

# Homéostasie de l'interface hôte-commensaux: furtivité ou tolérogénèse active ?

Leçon # 6:

Philippe Sansonetti  
Chaire de Microbiologie et Maladies Infectieuses



# Mécanismes de tolérance au microbiote intestinal

## Furtivité

- 1 - Faible reconnaissance des bactéries commensales numériquement dominantes (Bacteroidetes et Firmicutes) et Effet antiinflammatoire de certains commensaux.
- 2 - Maintien à distance des bactéries commensales (mucus, molécules antimicrobiennes, barrière épithéliale, ...)
- 3 - Diminution d'expression et/ou séquestration des TLR au niveau des cellules épithéliales intestinales

## Tolérognèse active

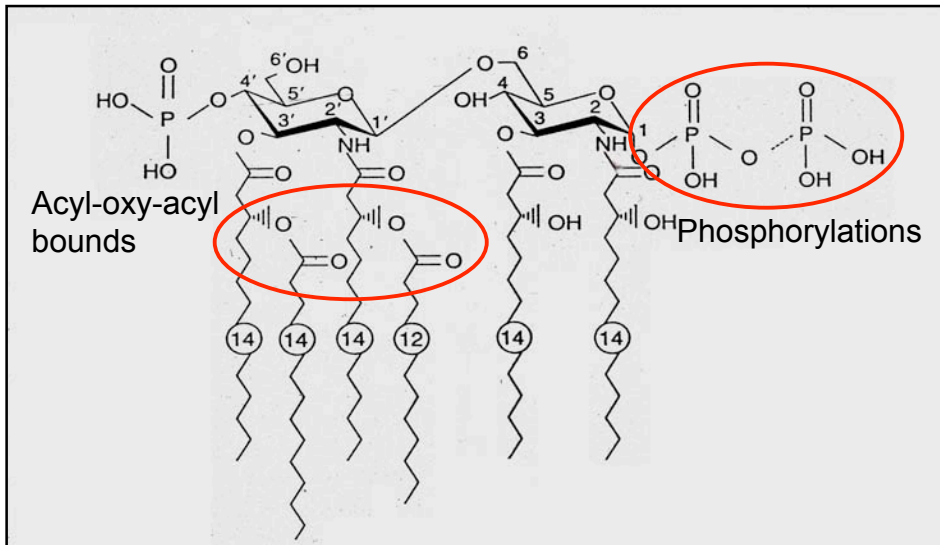
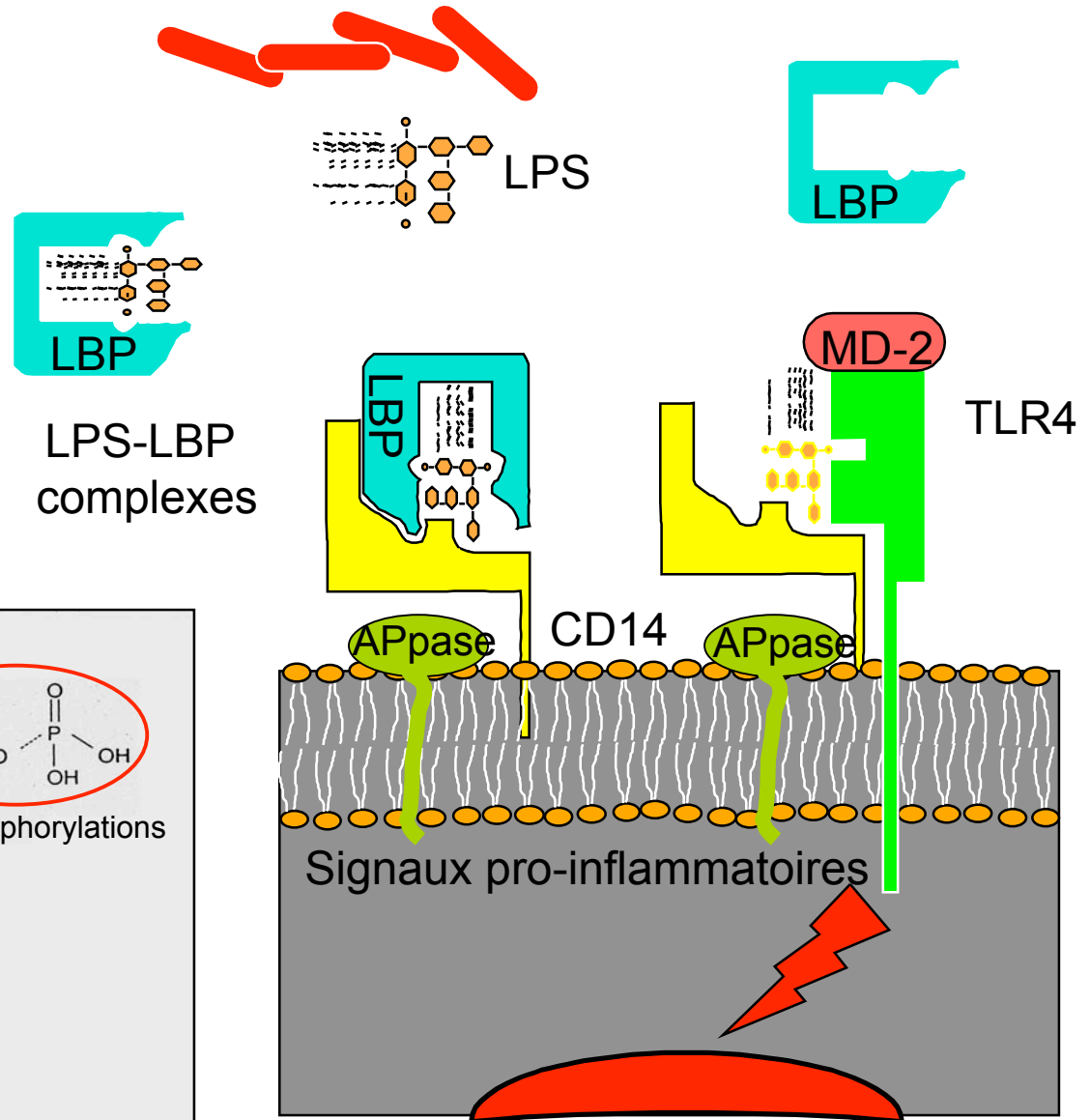
- 4 - Induction de la tolérance au LPS
- 5 - Production d'IgA et compartimentalisation de la réponse aux bactéries commensales
- 6 - Mécanismes de tolérognèse active (T reg)

1 - Le lipide A des BG- anaérobies commensaux (Bacteroidetes) sont habituellement pentacylés, donc faiblement agonistes, voire antagonistes sur TLR4, contrairement au lipide A hexacylé des BG- aéro-anaérobies commensaux et pathogènes (Munford & Varley, PLoS Path., 2006).

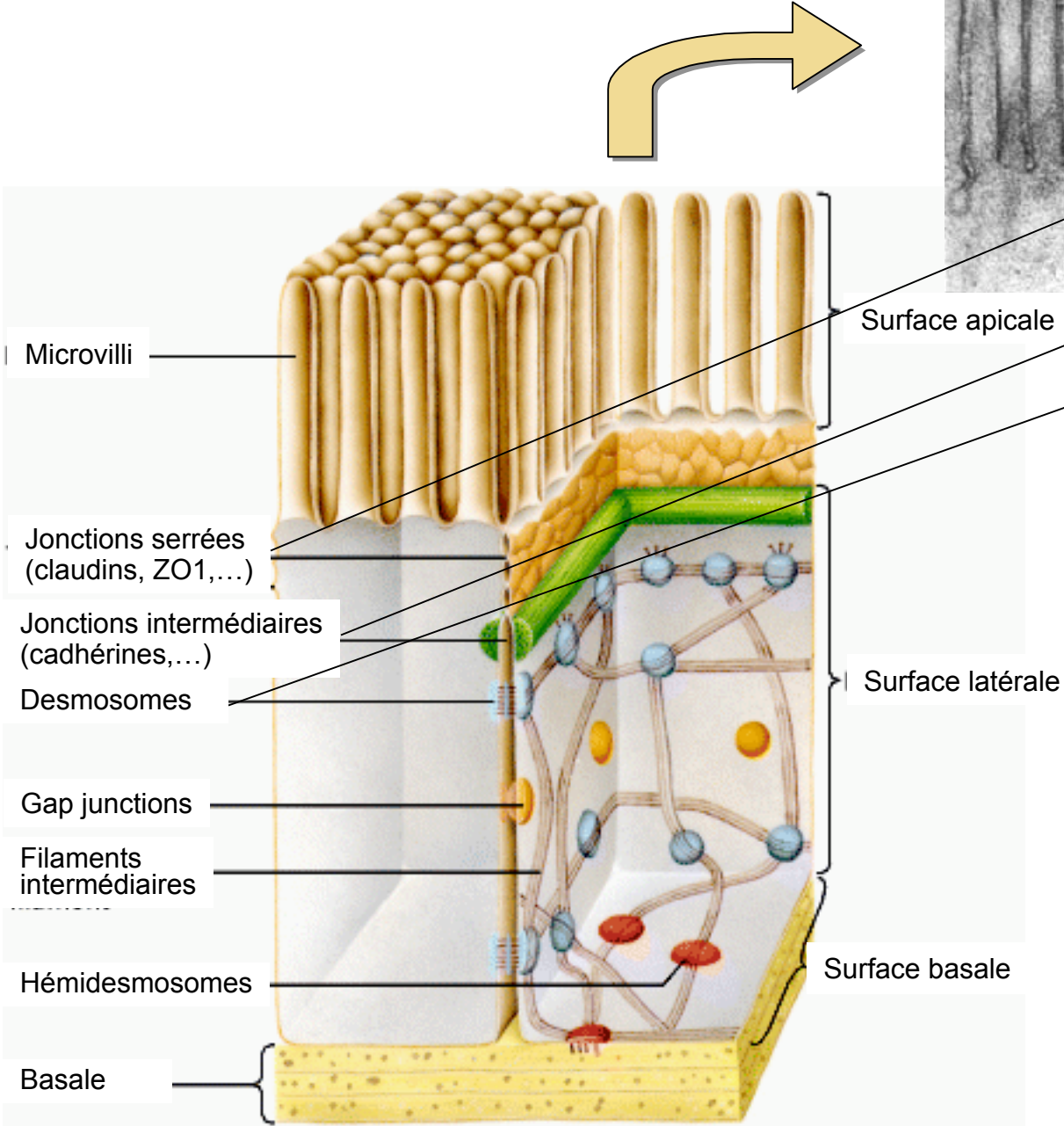
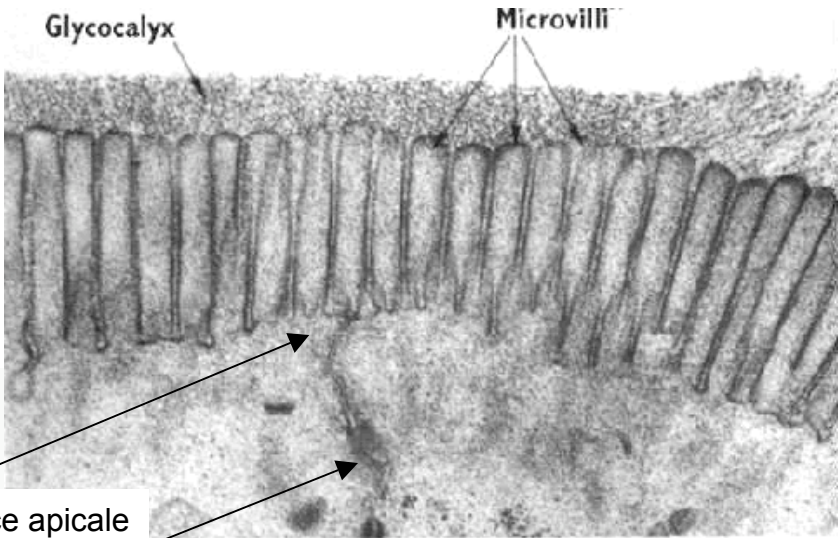
2 - La phosphatase alcaline intestinale (APase) de la bordure en brosse détoxifie le lipide A et prévient l'inflammation chez le Zebrafish en réponse aux G- commensaux (Bates et al., Cell host Microb., 2007).

3 - Peptidoglycanes ? Flagellines ?

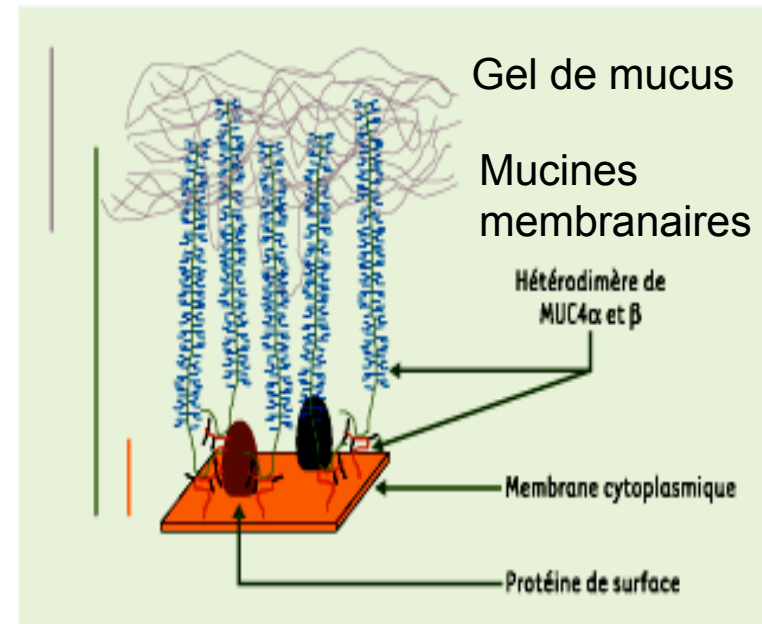
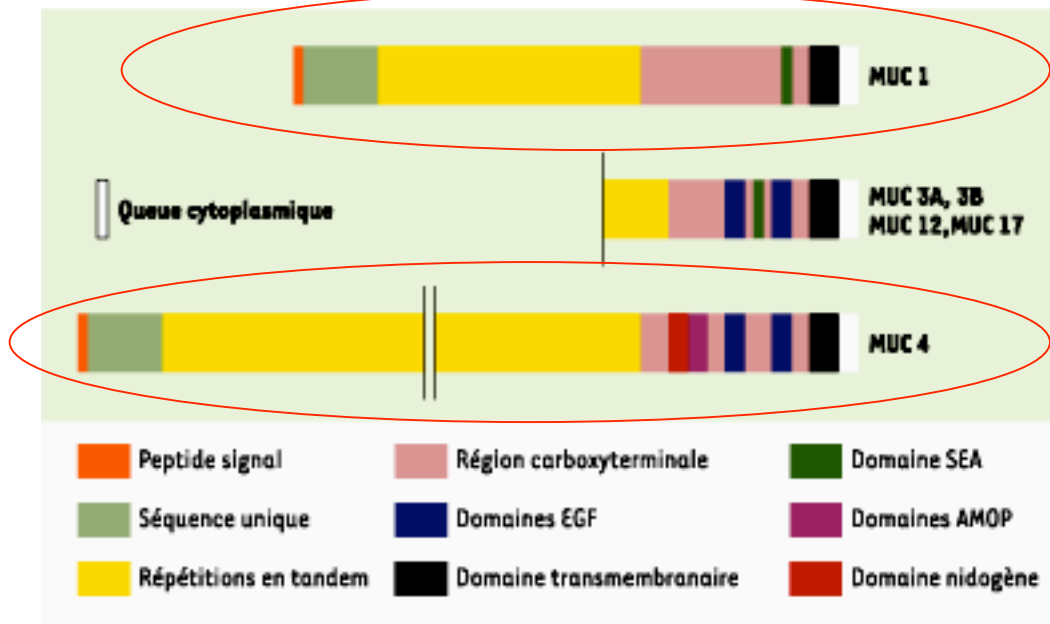
# Stratégie de furtivité



# Cellule épithéliale intestinale







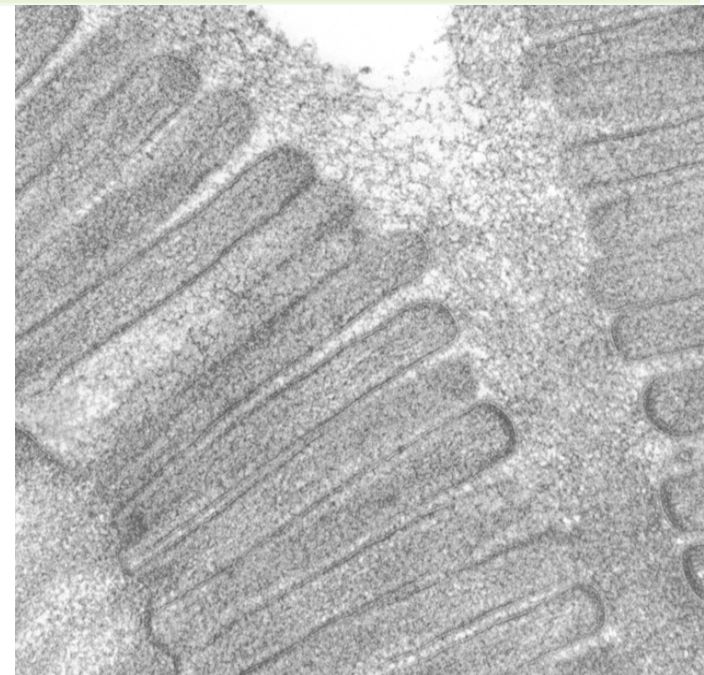
## Apomucines membranaires

Les apomucines épithéliales membranaires sont synthétisées par l'ensemble des cellules épithéliales. Elles possèdent toutes un domaine transmembranaire.

