



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme AMBRE RIBA

le mardi 3 février 2015

Titre :

CONSEQUENCES D'UN STRESS DE SEPARATION MATERNELLE SUR
L'HOMÉOSTASIE INTESTINALE CHEZ LE JEUNE ADULTE

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

ToxAlim

Directeur(s) de Thèse :

MME SANDRINE MENARD

MME VASSILIA THEODOROU

Rapporteurs :

Mme CORINNE GRANGETTE, INSTITUT PASTEUR

Mme DOMINIQUE BUZONI, INRA TOURS

Mme MURIEL THOMAS, INRA JOUY EN JOSAS

Membre(s) du jury :

M. PHILIPPE VALET, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. BRUNO BONAZ, CHU GRENOBLE, Membre

Mme SANDRINE MENARD, INRA TOULOUSE, Membre

Mme VALERIE GABORIAU-ROUTHIAU, INSERM PARIS, Membre

Mme VASSILIA THEODOROU, EI PURPAN, Membre

A ma mère, mon père, ma petite sœur,

A mes amis proches ou lointains,

A Loïc.

Remerciements

Voici l'aboutissement de trois années de travail, de passion et d'amitié. Bien que seul mon nom apparaisse sur la première page de ce manuscrit, il est le fruit d'une large et intense collaboration.

Je tiens à remercier les Dr. Dominique Buzoni-Gatel, Dr. Corinne Grangette et Dr. Muriel Thomas, Rapportrices et les Dr. Bruno Bonaz et Dr. Valérie Gaboriau-Routhiau, examinateurs, d'avoir accepté de lire et jurer mes travaux de thèse.

Je présente également mes remerciements aux Dr Helene Eutamene et Dr Thierry Piche d'avoir participé à mon comité de thèse et pour leurs échanges constructifs.

Je tiens à adresser des remerciements tout particuliers au Dr Vassilia Theodorou pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, offert une chance de faire mes preuves et d'avoir co-encadré cette thèse. Merci d'avoir joué le président de jury... ah cette neige, je ne suis pas prête de l'oublier.

Je tiens à présenter mes plus chaleureux remerciements au Dr Sandrine Menard, co-encadrante de cette thèse. J'ai énormément appris à ton contact, que ce soit d'un point de vue scientifique, technique ou humain. Tu as su me faire partager ta passion de la recherche et de la « bonne science ». Pour tout cela et tout le reste, un grand merci.

J'adresse également mes remerciements aux Dr Sonia Lacroix-Lamandé et Dr Fabrice Laurent de l'équipe AIM, UMR1282, INRA, d'avoir accepté de collaborer et participer activement dans ces travaux de thèse.

Je tiens également à présenter mes remerciements à l'équipe pédagogique de l'IUT de Auch et en particulier le Dr Valérie Gabriel, m'offrant l'opportunité de découvrir le monde de l'enseignement. Un merci spécial pour Hervé, nouvel arrivant dans l'équipe.

A Corinne, merci pour ta rigueur dans tout ce que tu entreprends, ta patience dans ma pagaille et ta gentillesse au quotidien.

A Marion, sans qui cela aurait été impossible. Tu m'as montré tout ce que tu savais et toujours été disponible quand il le fallait. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

A Sophie. Courage pour ta thèse, amuse-toi autant que moi et rendez-vous dans 3 ans.

A Cathy, Valérie T, Christel, Guylene, Joëlle, Soraya et Cherryl, pour leur rire, petites histoires drôles au café ou à midi. Valérie, je n'oublierais jamais notre première rencontre et comment tout a commencé... A Valérie Ba, notre ACP, merci pour tous tes conseils en matière de protection et de sécurité mais aussi pour tous tes remèdes.

A Laurence, je souhaite simplement te remercier pour ton support et ton sourire quotidien. Tu as toujours été de bons conseils et j'ai toujours pu parler de tout avec toi.

Aux « nouveaux » docteurs ou post doc qui ont su me montrer l'exemple et me soutenir durant toute la durée de cette thèse : Delphine, Lara, Stéphanie, Nabila, Océane et Orshi. Grace à vous, j'ai vu que c'était possible d'être docteur même quand tout va de travers.

