe qui ne peut être cultivé sur des milieux usuels fut longtemps ignoré par les microbiologistes. Outre l'œsophage, il infecte surtout la muqueuse gastrique. L'estomac est un milieu très hostile pour les bactéries : lors de la digestion se déversent des sécrétions acides et des enzymes, substances toxiques pour les proliférations bactériennes. À des taux d'acidité aussi bas, la plupart des microbes ne survivent pas. La présence d'aliments crée cependant des conditions plus favorables, si bien que le nombre de germes dépend aussi indirectement des repas. *Helicobacter pylori* est la seule bactérie capable de survivre dans un environnement aussi acide. L'enveloppe hélicoïdale pourrait y aider car elle lui permet de coloniser le mucus de la paroi stomacale et d'y persister. Près de la moitié des êtres humains possèdent cette bactérie implantée dans leur estomac mais ce taux varie fortement en fonction des pays, de l'alimentation ou encore de l'âge. La forme en hélice n'est pas la seule propriété d'*Helicobacter* adaptée à cet environnement inhospitalier. Elle peut produire son énergie à partir de l'hydrogène disponible dans l'estomac où l'acidité facilite la sécrétion d'une enzyme produisant de l'ammoniac (NH₃). Si l'on poursuit l'étude des bactéries du tube digestif, dans la dernière partie de l'intestin grêle, l'iléon, vit une population plus importante de microbes, de l'ordre de 100×10^6 bactéries par gramme de matière, qui fait de ces dernières la part essentielle de ce qu'on peut y trouver. La flore y est cependant assez mal définie car son examen nécessite des prélèvements par chirurgie ou intubation, mais sa diversité est proche de celle observée dans les selles. Dans le côlon, la diversité et le nombre des bactéries sont considérables, mille fois supérieurs à leur concentration dans l'iléon. La moitié de la matière qui constitue les selles correspond à des bactéries. Seules subsistent les anaérobies strictes. Ainsi les bactéries *Escherichia coli* qui se sont ainsi adaptées à la vie sans oxygène y prolifèrent.

Le microbiote est unique à chacun de nous, même s'il comporte une grande diversité (Qin *et al.*, 2010; Lagier *et al.*, 2012). Deux grands groupes bactériens dominant : les Firmicutes et les Bactéroïdes. Ces

deux grandes populations correspondent à plus de 80 % des bactéries de notre intestin. Pourtant, elles divergent presque autant que les règnes animal et végétal. Les Firmicutes (*finus curtus*) représentent une espèce qui comprend des germes très courants et connus comme le staphylocoque ou le streptocoque. D'autres, comme le *Lactobacillus bulgaris* sont moins connus. Les Bactéroïdes représentent le groupe le plus important de bacilles Gram négatif. Ils sont essentiellement anaérobies. La bile exerce une action favorable sur leur croissance. Alors que la plupart des bactéries anaérobies sont sensibles à la pénicilline, celles-ci y sont résistantes. Pour beaucoup, le rapport firmicute/bactéroïde pourrait avoir un sens, leur proportion variant entre les individus en bonne santé et certains obèses. Si plus de deux cent cinquante espèces ont ainsi été identifiées dans ces deux phylums majeurs, il existe de nombreuses autres bactéries dans la microflore. Elles appartiennent majoritairement à deux autres groupes : les Actinobacteria et les Proteobacteria, parmi lesquelles des bactéries réductrices de soufre. Mais on trouve aussi des archéobactéries. Si elles sont les mieux connues, les bactéries ne sont pas les seules, il y a aussi des champignons.

Les deux tiers des espèces intestinales dominantes qu'héberge chaque individu adulte, lui sont totalement spécifiques, le tiers restant étant plus ou moins partagé selon les individus. Bien entendu, cet équilibre dépend de l'alimentation, de la prise d'antibiotique, de l'hygiène (Cotillard *et al.*, 2013). Chez un même individu, les grands équilibres entre espèces varient cependant peu, malgré les éventuelles modifications de régime alimentaire. Une étude récente a montré l'existence de groupes de bactéries similaires chez l'Homme et le chimpanzé, suggérant qu'ils pourraient être issus de la coévolution de l'hôte et de son microbiote (Ochman *et al.*, 2010).

La flore intestinale reste difficile à étudier. Il faut en effet la prélever. Aussi se réfère-t-on plus facilement au microbiote fécal que cœcal, malgré les différences entre les deux. Il y a quelques années, l'analyse ne pouvait être fondée que sur les techniques de culture qui, selon leur composition, permettaient une sélection par genre ou espèce, ou au contraire leur prolifération en masse. Aux critères de forme phénotypique et de caractérisation du métabolisme bactérien, sont venues s'adjoindre aujourd'hui les données de la génomique qui ont permis l'analyse simultanée de l'ensemble des populations microbiennes, la métagénomique. Avec cette approche globale est apparue la notion de "superorganisme". Des programmes métagénomiques internationaux, dans lesquels la France et l'Europe ont leur importance, ont ainsi cherché à définir la flore qui caractérise les individus et, par là-même, à les comparer (*The human microbiome project*

consortium, 2012a, 2012b). La métagénomique fait aujourd'hui référence.