EGF = Epidermal Growth Factor

SEA = Sea Urchin Sperm Protein Enterokinase Agrin

AMOP = Adhesion-associated domain



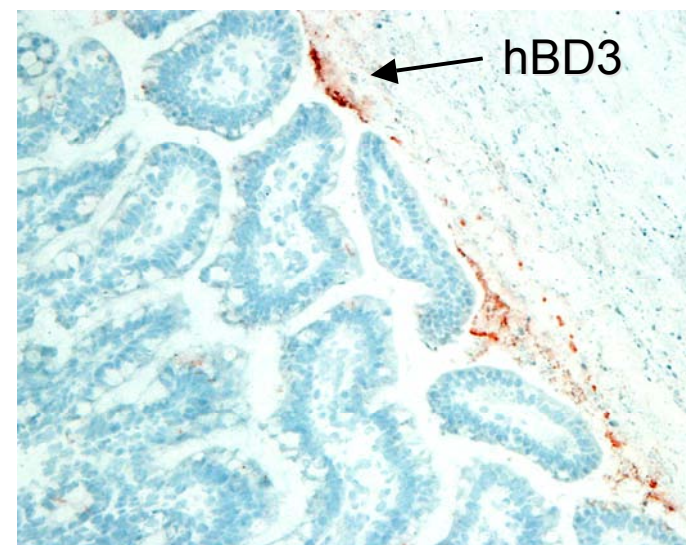
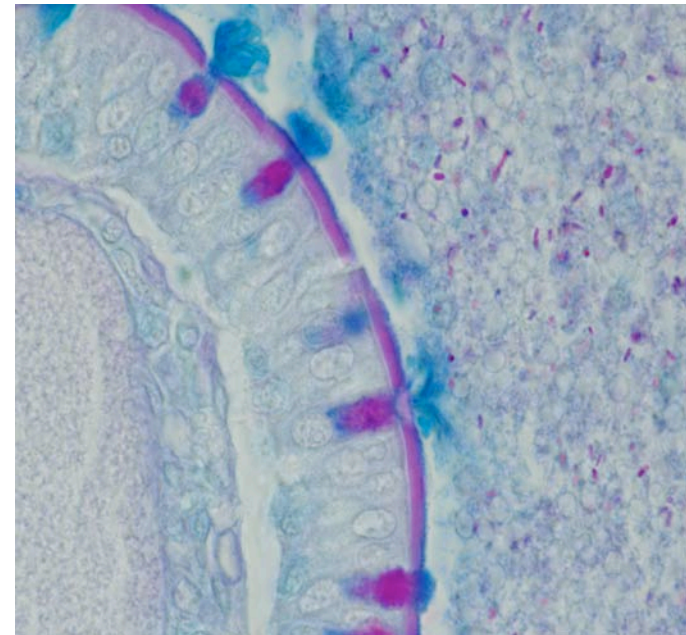
## Cellules caliciformes et couche de mucus

La muqueuse intestinale est protégée par une couche épaisse et imperméable de mucus qui augmente en épaisseur de l'estomac au colon (Atuma C et coll. 2001. *Am.J.Physiol.Gastroenterol.Liver Physiol.*,280:G222-229).

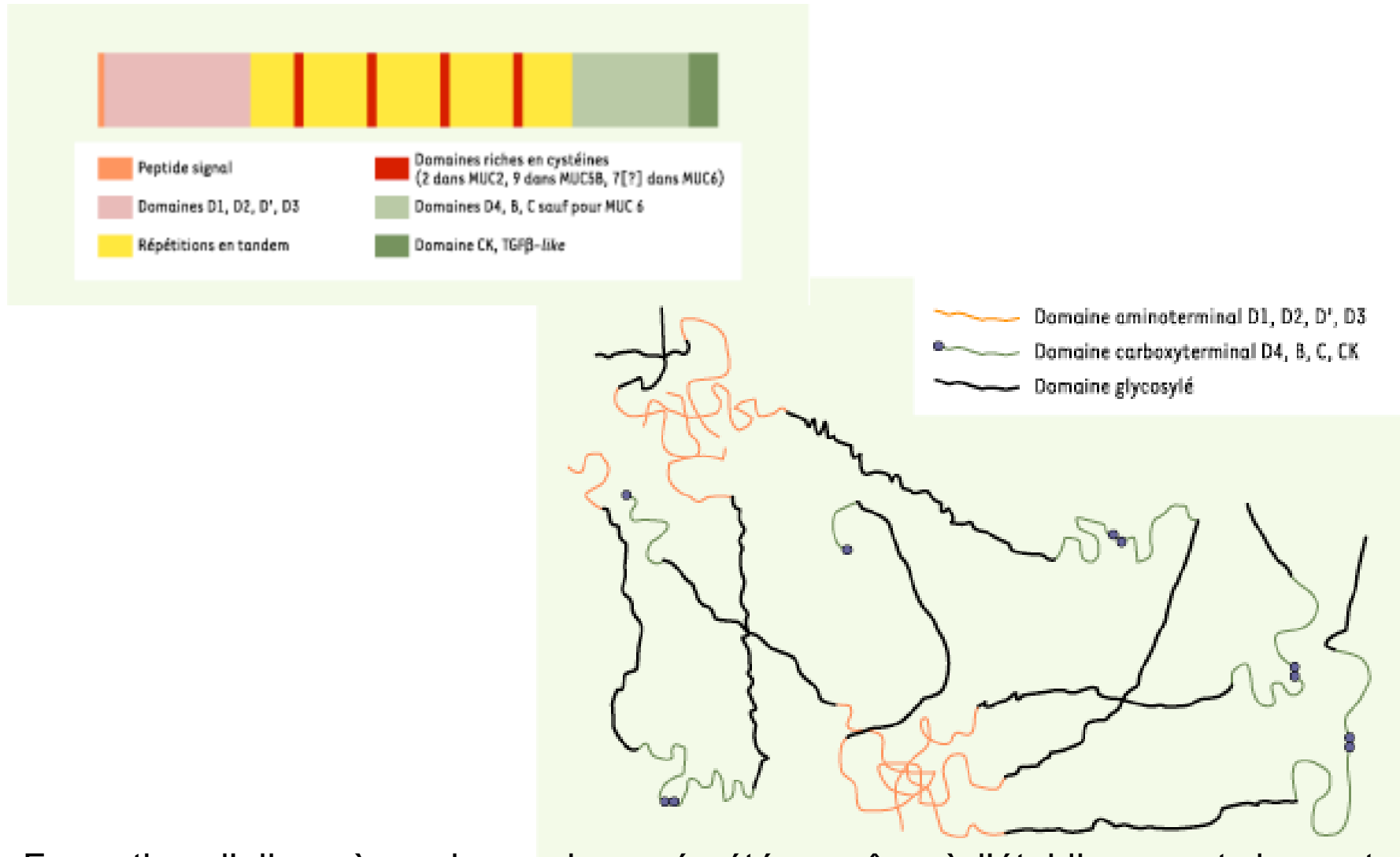
La mucine sécrétée dominante, MUC2, est stockée dans et sécrétée par les cellules caliciformes très nombreuses dans les cryptes coliques.

Trois fonctions principales peuvent être définies:

- Couche protectrice protéases-résistante assurant une protection physique de la surface de l'épithélium (Crazziari ES. 2009. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*,48:Suppl.2:S54-55)
- Capture des bactéries par mimiquerie des récepteurs membranaires, élimination par péristaltisme (Sajan SU & Forstner JF. 1990. *Infect.Immun.*,58:868-873; Smith CJ et coll. 1995. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*,21:269-276)
- Matrice maintenant et concentrant les molécules antimicrobiennes produites par l'épithélium (peptides antimicrobiens), les molécules cytoprotectives (TFF) et les sIgA (Taupin D & Podolsky DK. 2003. *Nat.Rev.Cell Biol.Dev.*,4:721-732)



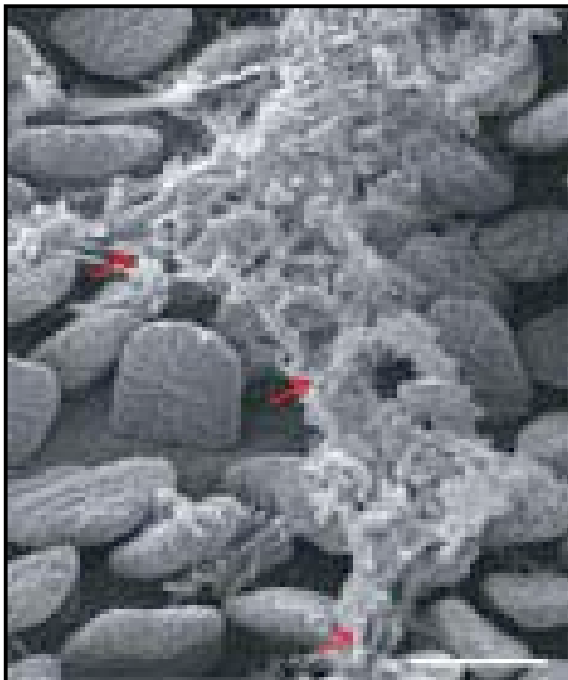
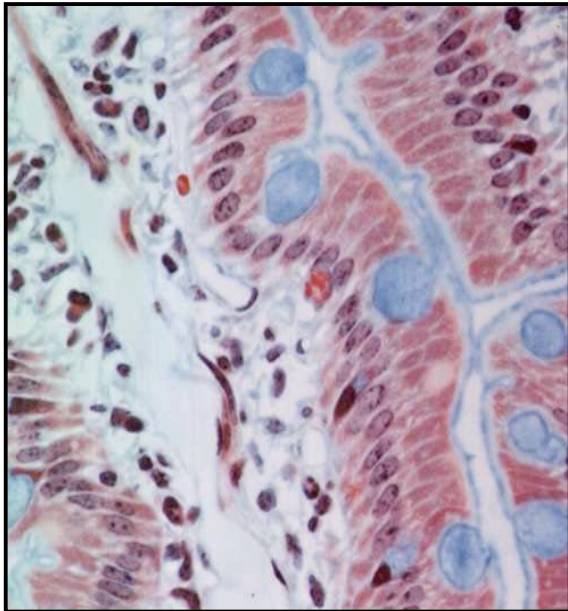
Sperandio B et Sansonetti PJ



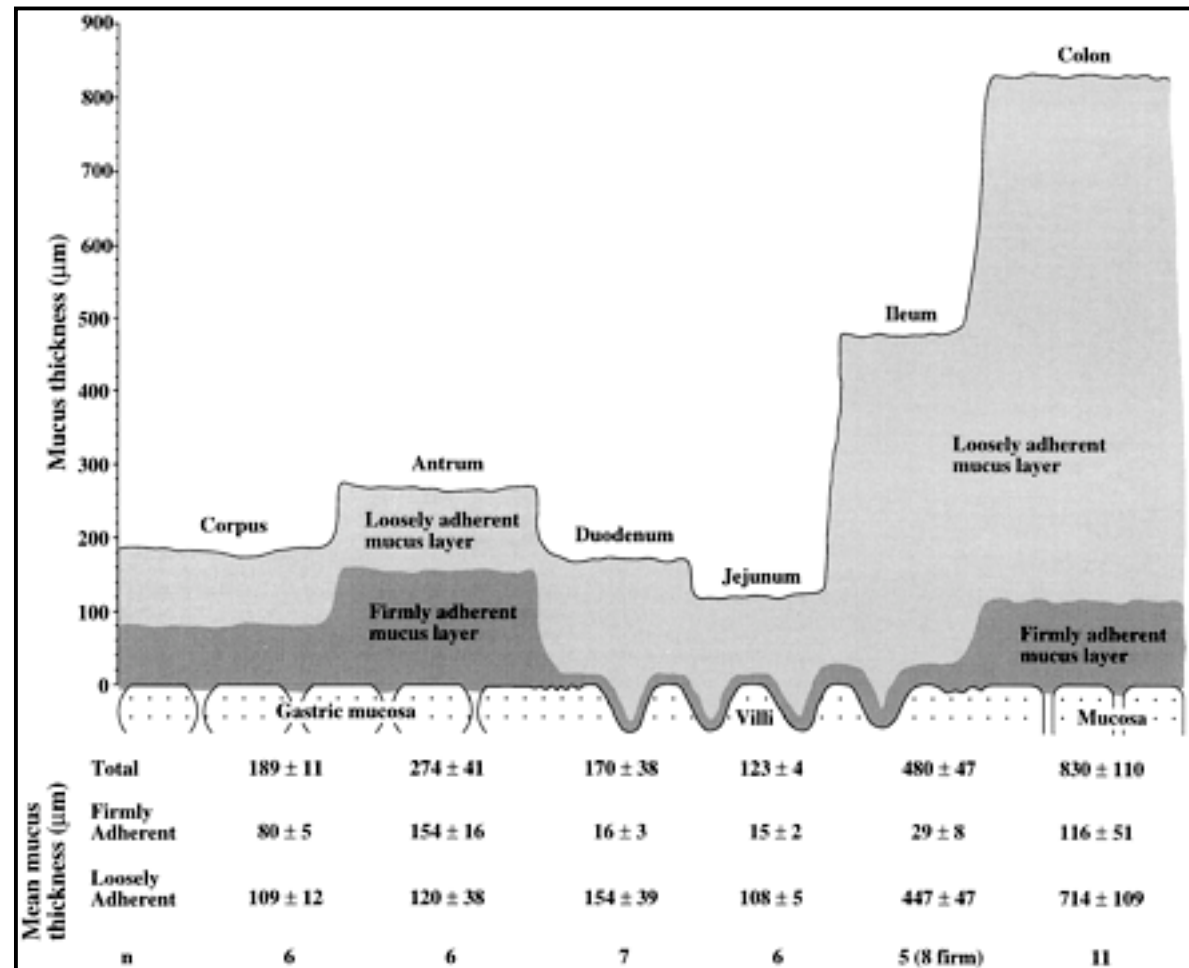
Formation d'oligomères de mucines sécrétées grâce à l'établissement de ponts disulfures. Les domaines carboxyterminaux contribuent à l'étape initiale de dimérisation par leur domaine CK (cystein knot), les domaines aminotermiaux permettent l'oligomérisation et l'organisation de la structure tridimensionnelle du gel de mucus (Porchet N & Aubert JP. 2004. Med.Sci.,20:569-574).



## Epaisseur de la couche de mucus en fonction du niveau dans l'intestin



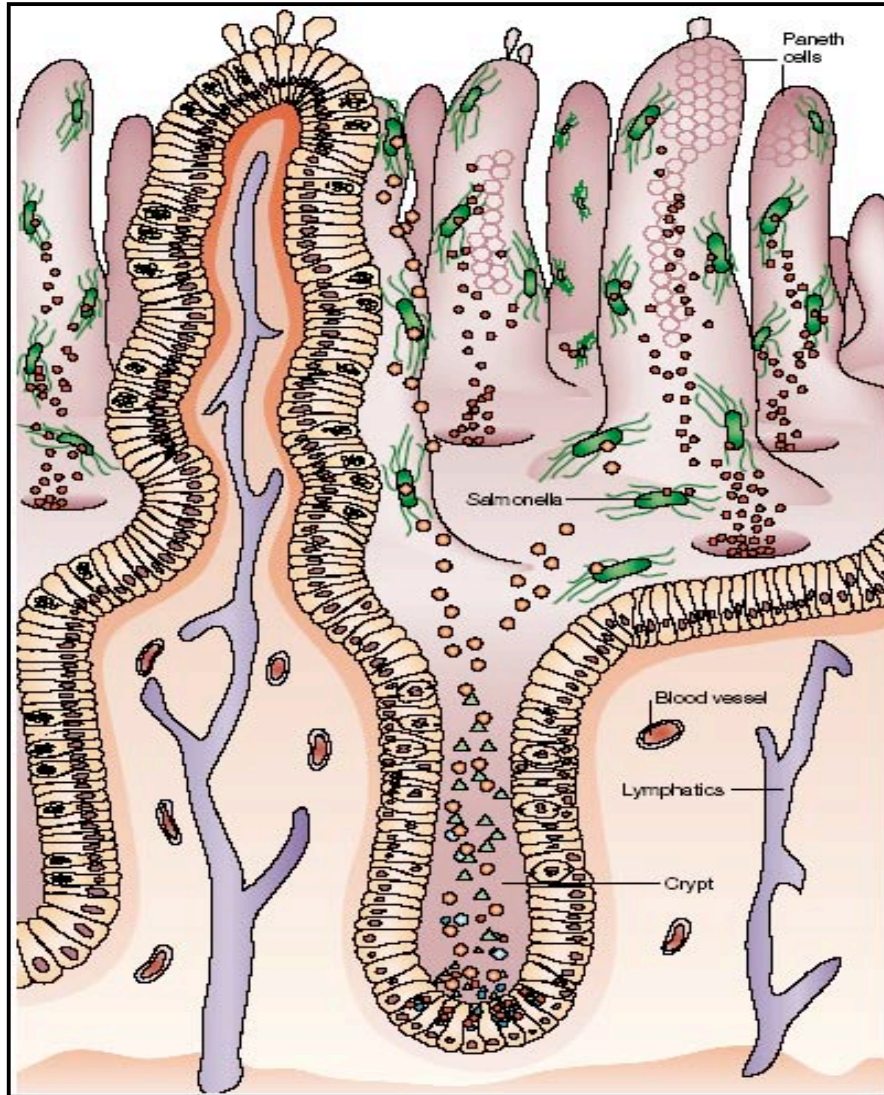
- Altérations de l'homéostasie des mucines dans les MICI.
- La RCH est caractérisée par une vacuité des cellules mucipares et une fine couche de mucus.
- L'assemblage aberrant de Muc2 chez la souris cause un stress du réticulum endoplasmique et un tableau proche de la RCH (Heazlewood et al., PLoS Med., 2008)



Matsuo et al., 1997, Gut; Atuma et al., 2001, Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver.Physiol.