A Mathilde, Valérie Be, Maiwenn et Simona pour leur bonne humeur et leur aide. Merci également à Laurent et Christine pour leurs conseils et échanges, vous avez toujours été ouvert à la discussion. Je souhaite également remercier Marine et Virginie, mes petites stagiaires. Le sujet et le travail n'était pas toujours facile mais vous avez toujours fait preuve d'enthousiasme. Je remercie également Caroline et toute l'équipe animalerie pour leur aide au quotidien.

A E11, l'équipe « petite sœur » ! Eric², je n'oublierai pas votre humour à toute épreuve. Sarah, je te souhaite autant de plaisir que de réussite. Yann, profite de cette thèse au max ! Bonne change à tous les deux.

A mes amis... Aux copains-copines « Vert Potam », aux copains-copines de l'IUT Génie Méca, à Laure et Yohan, amitié de longue date, à Oriane et autres amis de Nantes... Ces trois années ont vraiment été dures mais vous avez tous su être là. Votre bonne humeur et joie de vivre à vous tous va beaucoup me manquer.

A ma famille... qui a toujours su être présente et unie pour les choses importantes. Merci d'avoir su me soutenir, me supporter et d'avoir cru en moi. Vous m'avez appris que rien n'est impossible du moment que l'on s'en donne les moyens. Je n'oublie pas mes grands-parents et je souhaite également remercier chaleureusement ma belle-famille, parents et grands-parents Platon – Lacroix, pour leur présence et leur soutien.

A Loïc. Les mots me manquent pour te dire combien tu as été essentiel dans ce travail. Tu m'as toujours soutenu quelqu'on été mes choix. Ton soutien inconditionnel mais également ta vigilance ont su canaliser toute l'énergie nécessaire pour réussir au mieux. Aujourd'hui, une page se tourne et nous voilà parti pour de nouvelles péripéties dans le pays de la moules frites. Merci d'avoir rendu cela possible.

Enfin, un grand merci à tous ce qui ne sont pas cités ici mais que je n'oublie pas pour autant. Il ne vous reste plus qu'à venir dans le plat pays une fois, afin que cette aventure ne finisse jamais. N'oubliez pas, la Belgique, ce n'est pas si loin !

Liste des publications, communications orales et affichées

Publications:

- Early life stressful events weakened intestinal barrier functions leading to abnormal systemic immune response toward commensal *E. coli* population in adult mice.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, V. Théodorou, S. Ménard. *En révision "Psychoneuroendocrinology"*
- Early life stressful events impaired enteric antimicrobial activity associated with commensal *E. coli* overgrowth responsible for visceral hypersensitivity in adult mice
A. Riba, M. Olier, S. Lacroix-Lamandé, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, C. Salvador-Cartier, F. Laurent, V. Théodorou, S. Ménard. *En cours de rédaction*

Communications orales:

- Effet d'un stress de séparation maternelle sur la réponse immunitaire vis à vis du microbiote.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, V. Théodorou, S. Ménard. *Club d'Etude de la Cellule Epithéliale Digestive, Paris, France Mars 2014.*
- Effet d'un stress de séparation maternelle sur la réponse immunitaire vis à vis du microbiote.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, V. Théodorou, S. Ménard. *Journée scientifique de l'INRA de ToxAlim, Toulouse, France Décembre 2013.*
- Le stress de séparation maternelle altère la réponse immunitaire vis à vis du contenu luminal.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, V. Théodorou, S. Ménard. *Groupe Français de NeuroGastroentérologie, Grenoble, France Juin 2013.*

Communications affichées:

- Early maternal separation in mice triggers a specific immune response against commensal microbiota at adulthood.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, V. Théodorou, S. Ménard. *European Mucosal Immunity Group, Glasgow, UK, 2014.*
- Early maternal separation induces commensal *E. coli* overgrowth associated with specific immune response in mice at adulthood.
A. Riba, M. Olier, S. Lacroix-Lamandé, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, C. Salvador-Cartier, F. Laurent, V. Théodorou, S. Ménard. *European Mucosal Immunity Group, Glasgow, UK, 2014.*
- Early maternal separation in mice triggers a specific immune response against commensal microbiota at adulthood.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, **V. Théodorou**, S. Ménard. *Digestive Diseases Week, Chicago, USA, 2014.*
- Early maternal separation induces commensal *E. coli* overgrowth associated with specific immune response in mice at adulthood.