Né stérile, sa condition *in utero*, le nouveau-né se trouve propulsé dans un univers microbien riche et varié, celui de sa mère. De manière étonnante cependant, malgré l'extraordinaire diversité des microbes maternels, il est colonisé de façon rapide et massive par un microbiote relativement simple (Chow *et al.*, 2010; Butel, 2014). Les bactéries qui s'implantent sont des bactéries aérobies facultatives. En quelques jours de prolifération, ces bactéries qui prolifèrent dans les conditions du tube digestif ont consommé tout l'oxygène présent, changé considérablement l'écosystème et le potentiel redox. Un nouvel environnement sans oxygène s'établit alors et avec lui la sélection par le milieu intestinal d'une nouvelle vague de bactéries. Les microbes qui colonisent l'intestin, en seconde intention, appartiennent à un nouveau genre, ce sont des bifides, les bactéries semblent essentiellement transmises par le microbiote vaginal et fécal. Certaines souches semblent mieux adaptées que d'autres, elles sont sélectionnées sur leur capacité d'adhésion au mucus.

D'autres éléments influencent encore l'implantation et la composition de la flore intestinale : le mode d'accouchement, l'environnement, le type de l'alimentation, l'âge à la naissance et l'antibiothérapie. Lors d'une naissance par césarienne, le développement du microbiote diffère selon les conditions variables d'hygiène du lieu d'accouchement. Lorsque celles-ci sont strictes, la colonisation dépend de l'environnement et du personnel soignant. L'implantation diffère alors des accouchements par voie basse. L'allaitement favorise l'implantation des bifides plus précocement que chez les nouveau-nés nourris avec des préparations de lait de vache. Plus de cent trente molécules de sucres différents composent en effet le lait maternel, outre le lactose. Ces composés varient en fonction de l'alimentation, de la période de lactation, du moment de la journée, du terme de l'accouchement ou encore des gènes de la mère. Les qualités biologiques du lait diffèrent ainsi d'une femme à l'autre et ont une influence sur l'implantation du microbiote. Le lait de vache ne contenant pas de facteur bifide, les enfants qui en sont nourris présentent un retard d'implantation de la flore bleue.

Les fonctions du microbiote

Le microbiote permet la digestion de l'amidon et des sucres complexes des fibres alimentaires (Delzenne & Cani, 2008; El Kaouatari *et al.*, 2014).

Une part importante de l'amidon se déverse ainsi dans le côlon sans avoir été préalablement transformée. Cette portion, qu'on appelle « amidon

résistant », sert à la prolifération des bactéries, qui transforment les aliments amidonnés et permettent leur absorption. Les fibres alimentaires se déversent dans le gros intestin où elles se trouvent confrontées à de très nombreuses enzymes bactériennes différentes capables de détruire tous les sucres des grains, tubercules, rhizomes, fruits. Les bactéries ne s'attaquent cependant pas qu'aux sucres alimentaires, elles digèrent aussi le mucus. Sans bactéries, le mucus, qui est continuellement sécrété et jusqu'à des quantités considérables, entraînerait une distension colique comme on l'a observé dans les souris axéniques ou chez les hommes qui vivent sans germe. La dégradation par le microbiote des protéines présentes dans le côlon génère de nombreuses substances métaboliques potentiellement toxiques pour l'hôte. Elles sont dégradées en peptides, qui sont la principale source azotée du gros intestin. Cette hydrolyse est indispensable aux bactéries dont la prolifération requiert des hydrates de carbone et de l'azote. Si la structure, la solubilité, le temps de transit jouent dans cette décomposition, l'essentiel provient d'enzymes bactériennes, les protéases, actives dans la partie distale du côlon où l'acidité est la plus forte. Les peptides par eux-mêmes ont un rôle important sur la biodiversité du microbiote colique. Outre la production d'acides gras correspondant à la fermentation des acides aminés, un des principaux corps produits par cette transformation est l'ammoniac. Absorbée par la muqueuse colique, l'ammoniac est transportée vers le foie où elle est transformée en urée, puis éliminée dans les urines. La production est cependant faible et sans effet notable sur la santé dans les régimes alimentaires équilibrés. Les lipides qui parviennent dans le côlon sont très divers. Le microbiote peut également les utiliser ou les transformer. Certaines bactéries agissent sur le cholestérol en le transformant en un composé qui ne peut être absorbé et qui est éliminé dans les selles, jouant ainsi un rôle dans la régulation de son métabolisme. Une part importante des sels biliaires produits à partir du cholestérol parviennent également jusqu'au côlon où elle est métabolisée par les bactéries. Les bactéries du microbiote sont de plus une source importante de vitamines, parmi lesquels les vitamines K, B12, mais aussi B1, 2, 6 et 9.

Les microbes commensaux ont une action majeure sur l'activation et la différenciation lymphoïdes. Ils induisent un faible niveau d'activation du système d'inflammation « physiologique », autorisant leur tolérance, tandis qu'un pathogène conduit à une réaction d'une toute autre ampleur. Les microorganismes établissent une continuité entre ces deux extrêmes : commensaux et pathogènes se différencient par leur capacité à moduler la réponse immunitaire de l'hôte. Mieux encore, les bactéries résidentes éduquent le système immunitaire, l'entraînent à lutter contre les