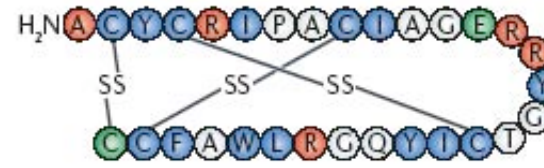


# Peptides antimicrobiens



## Cryptes

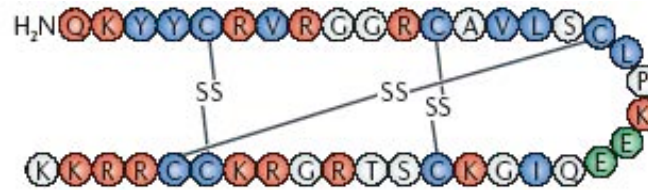
- ◆  $\alpha$ -défensine 5 (cellules de Paneth)
- ◆  $\alpha$ -défensine 6 (cellules de Paneth)



$\alpha$ -defensin 1

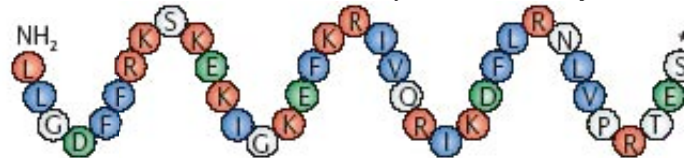
## Villi

- ◆  $\beta$ -défensine 1 (cellules épithéliales)
- ◆  $\beta$ -défensine 2 (cellules épithéliales)
- ◆  $\beta$ -défensine 3 (cellules épithéliales)



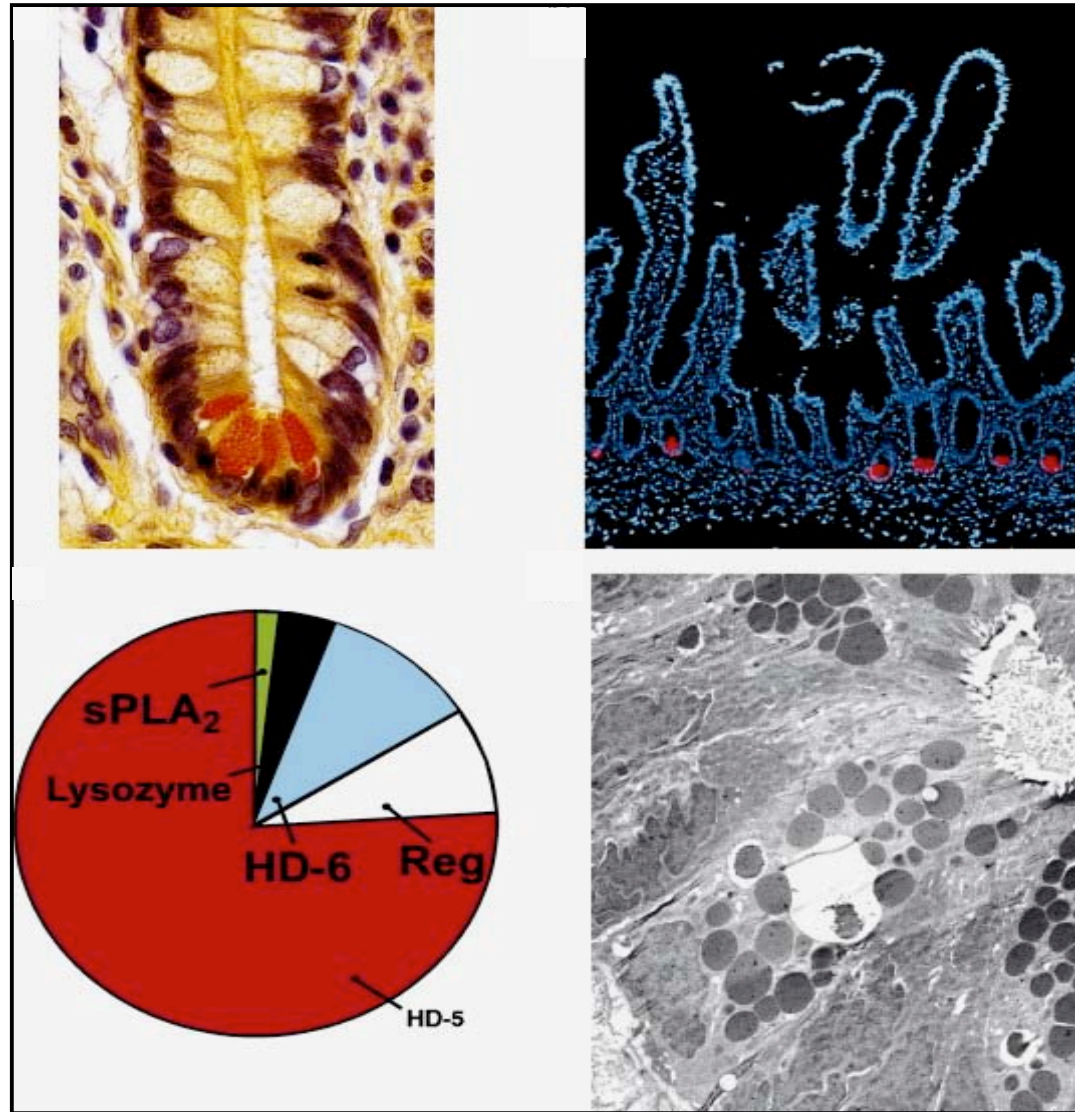
$\beta$ -défensine 3

- ◆ cathélicidine LL-37 (cellules épithéliales)



LL-37

# Cellules de Paneth



## Autres molécules bactéricides produites par l'épithélium intestinal

Nombre croissant de molécules à activité antimicrobienne produites par l'épithélium intestinal dont le mode d'action reste à clairement élucider:

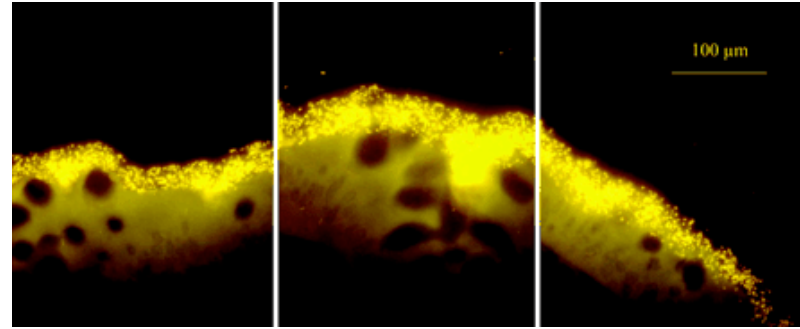
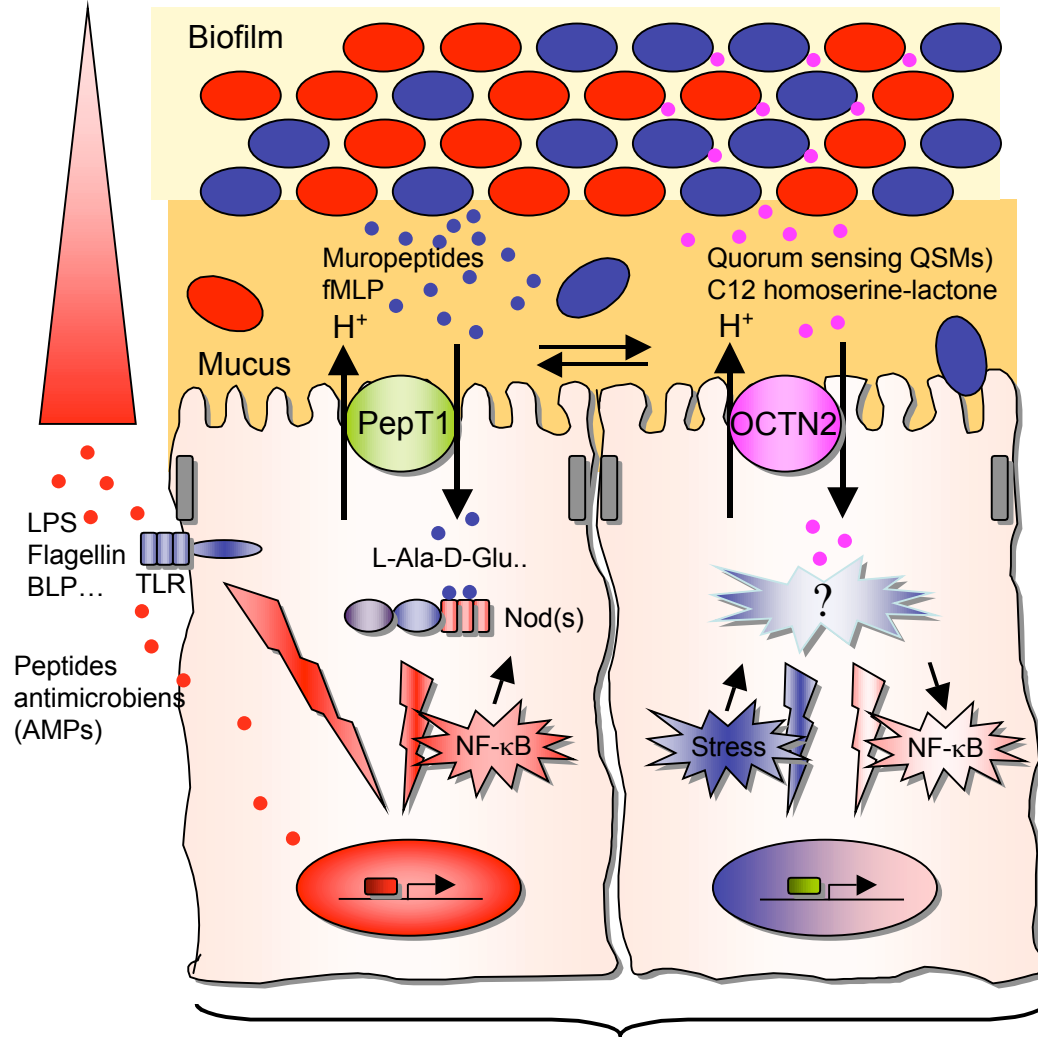
**Angiogénine-4** (Ang-4) chez la souris, équivalent de Ang-1 chez l'homme, appartenant à la famille des ribonucléases (Hooper LV et coll. 2003. Nat.Immunol.,4:269-273).

Lectines de type C: **RegIII $\gamma$**  chez la souris, équivalent de HIP/PAP chez l'homme, une lectine bactéricide se liant au peptidoglycane à la surface des bactéries à Gram + (Cash HL et coll. 2006. Science,313:1126-1130).

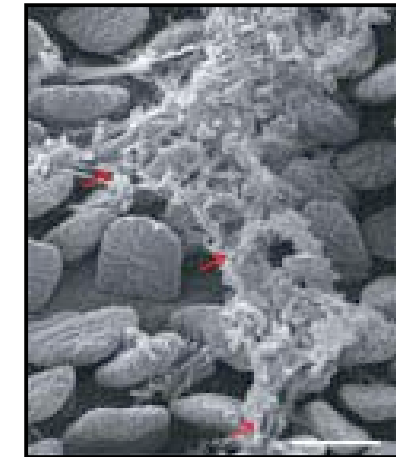
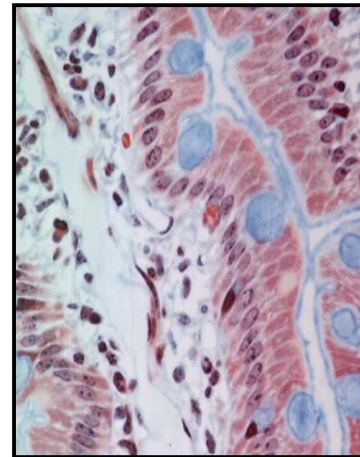
L'induction de RegIII $\gamma$  dépend de la flore intestinale par une voie dépendante de MyD88 (TLRs) et protège l'intestin murin contre l'infection par *Listeria monocytogenes* (Brandl K et coll. 2007. J.Exp.Med.56:1091-1097).



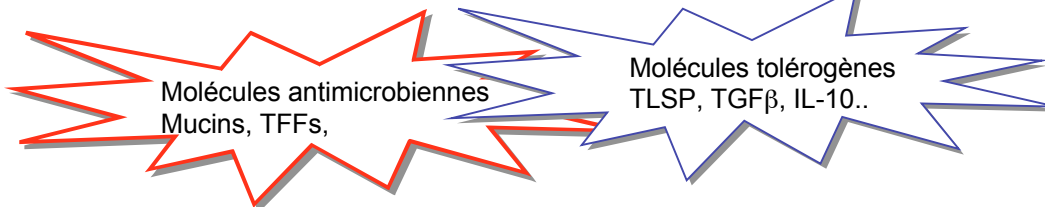
Gradient de concentration de facteurs antimicrobiens (AMPs, lysozyme..)



Swidsinski et al., 2005, J.Clin.Microbiol.