A. Riba, M. Olier, S. Lacroix-Lamandé, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, C. Salvador-Cartier, F. Laurent, **V. Théodorou**, S. Ménard. *Digestive Diseases Week, Chicago, USA, 2014.*

- Early maternal separation in mice triggers a specific immune response against microbiota at adulthood.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, V. Théodorou, **S. Ménard**. *International Congress of Mucosal Immunity, Vancouver, Canada, 2013.*
- Early maternal separation in mice triggers a specific immune response against luminal contents at adulthood.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, **V. Théodorou**, S. Ménard. *Digestive Diseases Week, Orlando, USA, 2013.*
- Early maternal separation in mice triggers a specific immune response against microbiota at adulthood.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, V. Théodorou, **S. Ménard**. *Cell Symposia: Microbiome and Host Health, Lisbonne, Portugal 2013.*

Prix et distinctions:

- **Poster of distinction, Digestive Diseases Week:**
 - Early maternal separation induces commensal *E. coli* overgrowth associated with specific immune response in mice at adulthood.
A. Riba, M. Olier, S. Lacroix-Lamandé, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, C. Salvador-Cartier, F. Laurent, **V. Théodorou**, S. Ménard. *Digestive Diseases Week, Chicago, USA, 2014.*
- **Bourse de voyage, Groupe Français de NeuroGastroentérologie:**
 - Early maternal separation in mice triggers a specific immune response against commensal microbiota at adulthood.
A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M. Olier, V. Théodorou, S. Ménard. *European Mucosal Immunity Group, Glasgow, UK, 2014.*
 - Early maternal separation induces commensal *E. coli* overgrowth associated with specific immune response in mice at adulthood.
A. Riba, M. Olier, S. Lacroix-Lamandé, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, C. Salvador-Cartier, F. Laurent, V. Théodorou, S. Ménard. *European Mucosal Immunity Group, Glasgow, UK, 2014.*

Liste des abréviations

ACTH : AdrenoCorticoTrophine Hormone

AGCC : Acides Gras à Chaines Courtes

BAAF : Bactéries Aéro-Anaérobies Facultatives

BAS : Bactéries Anaérobies Strictes

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CRAMP : Cathelicidin Related Antimicrobial Peptide

CRF : Corticotropin Releasing Factor

CRS : Cryptdin Related Sequence

DC : Dendritic cell

FAE : Follicule Associated Epithelium

FcRn : Récepteur néonatal Fc

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization

GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue

GRP : Gastrin Releasing Peptide

IEL : Intra Epithelial Lymphocyte

IFN γ : Interféron γ

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC : Cellule Lymphoïde Innée

IRAK 1: IL1 Receptor Associated Kinase 1

JAM : Junctional Adhesion Molecule

LPS : LipoPolySaccharide

LRR : Leucin Rich Repeat

LT : Lymphocyte T

Mad-CAM1 : Mucosal Addressing Cell Adhesion Molecule 1

MAMP : Microbiota Associated Molecular Pattern

MC : Maladie de Crohn

MDA5 : Melanoma Differentiation -associated gene 5

MDP : Muramyl DiPeptide

CMHII : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MLC : Myosin Light Chain

MLCK : Myosin Light Chain Kinase

MyD88 : Myeloid Differentiation factor 88

NK : Natural Killer

NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain

NPY : Neuropeptide Y

PAM : Peptide ou Protéine AntiMicrobien

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

CP : Cellule de Paneth

PRR : Pattern Recognition Receptor

GAR : Gène d'Activation de Recombinaison

RCH : Recto-Colite Hémorragique

RIG-I : Retinoïc Acid-inductible gene 1

SFB : Segmented Filamentous Bacteria

SIBO : Small Intestinal Bacterial Overgrowth

IgAS : Immunoglobuline A Sécrétoire

SII : Syndrome de l'Intestin Irritable

SNC : Système Nerveux Central

SNE : Système Nerveux Entérique

SSM : Stress de Séparation Maternelle

TB : Translocation Bactérienne

TCR : T Cell Receptor

TD : Tractus Digestif

TGF β : Transforming Growth Factor β

Th : Lymphocyte T auxilliaire (T Helper)