germes délétères. La plupart des connaissances sur ce sujet proviennent des études comparatives entre les animaux axéniques dépourvus de microbiote et leurs congénères élevés dans les conditions classiques des animaleries de laboratoire. Les rongeurs maintenus en milieu stérile présentent une raréfaction des structures lymphoïdes enchâssées dans la muqueuse de la partie terminale de l'intestin grêle, les plaques de Peyer. La réponse immunitaire intestinale mobilise ces formations de lymphocytes B et T. Leur développement anormal s'accompagne d'un déficit de l'épithélium digestif en lymphocytes. La rate et les ganglions lymphatiques disséminés dans tout le corps présentent également des anomalies architecturales et des zones lymphocytaires atrophiées, immatures. L'absence de stimulation par les commensaux est donc à l'origine d'une atrophie des organes lymphatiques secondaires qui dépasse la sphère digestive, affecte l'ensemble des zones lymphoïdes et perturbe l'homéostasie immunitaire de l'organisme dans sa globalité, notamment du fait d'une carence en lymphocytes matures. En plus de leur quantité, le microbiote préserve l'équilibre qualitatif des cellules de l'immunité. Certaines populations bactériennes favorisent la production de lymphocytes T dits Th17 (Ivanov *et al.*, 2009), qui ont un rôle important dans l'organisation de la réponse immune protectrice, tandis que d'autres bactéries stimulent les lymphocytes T régulateurs qui inhibent cette réponse (Round & Mazmanian, 2010). Les commensaux participent ainsi à l'équilibre entre tolérance et rejet, ils maintiennent le système immunitaire entre action et inhibition. L'ensemble de ces anomalies disparaît en quelques semaines lorsque les animaux sont colonisés par une flore microbienne usuelle. Chez les individus normaux, la colonisation stimule la production de peptides antimicrobiens et d'anticorps IgA sécrétoires qui, en retour, contiennent le microbiote dans la lumière intestinale et neutralisent les germes pathogènes étrangers. Pour être tolérées, les bactéries résidentes, qui bénéficient de l'environnement des muqueuses ou de la peau, ont plusieurs moyens qui leur permettent d'éviter l'agressivité du système immunitaire à leur égard. Dans certains cas, les bactéries parviennent à désensibiliser les récepteurs *Toll* qui les surveillent. Un autre mécanisme de cette tolérance de l'hôte pour le microbe a été élucidé dans le cas de *Bacteroides fragilis*, espèce cultivable du microbiote. Cette bactérie possède une substance dans sa paroi qui induit la production de lymphocytes T régulateurs. D'autres exemples d'interaction entre bactéries et système immunitaire, qui favorisent la tolérance des premières et le développement du second pour mieux lutter contre les germes étrangers, concernent les bactéries filamenteuses, résidents usuels de nos intestins (Talham *et al.*, 1999). Les animaux qui manquent de telles bactéries ont une réponse immune

plus faible, notamment en anticorps IgA, et présentent peu de lymphocytes dans l'intestin. Leur microbiote ne les protège pas des germes invasifs, un état aggravé par le traitement antibiotique. Ce phénomène est peut être dû aux exceptionnelles capacités d'adhérence qu'ont les bactéries filamenteuses vis-à-vis des cellules épithéliales, une qualité qui explique sans doute leur constante présence, chez les arthropodes aussi bien que chez les mammifères les plus évolués, homme compris. Le microbiote n'a donc pas qu'une mission locale de maintien de l'équilibre entre les cellules immunes de l'intestin et les bactéries qui y prolifèrent. Il joue un rôle plus important pour l'homéostasie du système immunitaire.

Les pathologies liées au microbiote

Le microbiote tient aujourd'hui une bonne place parmi les éléments qui favorisent la surcharge pondérale. Car la flore intestinale est particulière chez les sujets obèses. Elle y est globalement moins diversifiée, avec une augmentation des Firmicutes et une diminution des Bactéroïdes (Angelakis *et al.*, 2012). Si on examine attentivement le spectre des gènes microbiens par étude métagénomique, l'analyse du microbiote des patients obèses révèle certaines spécificités (Devaraj *et al.*, 2013; Le Chatelier *et al.*, 2013). Ce microbiote se caractérise par une prévalence élevée de cinq populations de bactéries qui ne varient pas qu'en nombre. Ces bactéries ont des fonctions particulières capables d'induire diverses manifestations pathologiques. La moindre diversité génétique des souches est associée à une résistance à l'insuline, qui peut conduire au diabète, à une anomalie des lipides, et à un syndrome inflammatoire, que signe une série de biomarqueurs dosés dans le sang. Dans le tissu adipeux, se nichent des cellules immunitaires et des germes, ou tout au moins leur ADN. Ces cellules immunitaires ne sont pas en repos, elles sécrètent elles aussi des médiateurs inflammatoires ou des facteurs néocrosants qui facilitent la migration d'autres leucocytes. D'autres éléments rattachent le microbiote à l'obésité. Ainsi le transfert de flore intestinale de souris obèses à leurs congénères non obèses induit une prise de poids importante chez les souris nouvellement colonisées. Si l'on met dans une même cage deux races de souris, les unes obèses, les autres non, les secondes deviennent aussi obèses que les premières. Reste à comprendre les étapes de cette transformation, le rôle des bactéries, et celui de l'inflammation du système immunitaire qu'elles stimulent. Si l'on examine le sang de souris obèses dont la flore paraît déséquilibrée au profit des Firmicutes, on trouve une augmentation d'éléments bactériens dont des toxines pyrogènes, parmi lesquelles le LPS (lipopolysaccharide), qui entre dans la composition des sucres

intégrés aux parois bactériennes. C'est en se liant à la surface des récepteurs *Toll* que le LPS déclenche une réaction inflammatoire. Il a ainsi été montré que les souris, dont les gènes codant pour ce récepteur ont été inactivés, ne développent ni obésité ni diabète sous l'influence d'un régime gras. Inversement, la perfusion continue de LPS induit une toxémie et génère une infiltration importante du tissu adipeux par les macrophages, une prise de poids, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et le stockage des lipides dans le foie, toutes manifestations favorisant l'obésité et le diabète. Certaines bactéries semblent, à l'inverse, favoriser la perte de poids. Il faut en voir pour preuve une expérience rapportée en novembre 2014 dans la prestigieuse revue *Cell* (Goodrich *et al.*, 2014). Étudiant les selles de 416 paires de jumeaux, les chercheurs montraient que la diversité du microbiote dépend de facteurs génétiques, mais aussi qu'une bactérie particulière est associée à la maigreur.