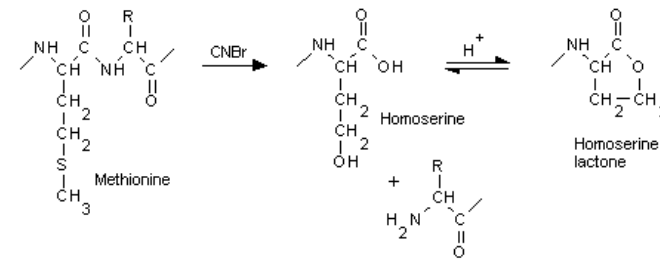


« Inflammation physiologique »



Défenses antimicrobiennes

Tolérogénèse et restitution

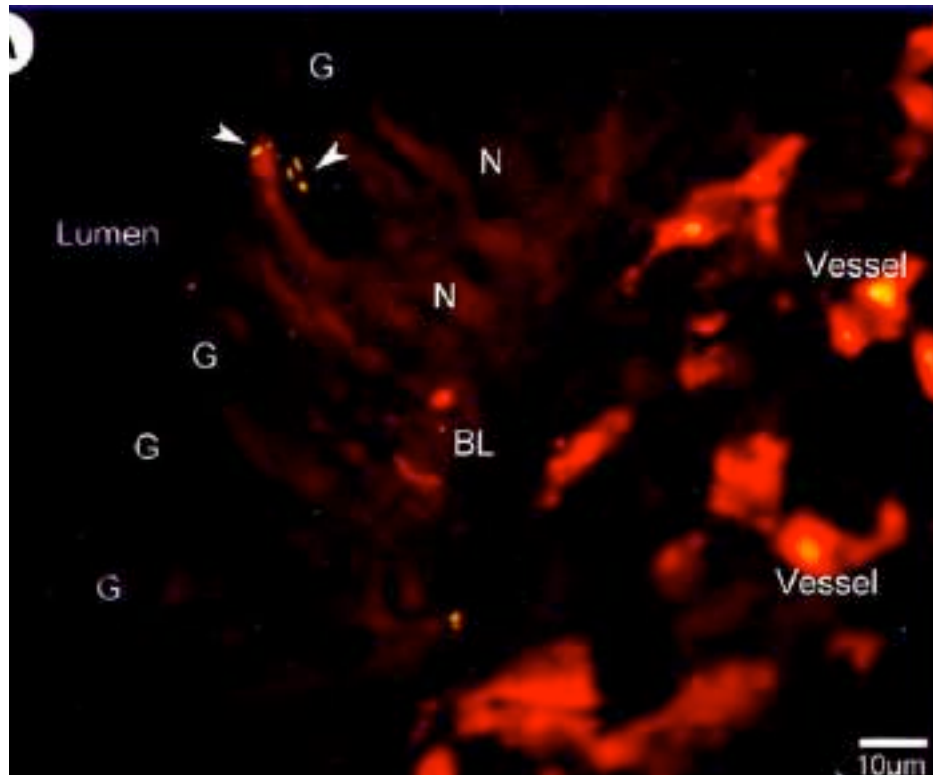


Vavricka et coll., 2004, Gastroenterology  
 Fujiya et coll., 2007, Cell Host Microbe  
 Kravchenko et coll., 2008, Science

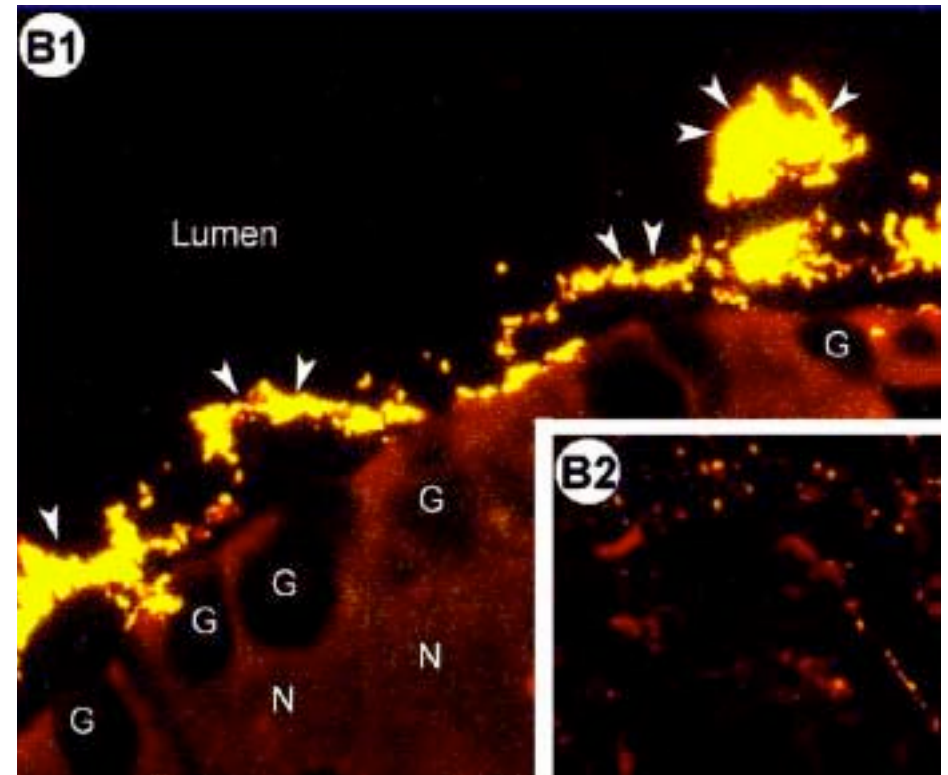


# Développement d'une couche (biofilm) de bactéries étroitement associées à la surface de l'épithélium dans des biopsies de Maladie de Crohn active.

(Swidsinski A et coll. 2002. Gastroenterology, 122:44-54).



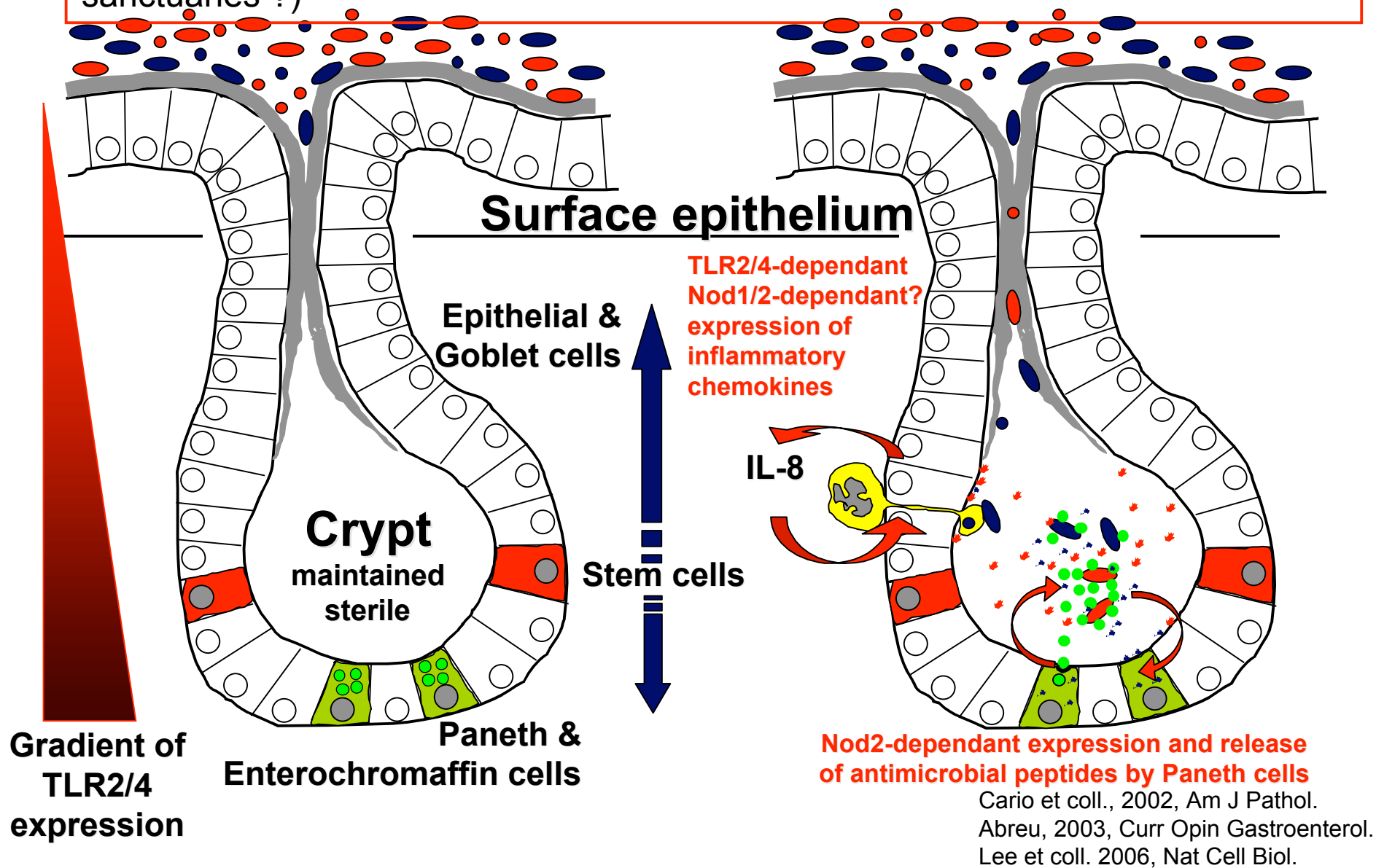
Contrôle



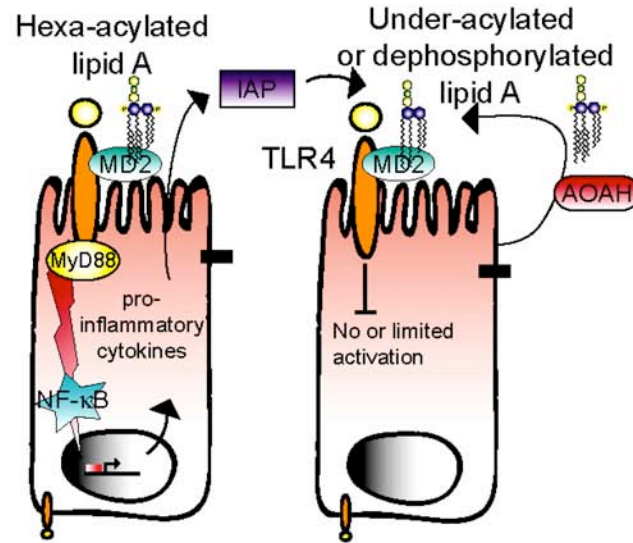
Maladie de Crohn active

G = Cellules caliciformes, BL = *lamina propria*, N = Noyaux

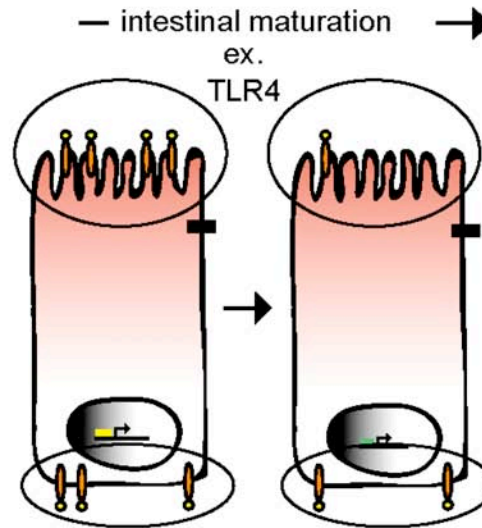
Sensing of the luminal flora. Not all epithelial cells are equal (Abreu et al., 2005):  
 (1) Sequestration/weak expression of sensing molecules (and cofactors) on surface epithelium.  
 (2) Expression in crypts (maintaining crypts as +/- sterile sanctuaries ?)



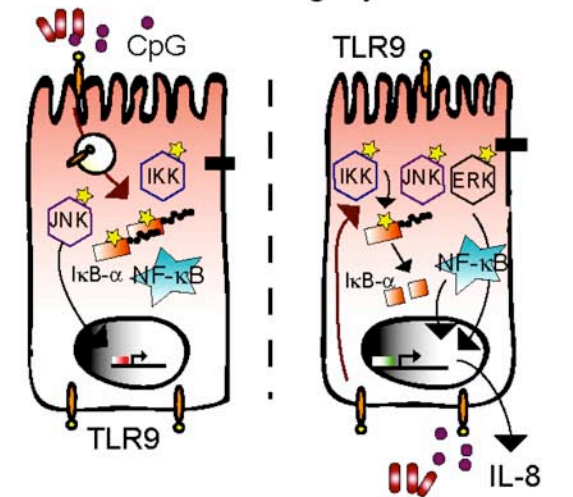
Detoxification of pro-inflammatory molecules