TIR : Toll IL1 Receptor homology

TLR : Toll Like Receptor

TNBS : 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

Treg : Lymphocyte T Régulateur

UFC : Unités Formant Colonies

WAS : Water Avoidance Stress

ZO : Zonula Occludens

Liste des figures

Figure 1 : Organisation structurale de la paroi digestive	24
Figure 2 : Eléments composants la muqueuse intestinale au niveau de l'iléon (Muniz, Knosp et al. 2012).....	28
Figure 3 : Perméabilité intestinale par la voie paracellulaire et structures associées.....	31
Figure 4 : Perméabilité intestinale par la voie transcellulaire	33
Figure 5 : Modèle Shai-Matsuzaki-Ynag des mécanismes d'action des peptides antimicrobiens (Zasloff 2002).....	41
Figure 6 : Comparaison de la structure du mucus dans l'intestin grêle et le côlon (adapté de (Johansson, Larsson et al. 2011) (McGuckin, Linden et al. 2011))	46
Figure 7 : Classification des cellules lymphoïdes innées et critères fonctionnels (Spits, Artis et al. 2013).....	48
Figure 8 : Les TLRs et leurs ligands (Kawai and Akira 2006)	51
Figure 9 : Organisation structurale d'une plaque de Peyer et capture de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Hooper and Macpherson 2010).....	56
Figure 10 : Différenciation des lymphocytes T et profil de réponse cellulaire Th	59
Figure 11 : Evolution du microbiote intestinal selon l'âge et les facteurs environnementaux (Ottman, Smidt et al. 2012).....	62
Figure 12 : Détermination du groupe phylogénique des <i>E. coli</i> (Clermont, Bonacorsi et al. 2000).....	69
Figure 13 : Evolution de la réponse immunitaire innée et adaptative du nouveau-né jusqu'à l'âge adulte (Renz, Brandtzaeg et al. 2011)	77
Figure 14 : Organisation schématique de l'axe HPA (Hiller-Sturmhofel and Bartke 1998)....	79
Figure 15 : Protocole de stress de séparation maternelle chez le rat (O'Mahony, Hyland et al. 2011).....	92
Figure 16 : Protocole de Stress de Séparation Maternelle (SSM) chez la souris C3H/HeN	94
Figure 17 : Résultats du protocole d'infection par <i>Listeria</i> et <i>Salmonella</i>	140
Figure 18 : Activité antimicrobienne du lysozyme	144
Figure 19 : Protocole d'adoption suite à une SSM chez la souris C3H/HeN	146
Figure 20 : Mesure de la perméabilité intestinale totale au FITC Dextran 4kDa	148
Figure 21 : Résumé des résultats obtenus dans le modèle de SSM chez la souris.....	150

RESUME

En période néonatale, la muqueuse intestinale est immature et particulièrement perméable, notamment aux facteurs environnementaux comme les toxiques, les infections mais aussi les événements stressants. De la bonne maturation de la barrière intestinale va dépendre la mise en place de l'homéostasie intestinale et donc la tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux. La survenue d'événements stressants durant la petite enfance est associée au déclenchement et/ou l'entretien de pathologies gastro-intestinales fonctionnelles comme le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) mais aussi organiques comme les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). De plus, ces pathologies malgré leurs différences dans la sévérité et les signes cliniques, partagent un certain nombre de caractéristiques physiopathologiques communes, comme la rupture de l'intégrité de la barrière intestinale associée à une rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux et plus particulièrement contre le microbiote intestinal.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer les effets d'un Stress de Séparation Maternelle (SSM) sur l'homéostasie intestinale et la réponse immunitaire vis-à-vis du microbiote commensal chez la souris jeune adulte. Nos résultats ont mis en évidence un dimorphisme sexuel dans ce modèle.

Chez les souris mâles jeunes adultes, le SSM diminue les fonctions de la barrière intestinale associée à une altération de la réponse humorale et cellulaire au niveau systémique vis-à-vis du microbiote commensal, ainsi qu'à un défaut des cellules présentatrices d'antigènes, conduisant à une inflammation de bas grade malgré un profil proinflammatoire des lymphocytes T.

Chez les souris femelles jeunes adultes, le SSM altère la fonctionnalité des cellules de Paneth associée à surpopulation bactérienne intestinale, responsable de la sensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale et une réponse humorale systémique dirigée contre le microbiote commensal.

Nous avons mis en évidence une empreinte du SSM chez le jeune adulte, capable d'induire des modifications profondes de l'homéostasie intestinale ainsi que de la réponse immunitaire systémique contre le microbiote intestinal. Le SSM altère l'homéostasie intestinale et reproduit des caractéristiques communes aux pathologies digestives à savoir une rupture de barrière associée à une réponse immunitaire contre le microbiote sans symptômes majeurs.