Le microbiote semble jouer également un rôle dans les cancers coliques. On constate en effet une modification importante des populations de bactéries dans les selles des patients cancéreux : augmentation des anaérobies, notamment du groupe des Bactéroïdes *petronella*, avec production de toxines inflammatoires et, parallèlement, diminution du nombre des Firmicutes. Ces modifications ne se retrouvent pas que dans les selles, elles existent aussi au contact de la tumeur où les germes anaérobies prolifèrent. Elles s'accompagnent d'une diminution de la production de butyrate, métabolite d'importance car les acides gras à chaîne courte produits par la fermentation des sucres sont presque entièrement métabolisés par les cellules du côlon. La fermentation des sucres représente le principal substrat énergétique de l'épithélium intestinal et, de plus, a un effet trophique sur le biofilm bactérien. Molécule essentielle pour les entérocytes, le butyrate module de nombreux gènes et leur réponse à leur environnement. De ce fait, l'intégrité de la muqueuse intestinale, son renouvellement au fil du temps, sa production de mucus, ses mouvements d'haustration (plissement) dépendent en grande partie de la flore colique. Les toxines de bactéries des pays pauvres mettent au repos la multiplication des cellules intestinales. En supprimant le premier biofilm de bactéries commensales et protectrices, on laisse la place à des microorganismes qui, insuffisamment contrôlés par la réponse immunitaire, suscitent une multiplication désordonnée des cellules intestinales jusqu'à les rendre cancéreuses. Ce mécanisme, à la fois simple et complexe, peut être résumé et reproduit dans des modèles de souris. Il suffit d'introduire une modification du biotope pour induire des cassures chromosomiques dans les cellules intestinales et passer d'un stade purement inflammatoire, une altération bénigne, à la genèse du cancer. Il existe d'autres formes de cancer dont

l'apparition, bien que liée au microbiote, semble passer par un processus différent. C'est le cas du cancer hépatique. La stéatose, qui s'observe chez 20 à 30 % des individus, même en l'absence de toute prise alcoolique, passe de 50 à 90 % chez les obèses. Or, dans les cas de surcharge hépatique en graisse, le microbiote a une composition très différente de celle observée chez les sujets sains, qui se traduit en particulier par une sur-représentation de bactéries Gram⁻ (Faivre *et al.*, 2013; Schnabl & Brenner, 2014). Dans ces cas, les macrophages hépatiques, activés par les LPS bactériens, sécrètent des substances qui induisent une prolifération des hépatocytes. De plus, le transfert du microbiote intestinal de souris non obèses à des souris obèses supprime ou diminue la stéatose hépatique.

Il est depuis longtemps admis qu'il existe un axe cerveau-intestin. Le cerveau influence les capacités motrices, sensibles et sécrétoires dans l'intestin. Nous devons au cerveau le péristaltisme intestinal qui assure la progression des aliments, mais aussi du microbiote, par la motilité qu'il instille à travers deux cents millions de neurones, soit mille fois moins que le cerveau lui-même, mais autant que le cortex d'un chien ou d'un chat. Quatre-vingt quinze pour cent de la sérotonine, un des médiateurs du système nerveux qui participe à la gestion de nos émotions, est sécrétée par l'intestin (Landry & Gies, 2009). Les sécrétions bactériennes peuvent influencer le cerveau en produisant des neurotransmetteurs. Le nerf vague transmet directement des informations des viscères à l'hypothalamus, structure profonde du cerveau essentielle dans les comportements émotionnels, et à l'amygdale, une zone cérébrale qui coordonne des activités végétatives et sensibles. Tous ces éléments donnent ainsi du poids à une série d'expériences qui, depuis quelques années, relient le microbiote au comportement. Ainsi, des souris qui naissent par césarienne, et ne possèdent pas les microbes qui vivent normalement dans le vagin ou le rectum maternel, semblent plus anxieuses que leurs congénères qui accouchent par voie basse (Collins *et al.*, 2012). D'autres données viennent des traitements par antibiotiques. Ceux-ci induisent chez la souris adulte des perturbations dans les populations bactériennes du côlon associées à un comportement de stress, en même temps qu'une élévation d'une protéine impliquée dans la croissance des neurones, la stimulation de l'hypothalamus et dans celle l'amygdale. De telles anomalies cèdent à l'arrêt des antibiotiques. L'inverse semble également vrai : le cerveau a un impact sur la composition du microbiote. En utilisant un modèle de dépression par ablation du bulbe olfactif, une manœuvre qui rend les souris anxieuses et très sensibles au stress, les chercheurs ont observé une altération du microbiote ainsi que l'arrêt de la production d'un neurotransmetteur libéré par l'hypothalamus. L'injection directe de ce neuromédiateur

a pour conséquence de perturber la flore intestinale. De meilleures preuves viennent de la transplantation fécale croisée de rats ou de souris d'humeurs différentes. Deux souches de souris qui possèdent des habitudes comportementales distinctes, peuvent échanger celles-ci par transplantation de leur microbiote. Des souris timides et anxieuses qui réagissent fortement au stress, deviennent de véritables exploratrices, et *vice-versa*. Un rapprochement est sans doute fait un peu rapidement avec certaines pathologies, dont le syndrome de l'intestin irritable qui s'accompagne fréquemment de troubles psychologiques, de douleurs abdominales récurrentes, et d'une flore différente de celle des sujets sains (Hemarajata & Versalovic, 2013). Le microbiote est également mis en cause chez des enfants présentant des douleurs abdominales périodiques, ou encore dans l'autisme (Borre *et al.*, 2014). Ce fait s'appuie sur des modèles de souris qui reproduisent, ou plutôt imitent, les symptômes de cette pathologie.