Down-regulation of TLR expression



Restricted access to basolateral TLRs due to tight junctions



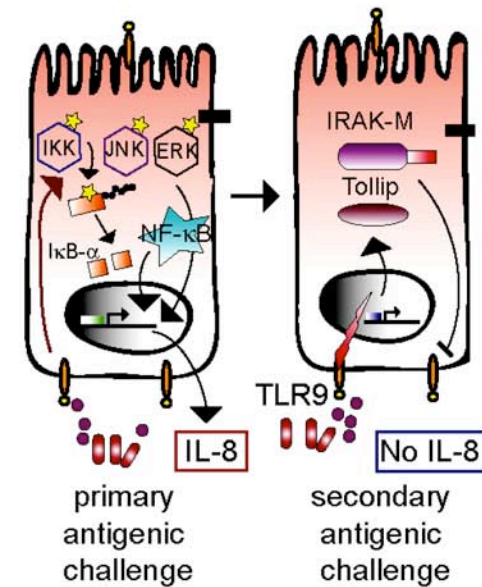
apical stimulation

basolateral stimulation

Tolerization

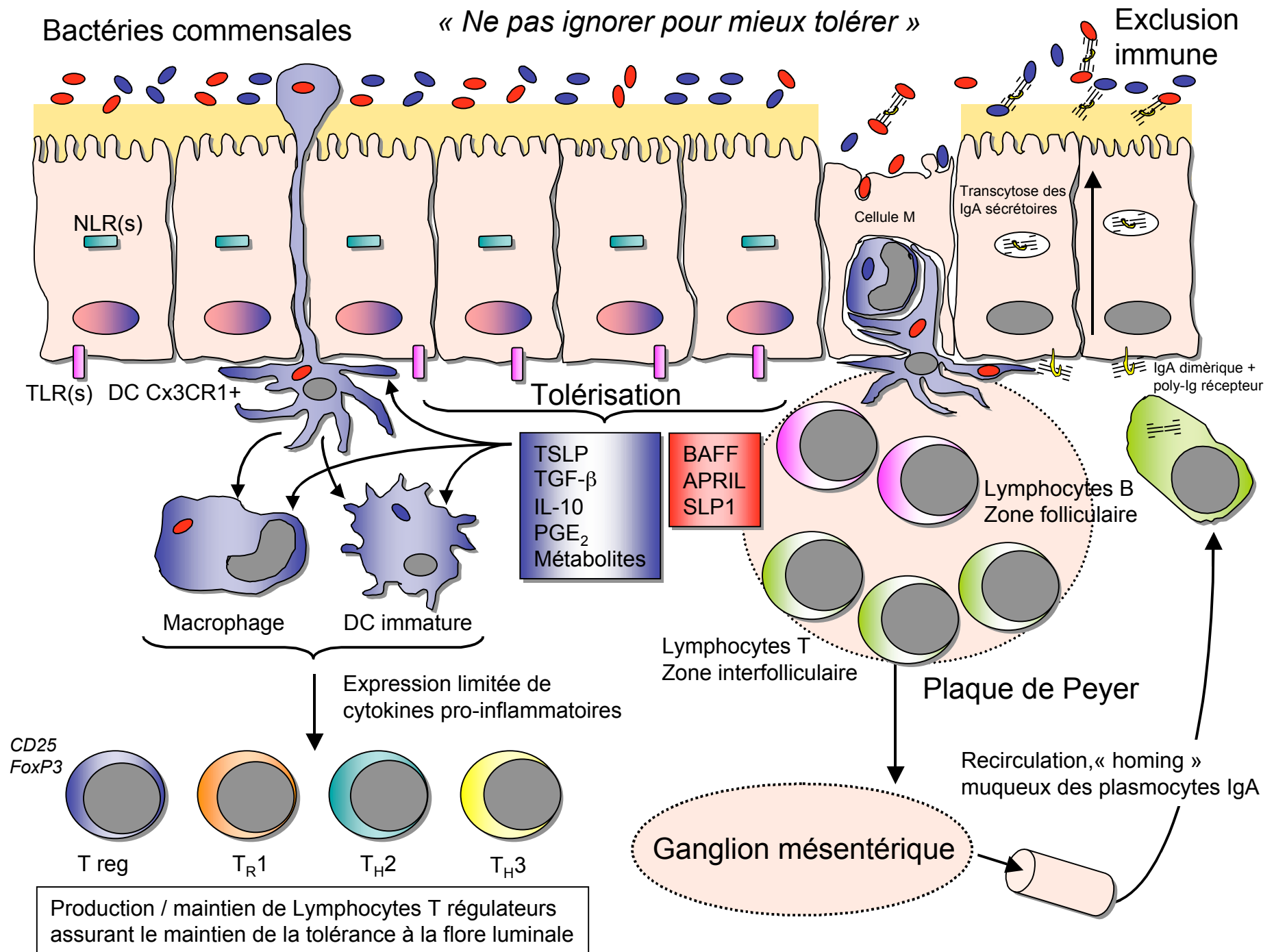
Pro-inflammatory

Desensitization/induction of tolerant state



primary antigenic challenge

secondary antigenic challenge





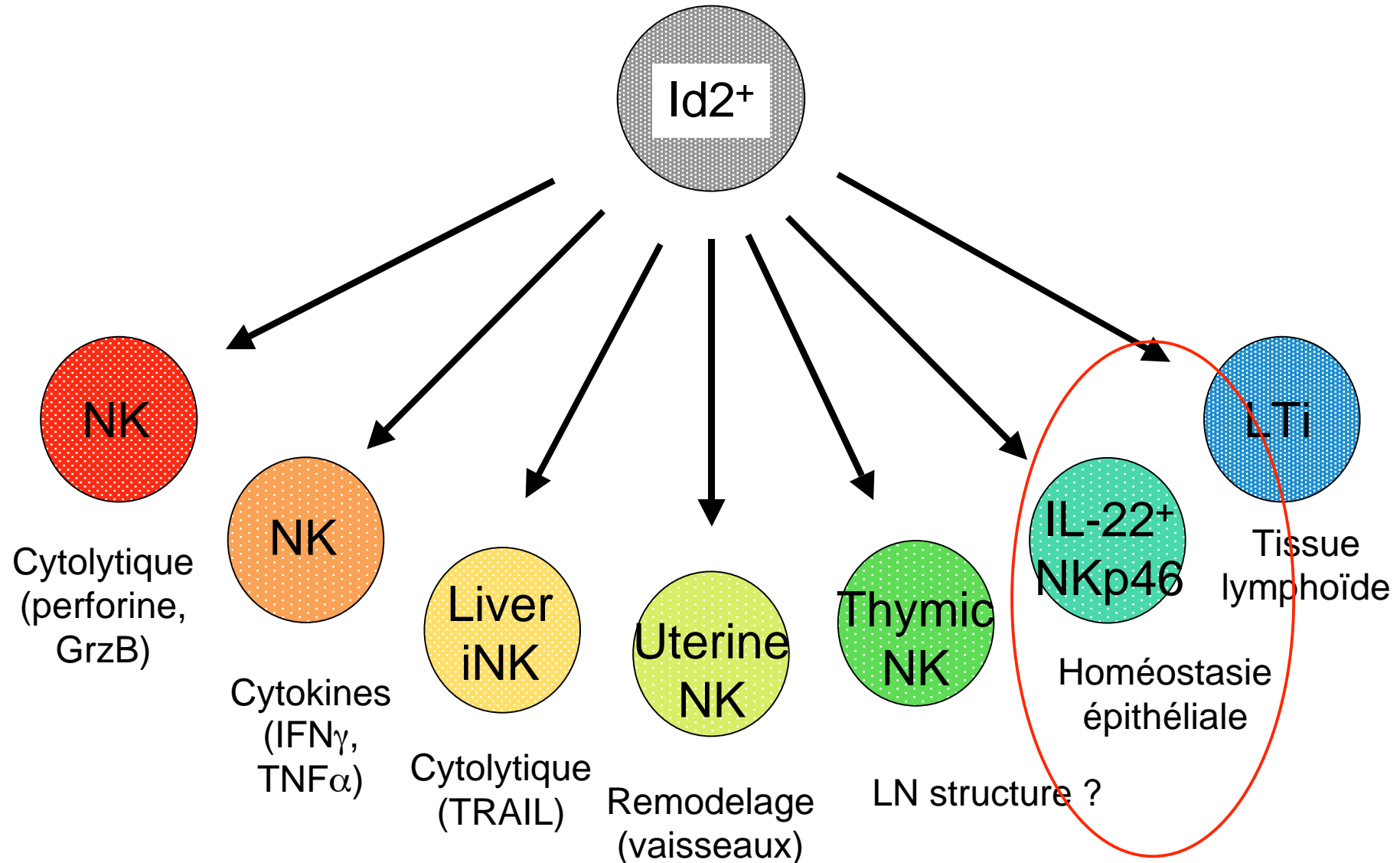
## **Tolérognènèse active**

1 - Cellules lymphoïdes innées

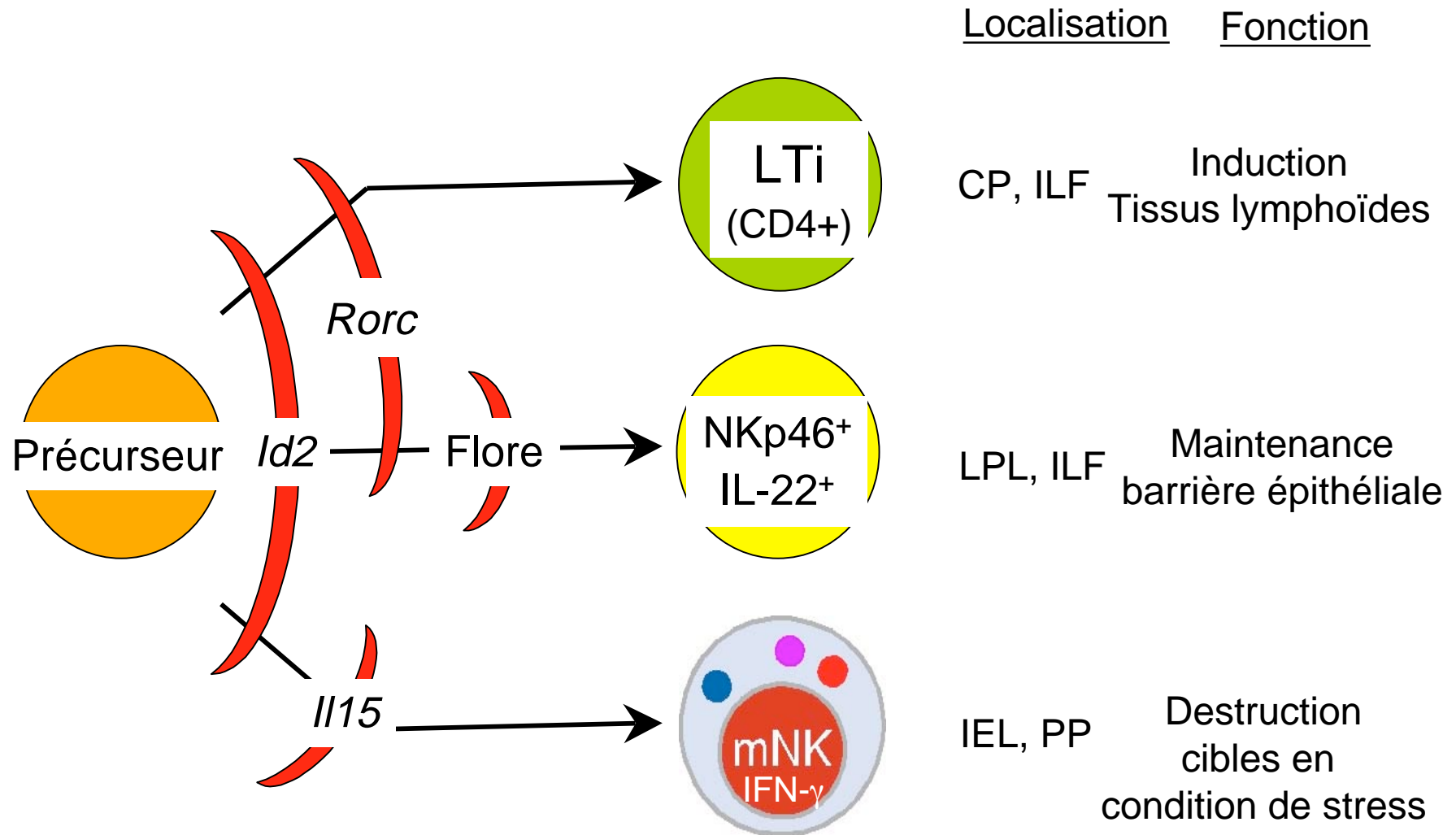
2 - Protection muqueuse par les sIgA

3 - Cellules T régulatrices

# 1 - Diversité fonctionnelle des cellules lymphoïdes innées (ILCs)



# Diversité des Lymphocytes Innés du système immunitaire muqueux intestinal (MALT)



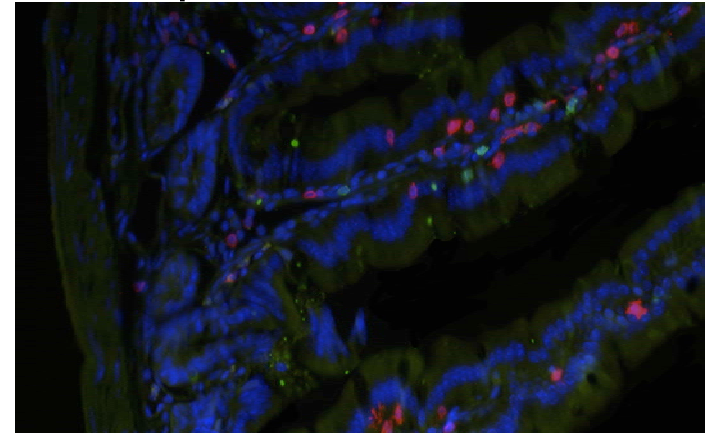
## De nouvelles populations assurant l'homéostasie

La flore bactérienne commensale induit la production d'IL-22 par les lymphocytes intestinaux NKp46+ localisés dans la *lamina propria* et dont le rôle est essentiel dans la défense innée de la muqueuse intestinale

(Sato-Takayama S et coll. 2008. *Immunity*,29:958-970  
Sanos SL et coll. 2009. *Nat.Immunol.*,10:83-91)

Les NKp46+ se distinguent des cellules NK classiques par leur faible production d'IFN $\gamma$  et leur absence de production de perforines.

Ncr-1<sup>GFP/+</sup>B6 mice (Gazit et al., 2006)



Ils expriment le récepteur nucléaire ROR $\gamma$ T apparenté au récepteur de l'acide rétinoïque et IL-22.

IL-22 est une cytokine Th17 (proche de l'IL-6 et activant STAT3). Elle agit directement sur l'épithélium intestinal et joue un rôle protecteur. Sa neutralisation entraîne une inflammation (Huz P & coll. 2009. *Curr.Opin.Gastroenterol.*,Dec. 25).

La génération des NKp46+IL-22+ répond à la présence de la flore commensale via une voie de signalisation impliquant ROR $\gamma$ T. Les souris déficientes en NKp46+IL-22 sont plus susceptibles au pathogène *Citrobacter rodentium*.

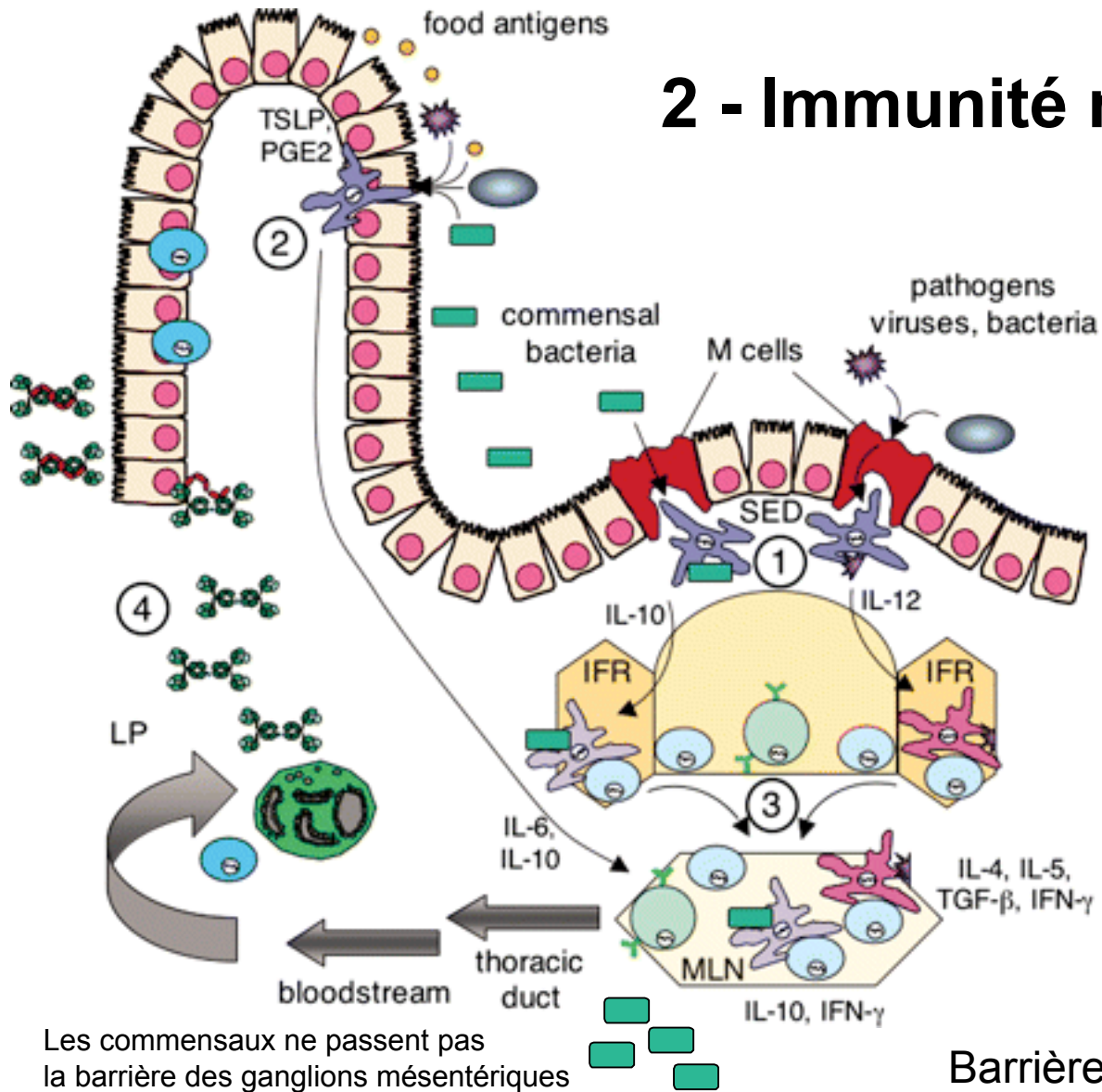


## **Lymphocytes NKp46<sup>+</sup> IL-22<sup>+</sup>**

Un processus de développement local, exemple de « niche » environnementale assurant la diversification et la maturation des fonctions cellulaires / lymphocytaires innées induit un sous-groupe de lymphocytes NKp46<sup>+</sup> à fonctions spécialisées.

Sous-populations de lymphocytes NK impliquées dans le maintien de l'homéostasie épithéliale dans des conditions non-infectieuses et protégeant l'épithélium contre une agression par les pathogènes (défense préemptive ?)

## 2 - Immunité muqueuse et sIgA

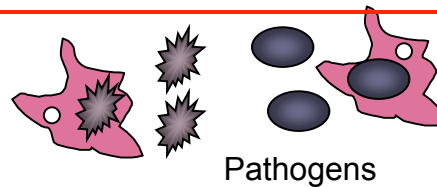


La reconnaissance des microorganismes commensaux demeure un processus strictement localisé à la muqueuse.

**Notion de barrière des ganglions mésentériques**

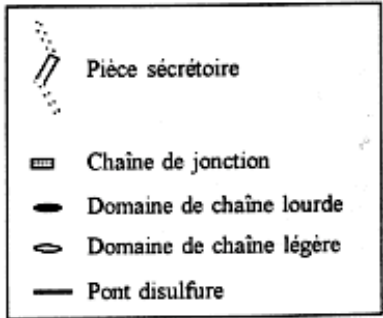
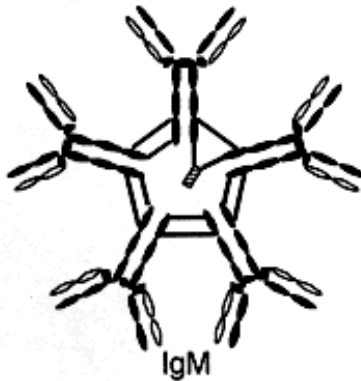
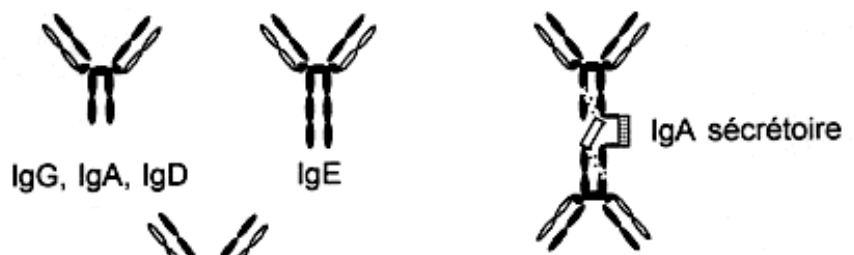
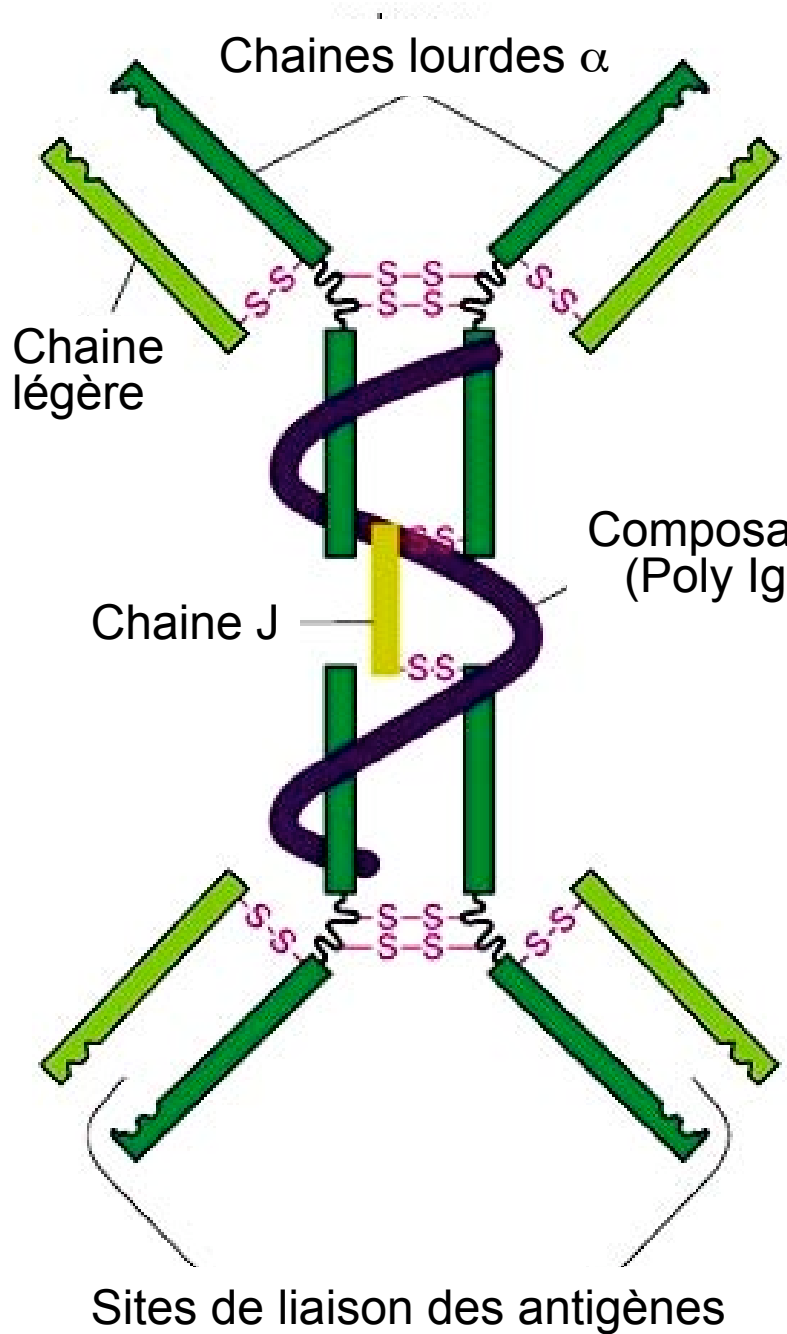
Les commensaux ne passent pas la barrière des ganglions mésentériques