Ce travail a permis d'identifier la survenue d'événements stressants pendant la petite enfance comme un facteur environnemental important capable d'altérer l'homéostasie intestinale chez des individus sains et qui pourrait contribuer au déclenchement de pathologies intestinales chez des individus génétiquement prédisposés.

Mot clés : Homéostasie intestinale, Réponse humorale, Réponse cellulaire, Stress de Séparation maternelle, Cellules de Paneth, Activité antimicrobienne, Sensibilité viscérale, Pathologies intestinales, Microbiote.

ABSTRACT

Perinatal period is characterized by an immature intestinal barrier particularly permeable to luminal antigens and as such highly vulnerable to environmental factors like toxins, infections or stressful events. The appropriate maturation of intestinal barrier leads to intestinal homeostasis and tolerance toward luminal contents. Early life stressful events are associated with the development and/or maintenance of functional gastrointestinal disorders like Irritable Bowel Syndrome (IBS) or organic one like Inflammatory Bowel Diseases (IBD). These pathologies are highly different in term of etiology and clinical severity however they share common features like alteration in intestinal barrier associated with an abnormal immune response toward luminal contents especially commensal microbiota.

Our aim was to evaluate the consequences of maternal separation (MS) on intestinal homeostasis, host-microbiota relationship and the humoral and cellular response at adulthood. Due to sexual dimorphism in this model, the results are presented separately for male and female.

In young adult male mice, MS decreases intestinal barrier functions associated with an alteration of systemic humoral and cellular response toward commensal microbiota. Moreover, a defect of antigen presenting cells in spleen leads to systemic low grade inflammation despite a pro-inflammatory profile of T cell.

In young adult female mice, MS alters the functionality of Paneth cells associated with an intestinal bacterial overgrowth, leading to visceral sensitivity and systemic humoral response toward commensal microbiota.

We highlighted that MS has long lasting adverse effects on intestinal homeostasis and systemic immune response toward commensal microbiota in young adult. MS impairs intestinal homeostasis in healthy individuals and might contribute to trigger intestinal pathologies in susceptible persons.

Key words: Intestinal homeostasis, Humoral response, Cellular response, Maternal separation, Paneth cells, Antimicrobial activity, Visceral sensitivity, Gastrointestinal pathologies, Microbiota

SOMMAIRE

Remerciements	4
Liste des publications, communications orales et affichées	6
Publications:	6
Communications orales:	6
Communications affichées:	6
Prix et distinctions:	7
Liste des abréviations	8
Liste des figures	11
RESUME.....	12
ABSTRACT	13
SOMMAIRE	14
INTRODUCTION.....	19
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	21
Chapitre I : Barrière & Homéostasie intestinale chez l'adulte.....	23
I. Présentation générale de l'intestin.....	23
A. Anatomie et fonction de l'intestin	23
1. Description anatomique	23
2. La paroi intestinale.....	24
B. Système nerveux entérique.....	25
1. Description.....	25
2. La sensibilité viscérale.....	26
C. La muqueuse intestinale	27
1. Organisation structurelle.....	27
2. Perméabilité de l'épithélium intestinal	30
i. La voie paracellulaire	30
ii. La voie transcellulaire	32
iii. La translocation bactérienne.....	35
II. Immunité innée intestinale	36
A. L'activité antimicrobienne.....	36
1. Les peptides et protéines antimicrobiens (PAM).....	37
i. Le lysozyme	37
ii. Les défensines	37

iii. Les cathélicidines	38
iv. La phospholipase A2	39
v. L'angiogénine.....	39
vi. Les lectines.....	39
2. Mode de sécrétion des PAM.....	40
3. Mode d'action des PAM	41
4. L'activité immunomodulatrice des PAM.....	42
i. Propriétés chimiotactiques et régulatrices dans l'activation des cellules immunitaires	42
ii. Modulation de l'inflammation par les cathélicidines.....	42
B. Le mucus, interface protectrice et d'échange	43
1. Les cellules caliciformes.....	43
2. Organisation fonctionnelle du mucus	44
i. Les mucines.....	44
ii. Barrière antimicrobienne au niveau de l'iléon	45
iii. Niche écologique au niveau du côlon	46
C. Les cellules de l'immunité innée	48
1. Les cellules lymphoïdes innées.....	48
2. Les mastocytes	50
3. Les récepteurs de l'immunité innée	51
i. Les TLRs	51
ii. Les NODs	52
III. Le GALT et immunité acquise	53
A. Les organes lymphoïdes de la muqueuse intestinale.....	53
1. Les plaques de Peyer.....	53
2. Cryptopatches et follicules lymphoïdes isolés.....	54
3. Les cellules dendritiques : cellules de reconnaissance et d'activation	54
B. La réponse immunitaire au sein de la muqueuse intestinale.....	55
1. La réponse humorale.....	56
2. La réponse cellulaire T.....	57
3. Les lymphocytes intra-épithéliaux.....	60
IV. Le microbiote intestinal	61
A. Description et composition.....	61
B. Rôles physiologiques.....	63
1. Participation à la nutrition.....	63