La théorie hygiéniste stipule que l'excès d'hygiène et d'antibiotiques a favorisé l'essor de maladies allergiques, auto-immunes, et inflammatoires. Cette hypothèse hygiéniste vient d'une observation publiée en 1989 dans le *British Medical Journal* (Strachan, 1989). On remarqua que dans les familles nombreuses, rhumes de foin et eczéma frappaient plus souvent les aînés, moins exposés que leurs cadets aux infections et aux défauts d'hygiène. Ceci suggérait que l'exposition en bas âge aux microbes était nécessaire à l'éducation du système immunitaire. Cette idée fut confortée par le fait que souvent les enfants de milieux ruraux au contact avec une grande variété de microbes, risquent moins de devenir asthmatiques et allergiques. Or, les quatre ou cinq dernières décennies ont été marquées dans les pays qui ont adopté des normes exigeantes d'hygiène par une diminution considérable des maladies infectieuses telles que l'hépatite, la tuberculose, la rougeole, ou le rhumatisme streptococcique. Simultanément, on a assisté à une augmentation spectaculaire des affections de nature allergique ou dys-immunitaire, telles que les maladies inflammatoires du côlon, parmi lesquelles la maladie de Crohn, le diabète insulino-dépendant de type I ou la sclérose en plaques. L'image en miroir, que montrent les courbes d'évolution de ces pathologies, est à la base de théories qui établissent un lien, au moins épidémiologique, entre ces deux types d'affections (Bach, 2002, 2008). Au-delà du simple constat, elles posent la question de l'influence de l'hygiène sur le microbiote, qui pourrait ainsi être indirectement responsable. La fréquence de ces maladies suit un gradient décroissant en partant des pays du nord vers ceux du sud. Celui-ci est clairement visible en Europe Occidentale pour le diabète insulino-dépendant et la sclérose en plaques. Leur incidence est plus élevée dans les pays scandinaves

que dans la péninsule ibérique. De telles différences apparaissent également entre l'Europe et l'Afrique ou entre l'Afrique du Nord et le sud du continent. Certes des facteurs génétiques ou éthiques doivent être pris en compte, mais leur contribution apparaît plus faible que les facteurs environnementaux, comme le montrent notamment les différences entre le risque de populations émigrées, comparé à celui de leur pays d'origine. Ainsi peut-on observer une incidence dix fois supérieure du diabète chez des enfants pakistanais vivant au Royaume-Uni comparés à ceux du Pakistan. De même, le lupus érythémateux, très rare en Afrique de l'Ouest, est fréquent chez les Noirs américains, qui sont exposés à un environnement différent de celui du sud du Sahara. D'autres observations vont dans le même sens, en montrant qu'un enfant scolarisé tôt ou vivant dans une famille nombreuse, risque moins de développer un asthme, une infection atopique ou encore un diabète, que les enfants tenus à l'écart de collectivité ou sans fratrie (Nover & Huffnagle, 2005). Ces théories ont suscité une série de recherches visant à prouver que le microbiote, par son effet immunomodulateur, pourrait, s'il était modifié par l'hygiène ou les antibiotiques, être à l'origine de l'augmentation de fréquence d'un certain nombre de pathologies dys-immunitaires.

De manière identique, les hypothèses sur le rôle du microbiote dans l'apparition des maladies allergiques, asthme et rhume des foins en tête, s'appuient sur plusieurs séries d'observations.

D'abord il a été remarqué qu'il existe des différences de composition de la flore intestinale chez les enfants qui développent des maladies allergiques, comparés à ceux qui en sont indemnes. Il a en effet été montré qu'une diminution notable de la fréquence des lactobacilles et bifidobactéries précède l'apparition de l'allergie (Nover & Huffnagle, 2005; Sjoren *et al.*, 2009). Fort de cette observation, un traitement du microbiote par apport de prébiotiques et probiotiques a été proposé chez des enfants à hauts risques allergiques. Une étude récente montre que l'apport de probiotiques pendant six mois, chez des bébés nés par césarienne, peut réduire l'incidence de l'eczéma et de l'allergie alimentaire. Cet effet n'est pas observé, ou seulement à titre transitoire, chez les enfants nés par voie vaginale. Cette différence était cependant significative à l'âge de deux ans, mais plus à cinq ans. De plus, le lien de cause à effet reste encore à démontrer. Ainsi, un groupe de chercheurs a publié qu'un traitement antibiotique qui modifie la flore intestinale pouvait induire une susceptibilité à l'asthme (Nover *et al.*, 2005; Cerf-Bensussan & Caboriau-Routhiau *et al.*, 2010). L'année suivante, des scientifiques chinois ont mis en évidence dans les poumons de patients asthmatiques, une catégorie de cellules immunitaires nécessaire au déclenchement de l'asthme. Dans ces cas,

les cellules iNKT semblent en cause. Elles ont la propriété de reconnaître les glycolipides, molécules aussi bien présentes dans le pollen que dans les bactéries. Plus récemment, une équipe nord-américaine a montré l'existence d'un lien entre les modifications du microbiote et l'augmentation excessive de ces cellules chez les asthmatiques. Les souris axéniques, dépourvues de flore intestinale, présentent d'importantes quantités de cellules iNKT dans le côlon et les poumons. Or ces animaux s'avèrent très susceptibles à l'asthme allergique et à l'inflammation du côlon.