**Barrière des ganglions mésentériques**

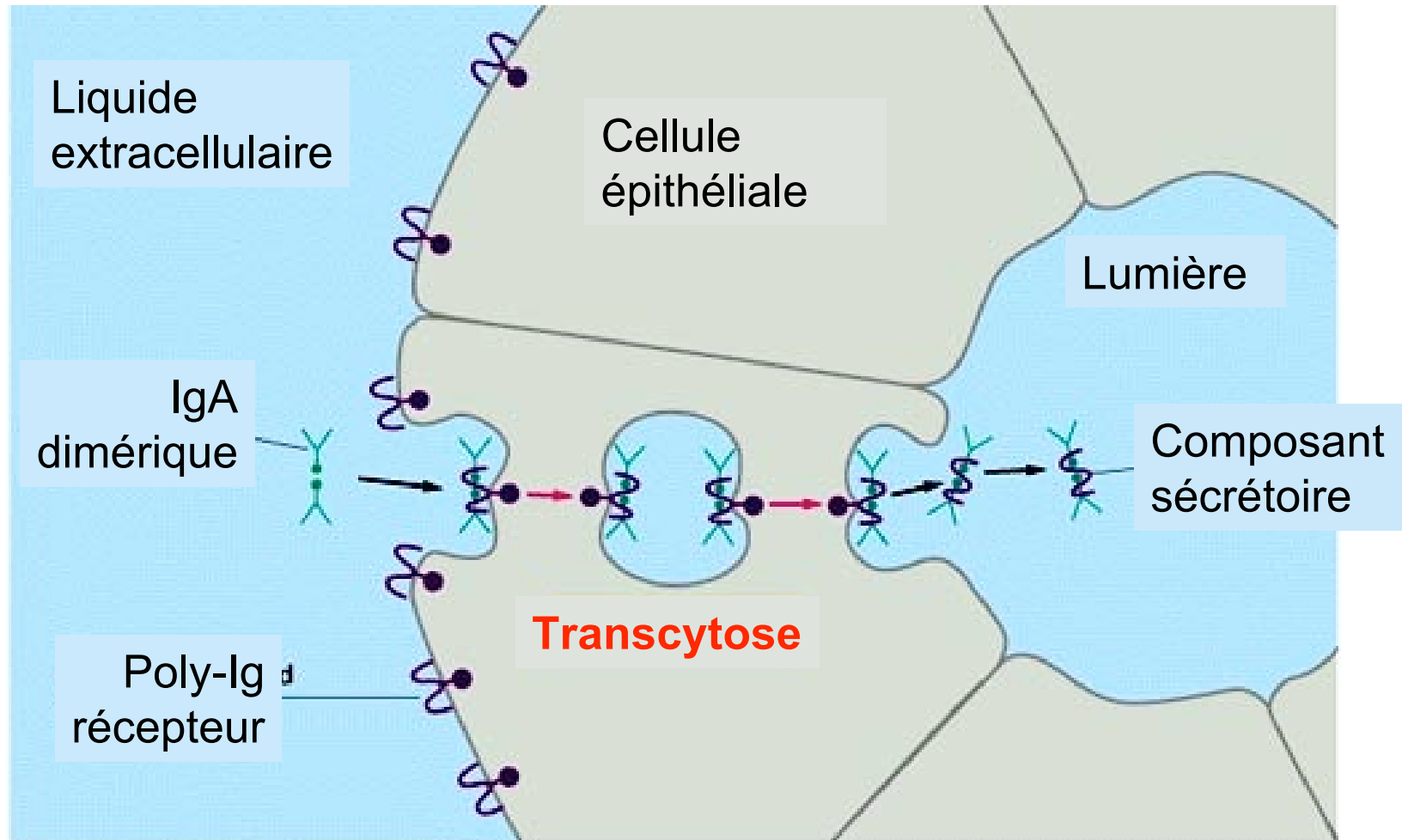


Dissémination systémique,  
Stimulation de l'immunité systémique

# Iga sécrétoires

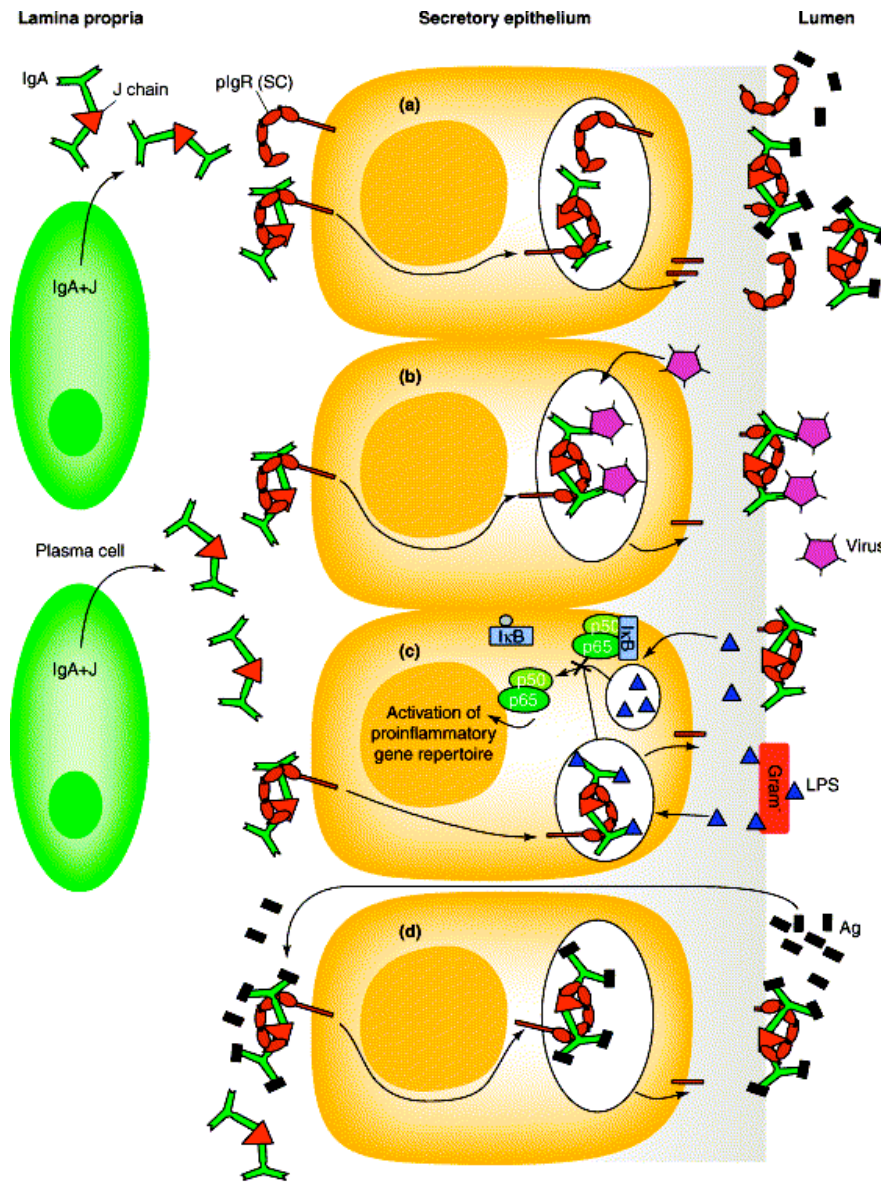


# Mécanisme de transport d'une IgA sécrétoire à travers une cellule épithéliale





# Fonctions principales des IgA sécrétoires



Anticorps bloquant assurant l'exclusion immune

Corthésy B.2009.

Immunopharmacol.Immunotoxicol.,31:174-179

Phalipon A et coll. 2002. Immunity,17:107-115

Neutralisation intracellulaire des virus

Huang YT.2005. J.Immunol.,174:4828-4835

Neutralisation intracellulaire des PAMPs (LPS)

Effet anti-inflammatoire

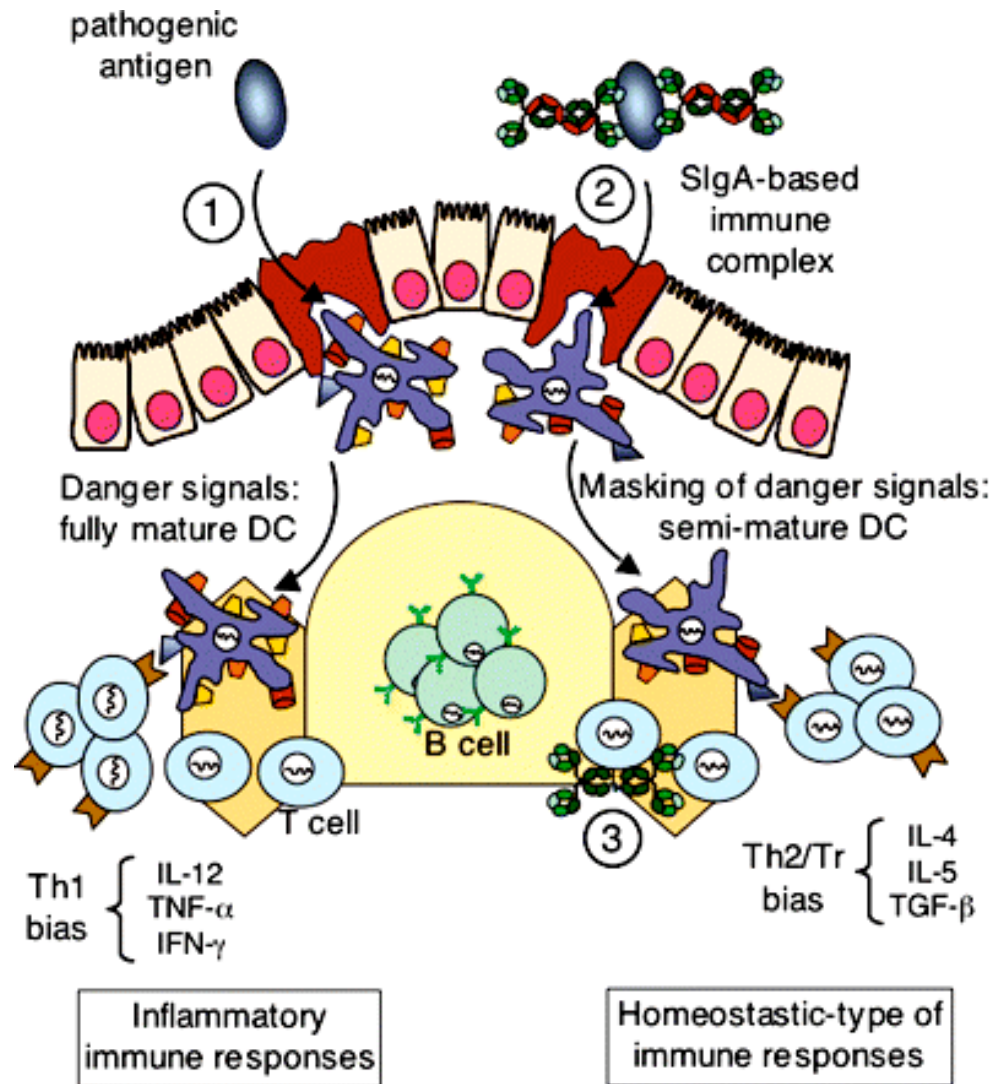
Fernandez MI et coll. 2003. Immunity,18:739-749

Clairance des antigènes qui ont accidentellement franchi la barrière épithéliale

Suzuki K & Fagarasan S. 2008.

Trends Immunol.,29:523-531

# Rétrotransport transépithélial des IgA



Les **sIgA** adhèrent spécifiquement à l'apex des cellules M dans les plaques de Peyer.

Elles assurent le rétrotransport transépithélial de l'IgA associée à son antigène/microbe de la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde sous-jacent.

Les immuns-complexes IgA sont capturés par les APC locales (DC).

Le masquage des épitopes par l'IgA, (contrairement aux antigènes/microorganismes directement internalisés par les cellules M), limite les signaux de danger perçus par les APC, causant un biais vers une réponse homéostatique.

Boullier S et coll. 2009. J.Immunol.,183:5879-5885

Corthésy B. 2007. J.Immunol.,178:27-32

Kadaoui KA & Corthésy B. 2007. J.Immunol.,179:7751-7757

# Induction des IgA contre les bactéries commensales

La production d'IgA en réponse à la flore commensale n'est pas exclusivement CD4-dépendante.

- Les IgA totales chez des souris KO pour la chaîne  $\beta$  ou  $\delta$  du TCR ne sont diminuées que de 25 % par rapport aux souris wt (Macpherson AJ et coll. 2000. Science,288:222-226).

- Les souris MHC-Class II KO ont des titres normaux d'IgA (Snider DP et coll. 1999. Int.Immunol.,11:191-198).

- Une réponse IgA indépendante des cellules T a été démontrée chez des souris C57BL/6x129 lors de l'infection par des rotavirus (Franco M & Greenberg HB. 1997. Virology, 238:169-179).

- Chez l'homme, un défaut dans la signalisation médiée par CD40 s'accompagne d'un titre normal / élevé d'IgA (Jain A et coll. 2004. J.Clin.Invest.,114:1593-1602).

# Induction des IgA contre les bactéries commensales

Indépendamment des contributions relatives des populations « souches » B1 et B2, la réponse IgA présente un répertoire  $V_H$  restreint de chaînes lourdes  $\alpha$  d'immunoglobulines intestinales chez la souris (Stoel M et coll. 2005. J.Immunol., 174:1046-1054) comme chez l'homme (Holtmeier W et coll. 2000. Gastroenterology, 119:1253-1266).

La réponse IgA semble donc correspondre à un système primitif, largement induit par la présence de bactéries commensales, avec forte capacité, large spécificité et faible affinité.

Il est indépendant des interactions B-T conventionnelles pour la maturation de l'affinité de ses anticorps.

Ce système semble parfaitement adapté à la production d'anticorps se liant à une flore bactérienne diverse présentant un fort degré de redondance de leurs antigènes de surface (Bouvet JP & Fischetti VA. 1999. Infect.Immun., 67:2687-2691)



# Induction des IgA contre les bactéries commensales

L'étude des séquences des IgA suggère indirectement que la réponse aux bactéries commensales ne dépend pas des centres germinaux conventionnels dans lesquels l'affinité des anticorps est améliorée par l'accumulation séquentielle d'hypermutations somatiques (Stoel et coll. 2005. J.Immunol.,174:1046-1054).

La formation de centres germinaux n'est pas obligatoire pour l'induction des IgA qui survient efficacement chez les souris déficientes en TNFR-I (Macpherson AJ et coll. 2000. Science,288:2222-2226).