2.	Barrière physique écologique	63
3.	Rôle dans la maturation de la barrière intestinale et la mise en place de la tolérance 64	
Chapitre II :	Développement périnatal de la barrière intestinale.....	67
I.	Colonisation par le microbiote intestinal	67
A.	Primo-colonisation, processus dynamique	67
B.	<i>Escherichia coli</i> : bactérie primo-colonisatrice	69
C.	Facteurs influençant le microbiote	71
II.	Développement de la muqueuse intestinale	72
A.	L'hyperperméabilité intestinale	72
B.	Interaction entre le microbiote et l'épithélium intestinal.....	73
C.	Evolution de la réponse immunitaire innée	74
1.	Modulation de l'activité antimicrobienne	74
2.	Les récepteurs de l'immunité innée	75
D.	Mise en place de la réponse adaptative	76
1.	Les cellules T régulatrices (Treg)	76
2.	Le profil pro Th2.....	76
3.	La réponse humorale locale	77
Chapitre III :	Stress et altération de la barrière intestinale.....	78
I.	Le stress et son effet sur la barrière intestinale	78
A.	Le stress	78
1.	Définition et contexte.....	78
2.	L'axe HPA	78
B.	La sensibilité viscérale et l'hyperperméabilité intestinale, deux marqueurs du stress sur la barrière intestinale.....	80
1.	La sensibilité viscérale.....	80
2.	L'hyperperméabilité intestinale	80
C.	Effets immunomodulateurs du stress.....	81
II.	Les pathologies intestinales associées au stress	83
A.	Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin.....	83
1.	Description.....	83
2.	La Maladie de Crohn	84
B.	Le Syndrome de l'Intestin Irritable :	86
1.	Description et épidémiologie	86
2.	Mécanismes physiopathologiques	87
C.	Le Small Intestinal Bacterial Overgrowth.....	89

III. Le stress de séparation maternelle (SSM)	90
A. Le modèle de SSM	91
1. La période post natale, une période d'hyporéponse.....	91
2. Principe du SSM	91
B. Choix du protocole expérimental	93
OBJECTIFS	95
RESULTATS EXPERIMENTAUX	97
Résultat I :.....	99
Résultat II:	119
DISCUSSION GENERALE	137
I. Le SSM altère la barrière intestinale et conduit à une inflammation de bas grade, au niveau systémique, chez les individus mâles jeunes adultes :	138
II. Le SSM altère l'activité antimicrobienne et le microbiote commensal conduisant à une réponse humorale systémique vis-à-vis du microbiote et à une hypersensibilité viscérale chez la femelle jeune adulte:	141
III. Le rôle de la mère dans les conséquences du SMM sur l'homéostasie intestinale chez la descendance adulte.	146
IV. Le SSM induit des conséquences différentes chez le jeune adulte en fonction de son sexe.....	150
CONCLUSION GENERALE	153
Références bibliographiques	155

INTRODUCTION

L'épithélium intestinal est une surface d'échange importante en contact permanent avec les antigènes du contenu luminal. Bien que sa fonction première soit l'entrée des nutriments issus de la digestion des aliments, l'épithélium intestinal joue un rôle important de barrière sélective vis-à-vis des éléments de la lumière intestinale. Barrière physique et immunologique, cet épithélium interagit avec plusieurs acteurs comme le mucus, le microbiote commensal ou le système immunitaire qui lui est associé, le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue). Le dialogue permanent entre ces différents acteurs garanti le maintien de l'homéostasie intestinale, la tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux et le déclenchement d'une réponse immunitaire appropriée en cas d'infection.