Concernant les maladies auto-immunes, un certain nombre de travaux suggèrent le rôle du microbiote dans la polyarthrite rhumatoïde et le diabète. Dans des modèles expérimentaux de souris qui développent spontanément un diabète de type 2, les femelles ont dix fois plus de risque d'être atteintes que les mâles. Or la composition du microbiote des mâles n'est pas la même que celle des femelles, et ces différences disparaissent après castration. La colonisation des souris femelles par les lignages bactériens des mâles protège contre le diabète. De même, chez les souris axéniques qui développent un diabète par mutation du gène *Nod*, la repopulation par un consortium microbien provenant d'individus non diabétiques atténue la survenue du diabète. Une proportion importante de lymphocytes T régulateurs se développe sous l'effet de la flore intestinale, qui apparaît déterminante dans le développement d'un système immunitaire équilibré. De plus, ces cellules T régulatrices diminuent les réactions inflammatoires, notamment celles induites par les cellules iNKT.

Si tout n'est pas encore ainsi élucidé, loin de là, il n'en ressort pas moins que les anomalies du microbiote semblent induire ou favoriser nombre de processus auto-immuns. Il est possible de comprendre dans ces cas comment des mesures hygiéniques trop strictes ou la prise trop prolongée d'antibiotiques, peuvent prédisposer à de telles maladies. Ces conditions rendent également compte de l'effet génétique observé quand il agit sur les cellules immunitaires qui régulent ou sont elles-mêmes régulées par la présence du microbiote.

Les modulateurs du microbiote

Probiotiques, prébiotiques, xénobiotiques, transplantations fécales, sont autant de moyens pour modifier notre microbiote.

Il existe plusieurs types de probiotiques qui se distinguent et se concurrencent, par leurs bienfaits sur la santé et plus spécialement, leurs performances intestinales (O'Toole & Cooney, 2008 ; Derrien & van Hylckama, 2015).

Identifiées par genres, espèces, capacités d'adhésion, les bactéries et levures des probiotiques correspondent à plusieurs catégories de microbes. Les bacilles lactiques groupent aujourd'hui plus de 50 espèces de Lactobacilles. Ce sont, dans le monde des bactéries, les germes les plus fréquemment appliqués pour la fermentation des produits animaux et végétaux. Certaines espèces sont de vrais commensaux tandis que d'autres semblent faire partie d'un microbiome transitoire. Leurs performances, si tant est qu'on puisse les comparer, sont liées à la conversion de sucre en acide lactique, voire en un mélange d'acides lactiques. Les Bifidobactéries, qui regroupent une trentaine d'espèces et se retrouvent chez les enfants nourris au sein, sont utilisées en probiotiques. Les levures *Saccharomyces boulardii*, particulièrement résistantes à l'oxygène, sont parmi les souches alimentaires les plus diffusées. L'efficacité cependant est à rechercher dans l'action du probiotique contre un envahisseur pathogène. Il existe trois manières pour le probiotique d'être actif. La première est de stimuler la production d'acide butyrique précédemment décrit comme un des premiers facteurs trophiques pour l'épithélium intestinal tout en augmentant la présence de Lactobacilles et Bifides. Le second est de modifier suffisamment l'environnement physique ou chimique pour intervenir sur la diversité du microbiote et favoriser ainsi la prolifération de germes commensaux. De nombreux probiotiques modulent la quantité des sels biliaires ou produisent des vitamines, voire d'autres facteurs utiles à la prolifération des bactéries du microbiote naturel. Le troisième enfin est la capacité de stimuler les défenses immunitaires, IgA notamment, peptides entéro-microbiens, ou encore d'augmenter la sécrétion de mucus. La plupart des études cliniques, qui ne se sont pas contentées de compter les bactéries dans les selles, ont évalué l'effet des probiotiques sur le microbiote. Elles ont été menées le plus souvent chez des enfants, particulièrement des prématurés, bien que de nombreuses indications soient encore attendues chez l'adulte, et plus spécialement les sujets âgés. Certes, de multiples résultats démontrent que les probiotiques peuvent gagner l'intestin, survivre et se développer, même à titre transitoire, et accroître ainsi la diversité du microbiote. Mais il faut admettre que leur impact sur la santé est encore faible si on le compare à celui de l'alimentation ou des antibiotiques. La part de l'environnement, de la nourriture ou du régime sur l'effet observé reste difficile à quantifier. Une des questions essentielles, celle qui résume toutes les autres, est de savoir déterminer si les probiotiques ont un impact sur la santé de l'homme, et pas seulement sur l'écologie du microbiote. Cette preuve n'a pas encore été apportée, particulièrement au regard de la longue liste des maladies qu'une dysbiose du microbiote est supposée entraîner.

Les prébiotiques réduisent le nombre de pathogènes, une qualité attestée par l'incidence diminuée des diarrhées infectieuses et la moindre utilisation des antibiotiques. Il reste à en comprendre le mécanisme, qu'il s'agisse d'une redistribution de la colonisation des pathogènes par modification du biofilm, ou d'une stimulation des réponses innées et adaptatives du système immunitaire par les bactéries commensales. Mais cet impact direct sur le microbiote n'est pas le seul avantage conféré à l'hôte pour lutter contre les pathogènes. Les prébiotiques du lait humain sont par eux-mêmes capables de se lier à des récepteurs de cellules intestinales et d'empêcher ainsi bactéries et virus pathogènes de s'y fixer pour initier leur attaque de l'organisme. Les salmonelles, les vibrions du choléra, ou autres microbes dangereux colonisent en effet plus difficilement l'intestin en présence des sucres prébiotiques.

Ceux-ci possèdent d'ailleurs d'autres vertus. D'abord sur les bactéries du microbiote dont ils stimulent la production en boucle. Les produits de fermentation libérés par les bactéries bifides favorisent en effet leur propre prolifération et renforcent la colonisation de leur espèce. La fermentation elle-même obéit à ses propres règles. Elle se fait essentiellement dans le côlon proximal, de sorte que le taux des acides gras dans les selles dépend pour une part du temps de transit dans cette portion du tractus digestif. D'autres métabolites de l'organisme sont influencés par les prébiotiques. C'est le cas de la bilirubine, ce composé de l'hémoglobine des globules rouges, responsable de la jaunisse du nouveau-né et parfois de troubles neurologiques complexes. La fermentation a également une valeur énergétique, non seulement par l'apport simple en calories, mais par la production du butyrate et l'effet de ce dernier sur la muqueuse intestinale.