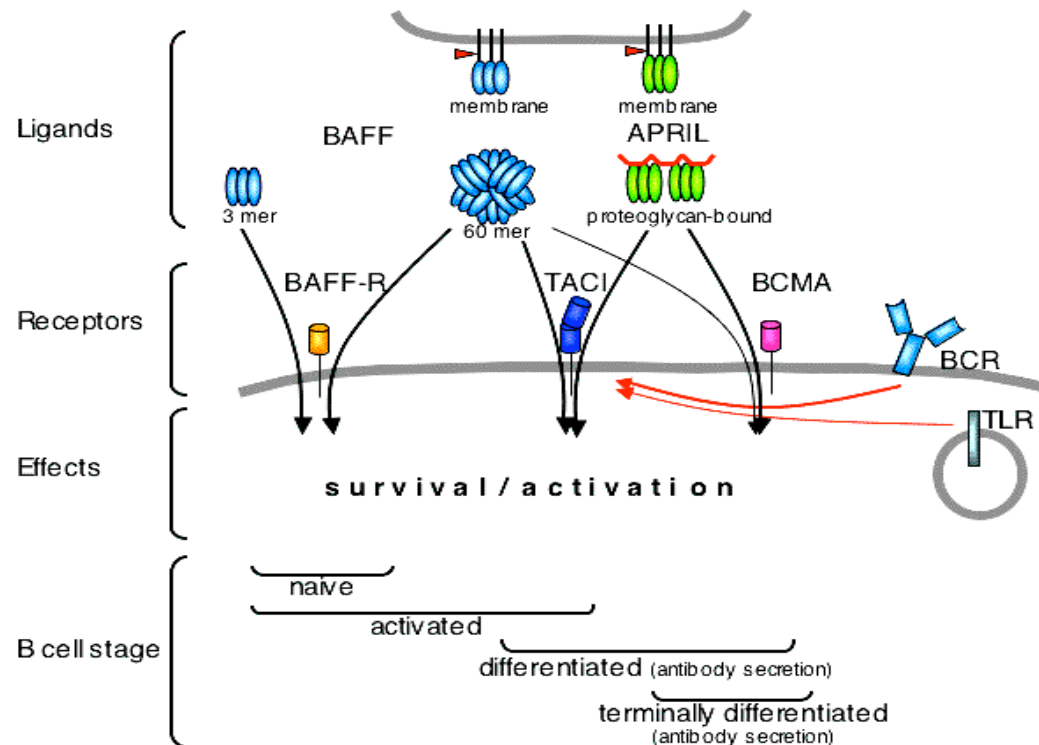
L'analyse des séquences des chaînes lourdes  $\alpha$  et le typage de la longueur de la région CDR3 montre que le répertoire de régions variables ( $V_H\alpha$ ) dans les plaques de Peyer et dans la *lamina propria* est très restreint chez la souris comme chez l'homme (Dunn-Walters DK et al. 1997. Eur.J.Immunol.27:2959-2964).

Les mécanismes assurant l'induction de la spécificité des IgA sont mal connus, contrairement à ceux des autres isotypes d'immunoglobulines (Macpherson AJ et coll. 2005. Immunology,115:153-162).

# Induction des IgA contre les bactéries commensales

La signalisation induite par le TGF- $\beta$  semble essentielle *in vitro* (Lycke N et coll. 1999. J.Immunol.,163:913-919) comme *in vivo* (Cazac BB et coll. 2000. Immunity,13:443-451).

L'interaction entre APC et cellules B accentuée par des cytokines de la famille du TNF comme BAFF et APRIL est **essentielle** (Castigli E et coll. 2004. PNAS,101:3903-3908; Litinsky MB et coll. 2002. Nat.Immunol.,3:822-829).



Nature, 2007 Aug 23;448(7156):929-33.

**Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells.**

Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, Shioara T, Akira S, Ohteki T

Department of Immunology, Akita University Graduate School of Medicine, Akita 010-8543, Japan.

Plus de 80 % des plasmocytes du MALT produisent des IgA (20 % dans les organes lymphoïdes périphériques)

IgA « class-switch recombination » (CSR), l'événement qui amène à la différenciation des plasmocytes à IgA, est mal compris. Il précède et est lié à la génération de la diversité.

CSR est altéré dans les souris iNOS<sup>-/-</sup> (*Nos2*).

iNOS régule IgA-CSR dépendant des lymphocytes T via l'induction de l'expression du TGFβR et IgA-CSR indépendant des lymphocytes T via l'induction de Tnfs13b / APRIL (proliferation-inducing ligand) et du facteur d'activation des cellules B de la famille du TNF, Tnf13 /BAFF.

iNOS est préférentiellement exprimé, via TLR, en réponse à la flore commensale par des DC présentes dans le MALT.

Le transfert adoptif de la sous-population de DC productrice de TNFα et iNOS à des souris restaure IgA-CSR chez les souris iNOS<sup>-/-</sup>.

# Contrôle du microbiote commensal par les IgA sécrétoires

Malgré l'énorme quantité d'IgA produites et sécrétées chaque jour (5-15 grammes, au moins 60 % de l'ensemble des immunoglobulines de tous isotypes produites !) au niveau de la muqueuse intestinale, relativement peu d'études ont analysé leur fonction dans le contrôle de l'homéostasie du microbiote commensal.

Les souris déficientes en poly-Ig récepteur (PIgR) qui assurent la transcytose épithéliale des IgA et IgM présentent une entéropathie exsudative du fait d'une perte de la barrière paracellulaire (Johansen FE et coll. 1999. J.Exp.Med.,190:915-922)

En l'absence d'IgA la densité luminale de la flore bactérienne augmente de façon incontrôlée (Fagarasan S. 2002. Science,298:1424-1427). Observation faite chez les souris AID<sup>-/-</sup> (activation-induced cytidine deaminase <sup>-/-</sup>) qui sont déficientes en IgA et IgM à affinité maturée présentent une croissance incontrôlée de leur flore anaérobie.

(AID est l'enzyme clé régulateur de la diversification des anticorps secondaires assurant la commutation isotypique = pas d'IgA et la maturation de l'affinité des anticorps par mutations somatiques = pas de maturation de l'affinité des IgM)

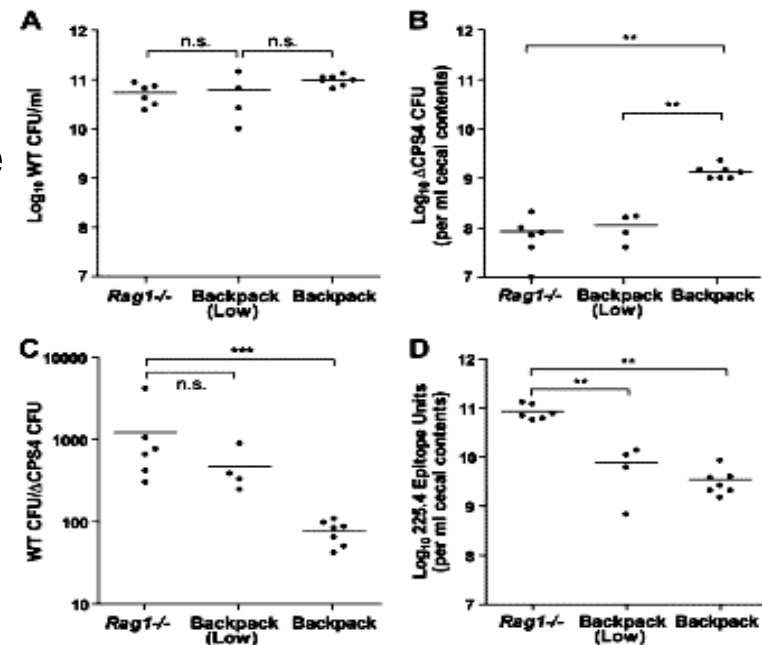


# Preuves expérimentales du rôle des IgA dans le contrôle de la flore commensale

Souris axénique monocontaminée par une seule espèce bactérienne, *Bacteroides thetaiotaomicron*:

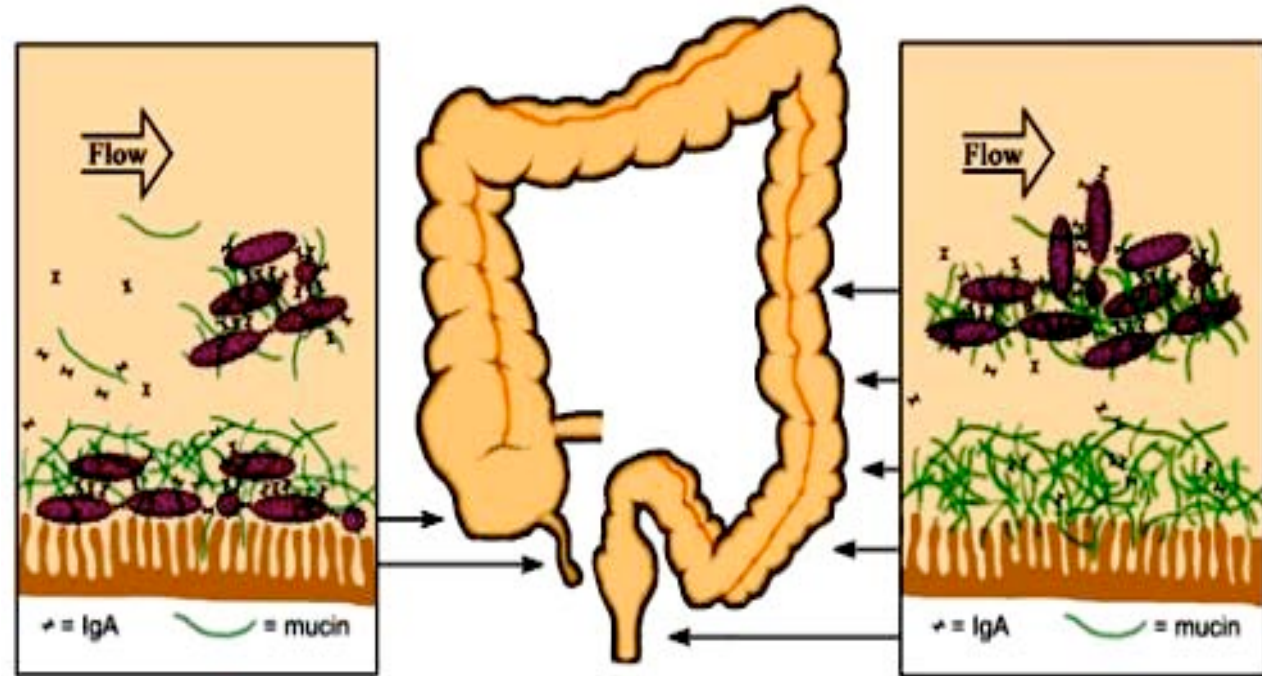
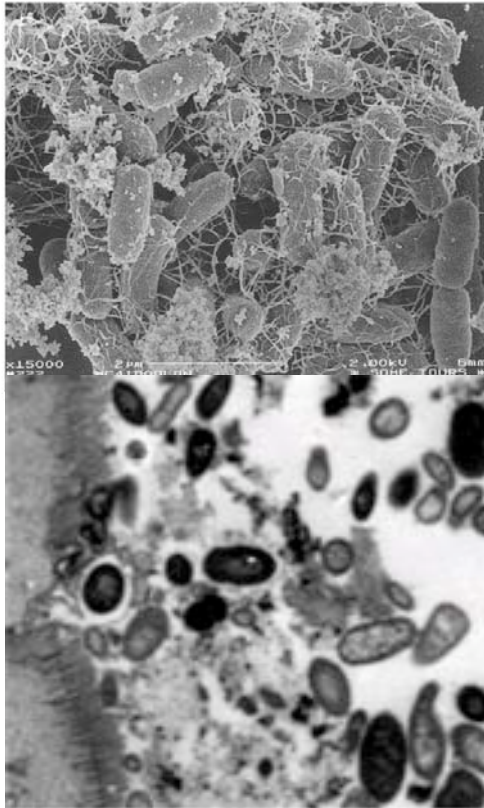
Souris wt, *Rag*<sup>-/-</sup> (pas d'anticorps), et *Rag*<sup>-/-</sup> greffée avec un hybridome monoclonal produisant une IgA reconnaissant un épitope capsulaire de *B.t.* Les souris *Rag*<sup>-/-</sup> sans IgA développent une réponse innée plus robuste que les *Rag*<sup>-/-</sup> complémentées par l'hybridome et les bactéries des *Rag*<sup>-/-</sup> montrent une induction des gènes impliqués dans la résistance au stress oxydatif. L'IgA réduit l'inflammation intestinale mais aussi l'expression de l'épitope bactérien (diminution d'expression de la capsule) diminuant ainsi le « fitness » de la souche.

Rôle des IgA intestinales centrales dans l'exclusion immune, le contrôle de la réponse innée/inflammatoire et la génération de la diversité microbienne par contrôle du « fitness » des espèces individuelles.



# Role des IgA sécrétoires dans la formation des biofilms bactériens à la surface de la muqueuse intestinale ?

## « Inclusion Immune »



Rôle de l'appendice dans le réensemencement de la flore colique ?

# Intestin: un site de privilège immunitaire

## 3 - Cellules T régulatrices

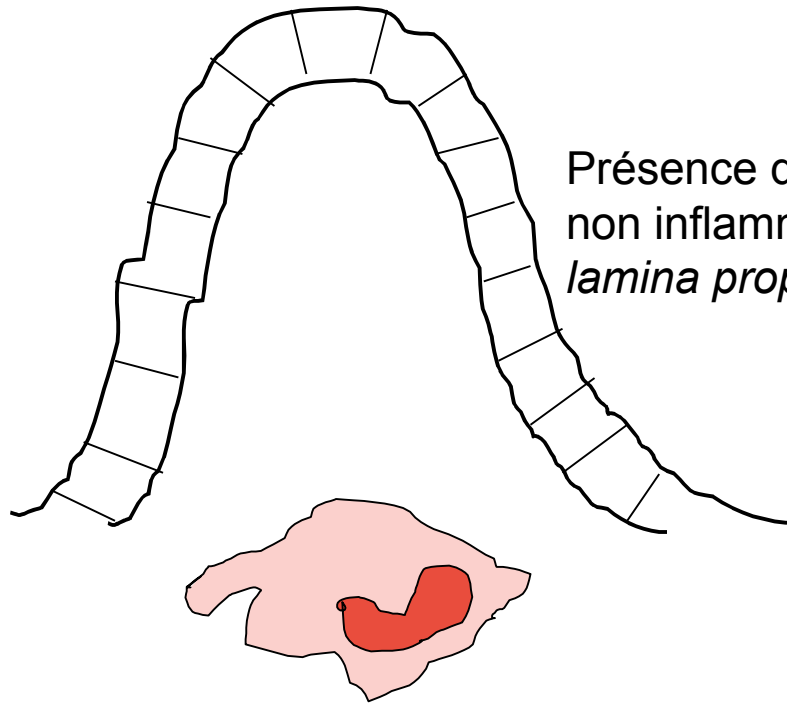
- APCs tolérogènes.
- Cellules phagocytaires: « anergie inflammatoire » (CD14-).
- Cellules T régulatrices (Treg):
  - CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, expression du facteur de transcription Foxp3.
  - Les Tregs suppriment activement les réponses contre les bactéries et antigènes intestinaux.
- Rôle majeur du microbiote lui-même dans l'induction de la tolérance (ex., LPS via TLR4)

Kiyono et coll., 1982, J.Exp.Med.

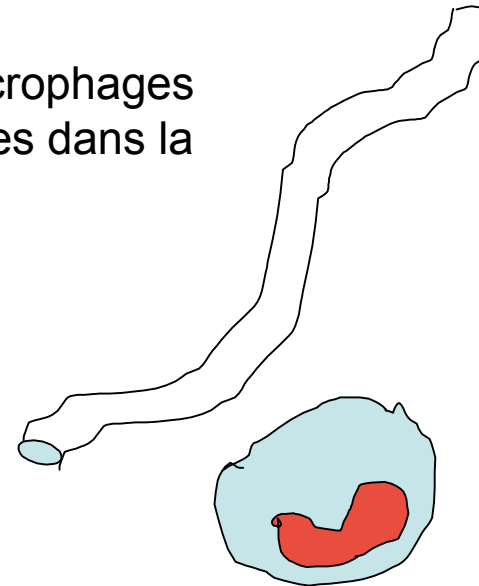
Sudo et coll., 1997, J.Immunol.

Wannemuehler et coll., 1982, J.Immunol.