Outre leur action sur les pathogènes, les prébiotiques agissent sur le système immunitaire *via* leur action sur le microbiote. Ils induisent la production des anticorps IgA et agissent ainsi comme immuno-modulateurs, stimulateurs de l'immunité, d'où leur effet indirect, mais bénéfique, sur l'allergie et les infections de la petite enfance. Le mécanisme est sans doute subtil, il associe des effets sur la réponse inflammatoire ou anti-inflammatoire selon les conditions, la modulation des lymphocytes T régulateurs, ou encore des actions sur les récepteurs *Toll*. Autant d'activités qui s'entremêlent et induisent des effets additifs ou contradictoires dans lesquels les bifides pro-inflammatoires prennent certainement leur part. Reste, quels qu'en soient les mécanismes, que les prébiotiques peuvent agir à la fois sur la maturation, l'homéostasie et la régulation du système immunitaire.

Les xénobiotiques agissent sur la diversité de notre microbiote (Dethlefsen *et al.*, 2008). L'action

directe des antibiotiques sur la flore microbienne, qu'ils modifient ou détruisent selon les cas. Ici encore la métagénomique permet d'appréhender ces effets, comme cela a été étudié pour certains antibiotiques de la famille des fluoroquinolones. On observe trois à quatre jours après la prise du médicament un effet important et rapide sur le microbiote intestinal, avec perte de diversité bactérienne et redistribution des communautés microbiennes. Qu'ils soient à large spectre ou non, les antibiotiques déséquilibrent notre flore, et à travers ce phénomène, ont un impact indirect sur de nombreuses maladies, notamment sur l'obésité. À cet égard, la perturbation de la flore intestinale par des antibiotiques pris dans les premières semaines de la vie est très certainement à éviter (Eiseman *et al.*, 1958). Mais le processus peut se concevoir comme une boucle car les bactéries elles-mêmes peuvent agir sur les produits xénobiotiques qu'elles produisent. Selon le type de souches et d'espèces commensales, les populations bactériennes interfèrent les unes avec les autres en modulant la production de peptides antimicrobiens, ou encore de molécules du *quorum sensing* impliquées dans la communication bactérienne. Ces notions ouvrent un domaine de recherche sur la production et l'utilisation des xénobiotiques. Il peut s'agir de caractériser le microbiote après diverses utilisations ou prises de xénobiotiques, et surtout d'y avoir recours pour cibler sélectivement certaines niches bactériennes.

Les premières publications de l'utilisation de la transplantation fécale chez l'homme datent de 1958 (Eiseman, 1958). Eiseman et ses collaborateurs avaient réussi à guérir quatre patients atteints de colite sévère, sans toutefois en avoir diagnostiqué la cause. Vraisemblablement l'infection était due à une pullulation de *Clostridium difficile*, si l'on se réfère à la description d'enduits blanchâtres sur le côlon ainsi que les fausses membranes, caractéristiques de ce microorganisme. *Clostridium difficile*, qui représente l'indication majeure de ce type de traitement, est la principale bactérie responsable des diarrhées infectieuses, essentiellement en milieu hospitalier. Si le traitement fécal a pour principale indication l'infection bactérienne à *Clostridium difficile*, les relations de plus en plus évidentes entre les anomalies du microbiote, la perte de sa biodiversité, le déséquilibre de ses fonctions, et nombre de pathologies plaident en faveur de son utilisation dans d'autres maladies. Constipation chronique et recto-colique hémorragique ont fait l'objet d'essais avec ce type de traitement. L'avenir dira si le syndrome du côlon irritable, les maladies inflammatoires de l'intestin, les allergies, l'obésité, l'autisme ou l'anorexie mentale, tout autant que le diabète de type 1 ou d'autres affections auto-immunes pourront bénéficier de cette modalité d'utilisation du microbiote

humain, qui viendra alors s'ajouter à la panoplie des thérapeutiques déjà existantes.

Conclusion

Ainsi, une analyse rigoureuse des mécanismes moléculaires et cellulaires de la symbiose et celle des interactions entre bactéries commensales et pathogènes pourraient faire naître de nouveaux espoirs thérapeutiques pour des pathologies multiples. Une meilleure gestion de la flore intestinale, en favorisant les espèces bactériennes les plus aptes à métaboliser le bol alimentaire ou à lutter contre les membres les plus agressifs des populations commensales, devrait permettre de mieux contrôler nombre de maladies métaboliques, obésité, cancer, troubles du comportement ou pathologies inflammatoires. C'est là un nouveau paradigme en microbiologie, qui devrait intéresser toutes les sciences de la médecine et de la biologie, favoriser une approche pluridisciplinaire, associant la métagénomique aux sciences sociales, la culture cellulaire à l'immunologie, les maladies infectieuses à l'étude du métabolisme énergétique. Car l'étude de l'écologie microbienne doit concilier une approche environnementale, qui inclut les différents populations et territoires de l'organisme humain avec une exploration des niches endogènes.