## Macrophages intestinaux



## Monocytes sanguins



HLA-DR, CD13, CD36  
 TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII  
 CD14, CD25  
 CD89, CD16  
 CD80, CD86, CD40  
 C5aR, FMLPR  
 CCR5, CXCR4  
 TREM-1

+  
+  
-  
-  
-  
-  
-

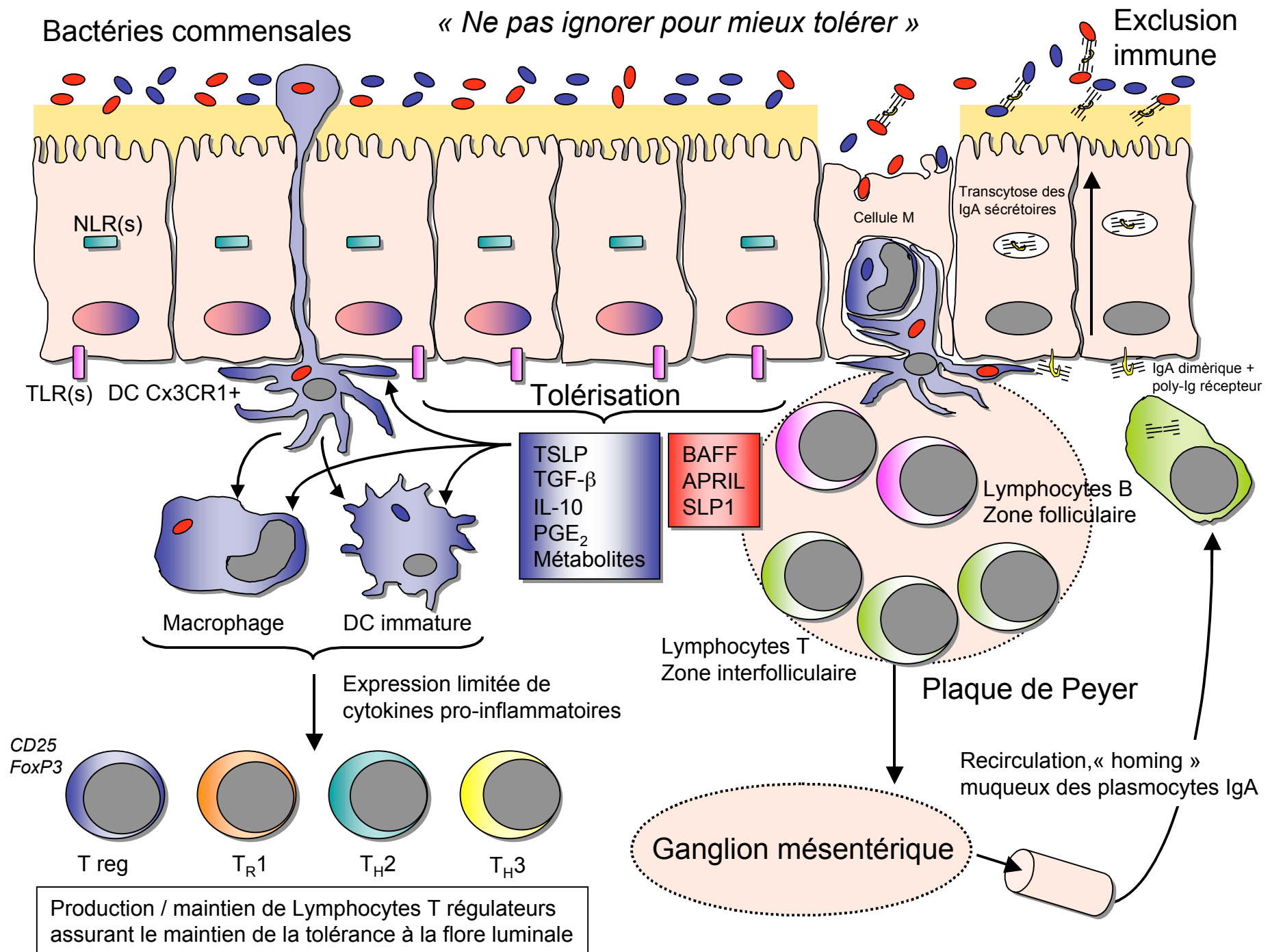
+  
+  
+  
+  
+  
+  
+

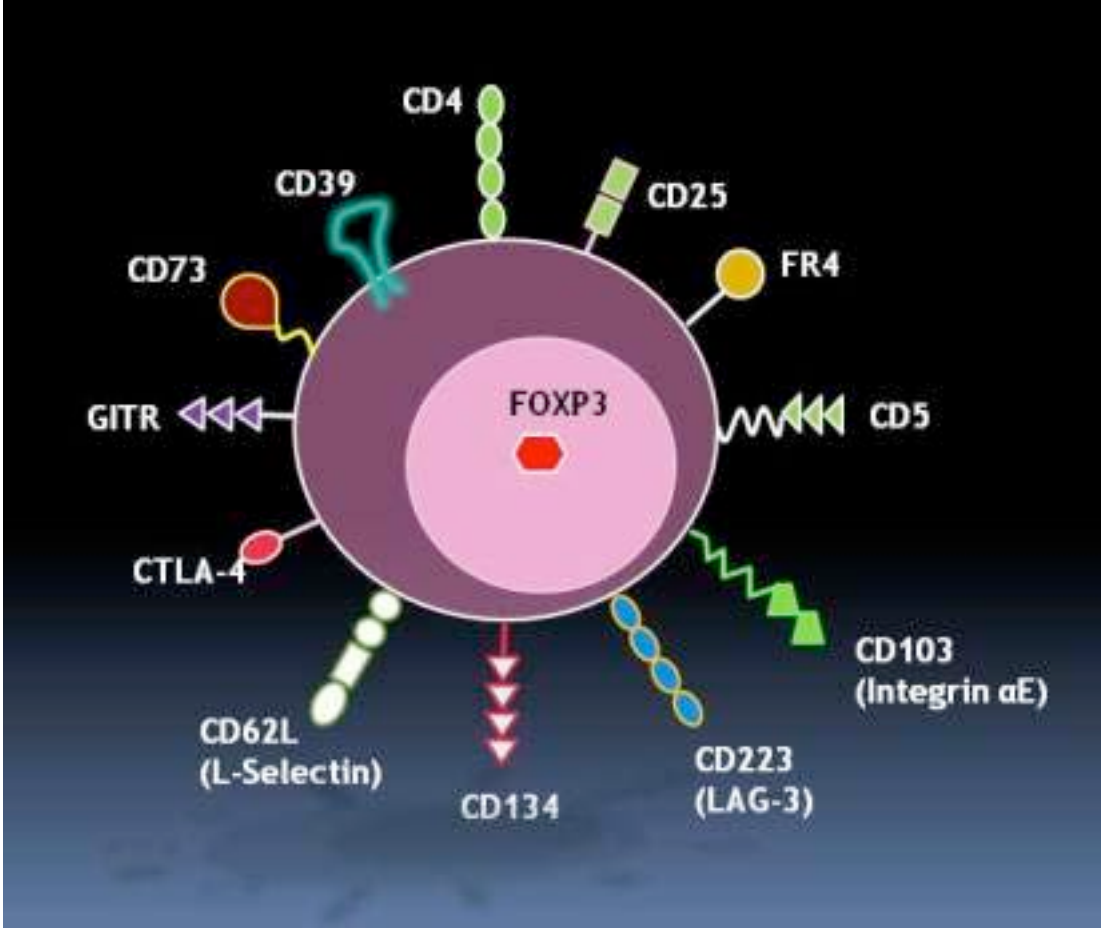
Phagocytose  
 Killing  
 Chimiotactisme  
 Resp. burst  
 Prés Ag  
 Product. cytokines

+  
+  
-  
-  
-  
-

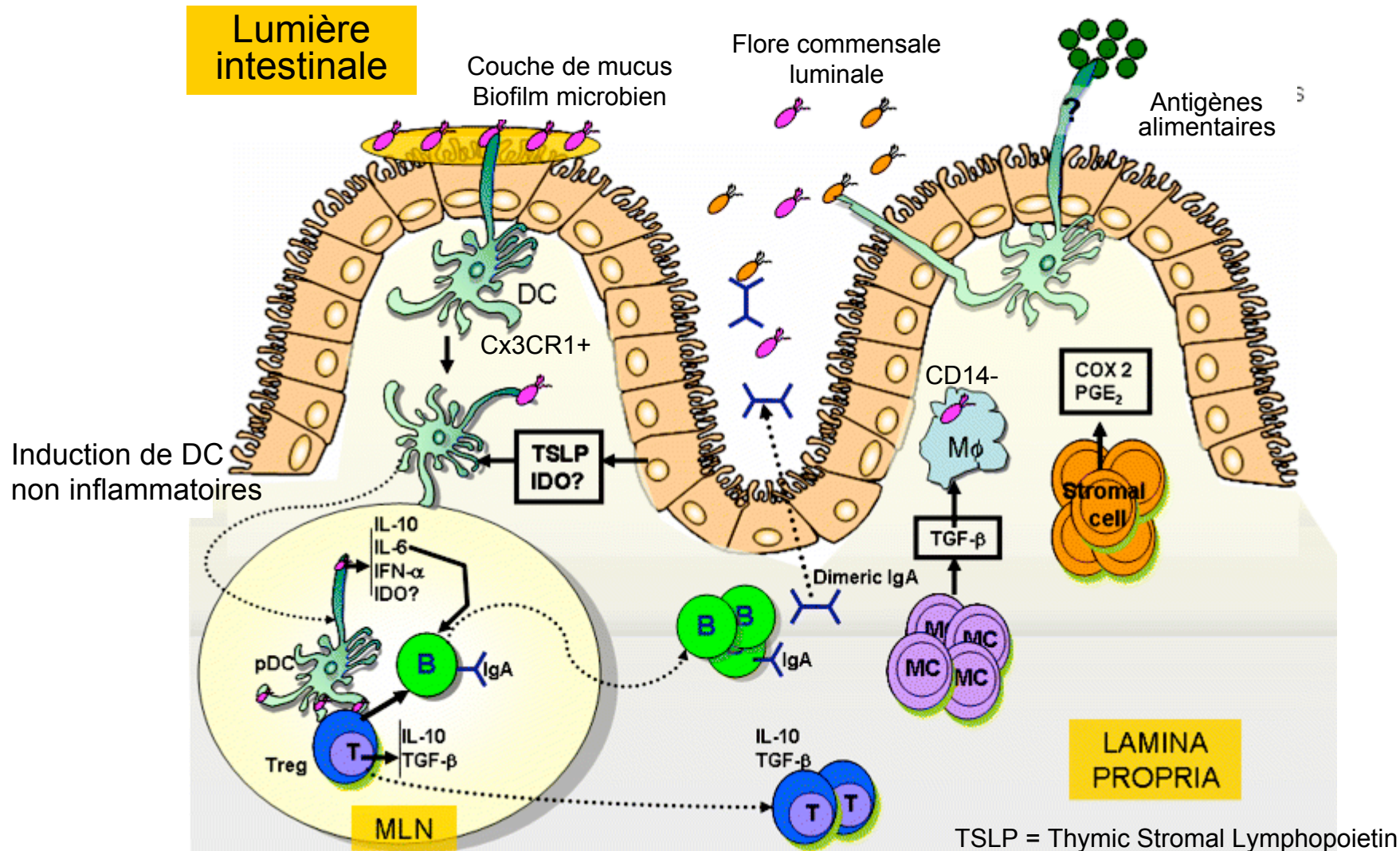
+  
+  
+  
+  
+  
+



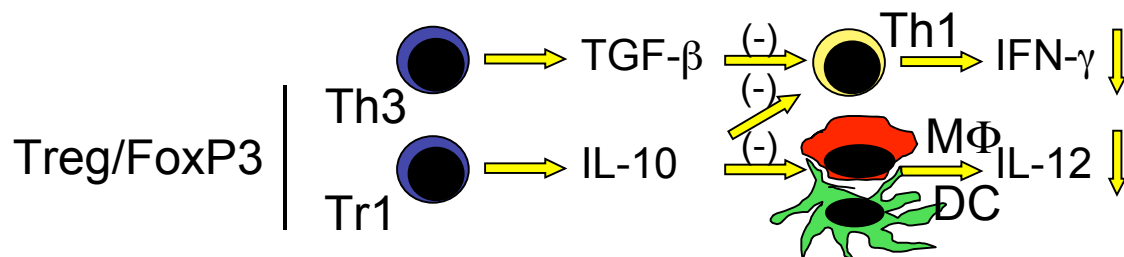




# Tolérance intestinale aux antigènes alimentaires et au microbiote commensal



TSLP = Thymic Stromal Lymphopoietin  
IDO = indoleamine-2,3-dioxygenase



## Rôle actif du microbiote dans le contrôle de l'inflammation intestinale

Des souris maintenues dès la naissance en environnement axénique sont déficientes en lymphocytes CD4<sup>+</sup> CD45<sup>low</sup> qui comprennent les populations de lymphocytes T régulateurs (Treg) contrôlant l'inflammation intestinale (Makita S et coll. 2007. J.Immunol.,178:4937-).

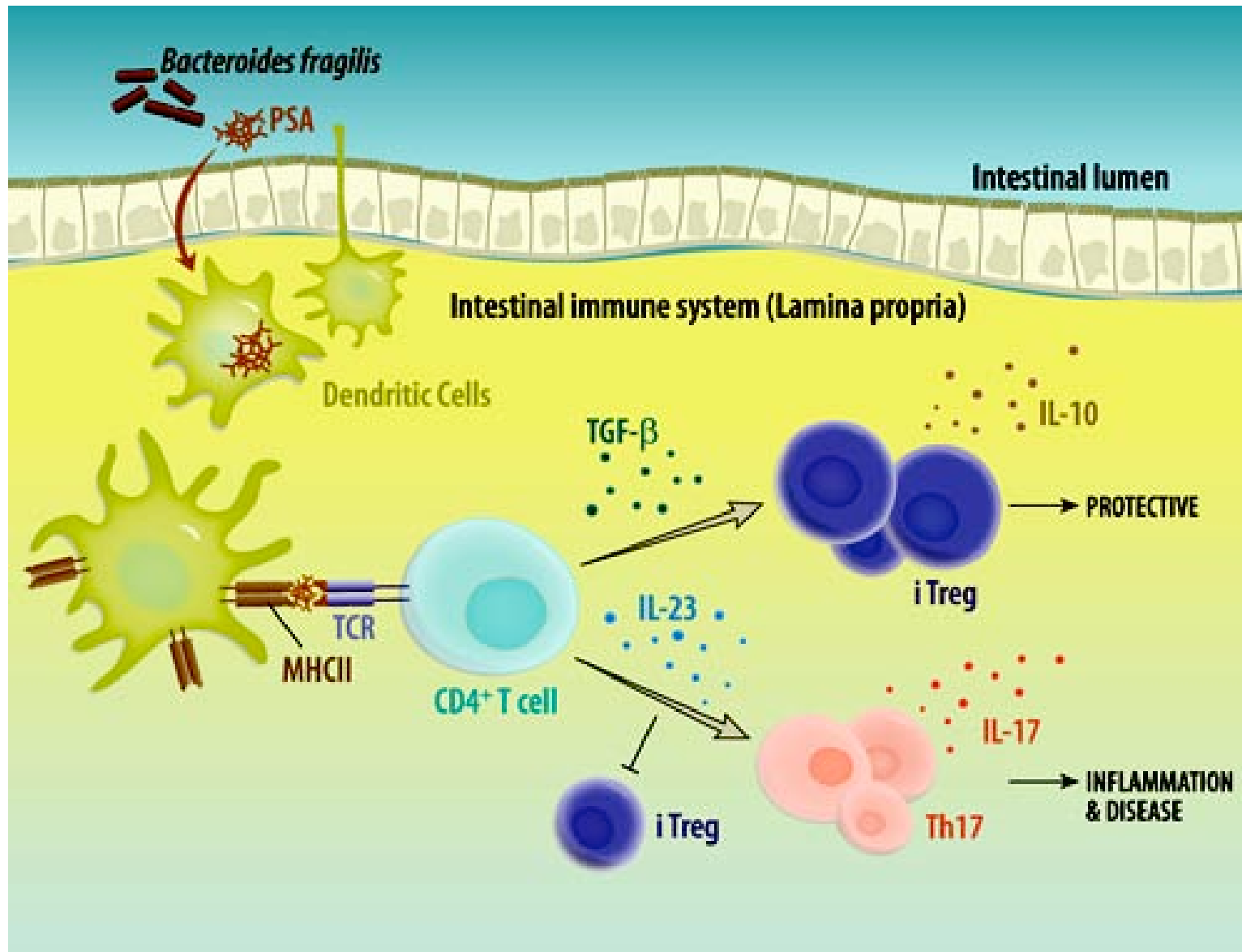
*Bacteroides fragilis* un composant dominant du microbiote intestinal des mammifères est capable de corriger ce déficit et de promouvoir un équilibre entre les populations lymphocytaires Th1 et Th2 (Mazmanian SK et coll. 2005. Cell,122:107-; Mazmanian SK et coll. 2008. Nature,453:620-).

La molécule effectrice est le polysaccharide capsulaire zwitterionique (PSA). Les DC de la lamina propria sont capables d'étendre des pseudopodes luminaux capturant PSA et, dans un processus TLR2-dépendant, le présentent via le MHC classe II (Wang Q et coll. 2006. J.Exp.Med.,203:2853-).

En présence de TGF- $\beta$  produit en particulier par l'épithélium, ces lymphocytes T acquièrent un phénotype Treg (Treg induits ou iTreg) caractérisé par la production d'IL-10.

Ce processus prend le dessus sur la production de cytokines proinflammatoires par les cellules Th1 et Th17 en réponse à l'IL-23 tel qu'observé dans deux modèles d'entéocolites induites (TNBS et *Helicobacter hepaticus*) marquées aussi par la production massive de TNF- $\alpha$ .

## Rôle actif du microbiote dans le contrôle de l'inflammation intestinale



D'après Mazmanian SK & Kasper DL. 2006. Nat.Rev.Immunol.,6:849-)



# Immunoprivilège intestinal: tolérance aux antigènes alimentaires et au microbiote commensal