Références

- Angelakis E., Armougom F., Million M., Raoult D. (2012) The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol*, 7, 91-109.
- Bach J.F. (2002) The effect of infections on susceptibility of autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, 347, 911-920.
- Bach J.F. (2008). Hygiène et affections dysimmunitaires : quel lien ? Institut Danone.
www.institutdanone.org/hygiene/dossier-hygiene-et-affections-dysimmunitaires, N°8
- Borre Y.E., O'Keeffe G.W., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F., (2014) Microbiota and neurodevelopmental windows : implications for brain disorders cell. *Trends Mol Med*, 20, 509-518.
- Butel M.J., (2014) Le microbiote intestinal du prématuré : ses caractéristiques, sa mise en place, ses facteurs d'influence. Séminaire GEN-IF / Guigoz 2014 – Gastroentérologie néonatale, Deauville, 17-18 novembre.
- Cerf-Bensussan, Caboriau-Routhiau V., (2010) The immune system and the gut microbiota friends or foes. *Nat Rev*, 10, 735-744,
- Chow J., Lee S.M., Shen Y., Khoshavi A., Mazmanian S.K., (2010) Host bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*, 107, 243-274
- Collins D.M., Surette M., Bercik P., (2012) The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol*, 10, 735-742.
- Cotillard A., Kennedy S.P., Chun Kong L., Prifti E., Pons N., Le Chatelier E., Almeida M., Quinquis B., Levenez F., Galleron N., Gougis S., Rizkalla S., Batto J.M., Renault P.; ANR MicroObes consortium, Doré J., Zucker J.D., Clément K., Ehrlich S.D. (2013) Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 500, 585-588.
- Debré P., (2014) L'homme microbiotique, Odile Jacob, Paris.
- Delzenne N.M., Cani P.D. (2008) Implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique. *Med Sci*, 24, 505-510.
- Derrien M., van Hylckama J., (2015) Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol*, 23, 354-366.
- Dethlefsen L., Huse S., Sogin M. L., Relman D. A. (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*, 6, e280.
- Devaraj S., Hemarajata P., Versalovic J., (2013) The human gut microbiome and body metabolism : implications for obesity and diabetes. *Clin Chem*, 59, 617-628.
- Downes J.L., Hooper S.J., Wilson M.J., Wade W.G. (2008) *Prevotella histicola* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 1788-1791.
- Eiseman B., Silen W., Bascom G.S., Kauwar A.J. (1958) Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*, 44, 854-859.
- El Kaoutari A., Armougom F., Raoult D., Henrissat B. (2014) Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *Med Sci*, 30, 259-265.
- Faivre J., Bréchet C., Moniaux N. (2013) Communication foie/tube digestif. Rôle du microbiote dans la carcinogénèse hépatique. *Med Sci*, 19, 954-956.
- Goodrich J.K., Waters J.L., Poole A.C., Sutter J.L., Koren O., Blekhman R., Beaumont M., Van Treuren W., Knight R., Bell J.T., Spector T.D., Clark A.G., Ley R.E. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159, 789-799.
- Hemarajata P., Versalovic J., (2013) Effects of probiotics on gut microbiota : mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation, *Therap Adv Gastroenterol*, 6, 139-151.
- Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K.C., Santee C.A., Lynch S.V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman D.R. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139, 485-498.
- Lagier J.C., Million M., Hugon P., Armougom F., Raoult D., (2012) Human gut microbiota : repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 1-19.
- Landry Y., Gies J.P., (2009) Pharmacologie des cibles vers l'indication thérapeutique, Dunod, Paris, (2e édition).
- Le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., Prifti E., Hildebrand F., Falony G., Almeida M., Arumugam M., Batto J.M.,

- Kennedy S., Leonard P., Li J., Burgdorf K., Grarup N., Jørgensen T., Brandslund I., Nielsen H.B., Juncker A.S., Bertalan M., Levenez F., Pons N., Rasmussen S., Sunagawa S., Tap J., Tims S., Zoetendal E.G., Brunak S., Clément K., Doré J., Kleerebezem M., Kristiansen K., Renault P., Sicheritz-Ponten T., de Vos W.M., Zucker J.D., Raes J., Hansen T.; MetaHIT consortium, Bork P., Wang J., Ehrlich S.D., Pedersen O. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500, 541-546.
- Nover M.C., Huffnagle G.B. (2005) The microflora hypothesis of allergic diseases. *Clin Exp Allergy*, 35, 1511-1520.
- Novert M., Falkowski C., McDonald N.R., McKenzie R.A., Huffnagle G.B., (2005) Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase : role of hist genetics, antigen, and interleukin 13. *Infect Immunol*, 73, 30-38
- Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C.-H., Ndjango, J.-B. N., Peeters, M., Hahn, B. H., Hugenholtz, P. (2010). Evolutionary Relationships of Wild Hominids Recapitulated by Gut Microbial Communities. *PLoS Biol*, 2010, 8, e1000546.
- O'Toole P.W., Cooney J.C., (2008) Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiote. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2008, 175285. doi : 10.1155/2008/175285. Published Online : June 20, 2014
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J.; MetaHIT Consortium, Bork P., Ehrlich S.D., Wang J. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59-65.
- Round J.L., Mazmanian S.K. (2010) Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Nat Acad Sci USA*, 107, 12204-12209.
- Schnabl B., Brenner DA. (2014) Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology*, 146, 1513-1524.
- Sjogren Y.M., Jenmaim M.C., Bottcher M.F., Bjorksten B., Sverremark-Ekstrom E., (2009) Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age *Clin Exp Allergy*, 39, 518-526.
- Strachan D.P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *Brit Med Journal*, 299, 1259-1260.
- Talham G.L., Jiang H.Q., Bos N.A., Cebra J.J. (1999) Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect Immun*, 67, 1992-2000
- The human microbiome project consortium. (2012a) A framework for human microbiome research. *Nature*, 486, 215-221.
- The human microbiome project consortium. (2012b) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, p.207-214.