A la naissance, la barrière intestinale est immature et évolue durant les premiers jours de vie, en particulier chez le rongeur. La colonisation lors de la mise-bas permet l'établissement d'un microbiote commensal. Ce microbiote et la muqueuse intestinale vont évoluer en parallèle. En effet, au contact des bactéries commensales, l'épithélium se différencie et « apprend » à reconnaître les bactéries qui doivent être tolérées des bactéries pathogènes ou qui pourraient être néfastes à l'hôte, en établissant une réponse immunitaire adaptée à chaque antigène qu'il rencontre. De plus, des structures spécifiques vont se développer permettant l'établissement de l'homéostasie intestinale. Cette période est donc cruciale dans l'établissement de l'homéostasie intestinale.

La survenue d'évènements traumatisants au cours de la petite enfance est associée avec l'apparition et le développement de pathologies digestives organiques et fonctionnelles à l'âge adulte. De plus, le rôle du stress dans le déclenchement et/ou l'entretien de pathologies intestinales telles que le Syndrome de l'Intestin Irritable ou les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin a largement été décrit. Ces pathologies digestives multifactorielles partagent des caractéristiques communes comme une perturbation de l'homéostasie intestinale accompagnée d'une inflammation locale plus ou moins sévère, une sensibilité viscérale et une dysbiose du microbiote associée à une réponse immunitaire anormale vis-à-vis du microbiote commensal. Toutefois, l'impact d'un stress en période périnatale sur la maturation du système immunitaire et l'homéostasie intestinale chez l'adulte ainsi que son potentiel rôle dans le développement de ces pathologies digestives restent peu décrits et font l'objet de ce travail de thèse.

Ces travaux portent sur les conséquences d'un stress en période périnatale sur l'homéostasie intestinale et la réponse au microbiote à l'âge adulte. Un modèle expérimental mimant la survenue d'évènements traumatisants en période périnatale comme le stress de séparation maternelle (SSM) nous a permis de mieux comprendre le rôle du stress sur l'interaction hôte – microbiote commensal offrant de nouvelles pistes dans la compréhension des facteurs environnementaux qui permettent de déclencher et/ou d'entretenir les pathologies digestives chez des individus génétiquement prédisposés.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : Barrière & Homéostasie intestinale chez

I'adulte

I. Présentation générale de l'intestin

Principale surface d'échange entre l'environnement extérieur et le corps humain, le tractus digestif (TD) a pour principale fonction la digestion du bol alimentaire et l'absorption des nutriments, de l'eau et d'électrolytes disponibles dans ce dernier. Il est composé de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin. L'avancé du bol alimentaire est permis par une motricité propre de l'intestin, contrôlée par le système nerveux entérique. L'intestin assure, en plus de sa fonction d'absorption, une fonction de barrière. L'épithélium associé à un système immunitaire adapté (GALT, *Gut Associated Lymphoid Tissue*) constitue une barrière sélective qui assure l'entrée des nutriments et protège l'organisme des agressions extérieures. L'intestin possède des structures spécifiques et adaptées à ses diverses fonctions.

A. Anatomie et fonction de l'intestin

1. Description anatomique

L'intestin se divise en deux parties, l'intestin grêle et le gros intestin.

L'intestin grêle se décompose en 3 segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La longueur de l'intestin grêle peut varier de 4 à 7 mètres et son diamètre est d'environ 5 cm chez l'Homme. La digestion et l'absorption des nutriments disponibles dans le bol alimentaire sont réalisées dans l'intestin grêle. La surface d'échange entre la lumière intestinale et l'organisme est démultipliée au niveau de cette zone par la présence de replis au niveau de la musculaire puis de villosités au niveau de la musculaire de la muqueuse et enfin de microvillosités à la face apicale des cellules de l'épithélium.

Dans le prolongement de l'intestin grêle débute le gros intestin. Il se compose de l'appendice chez l'homme, un vestige du cæcum observable chez les rongeurs. L'appendice ou le cæcum constitue un réservoir à paroi fine de bactéries commensales. Suit le côlon, segment majoritaire, dont la fonction première est la réabsorption de l'eau et des électrolytes dans le bol alimentaire. Le gros intestin se termine par le rectum et le canal anal qui contrôle la défécation.

La motricité intestinale est permise par le système nerveux entérique, système autonome mais en relation avec le système nerveux central.

2. La paroi intestinale

La structure pariétale du tractus digestif s'organise autour de 4 tuniques successives allant de l'extérieur (lumière intestinale) vers l'intérieur (organisme): la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse/musculaire et la séreuse (figure1).

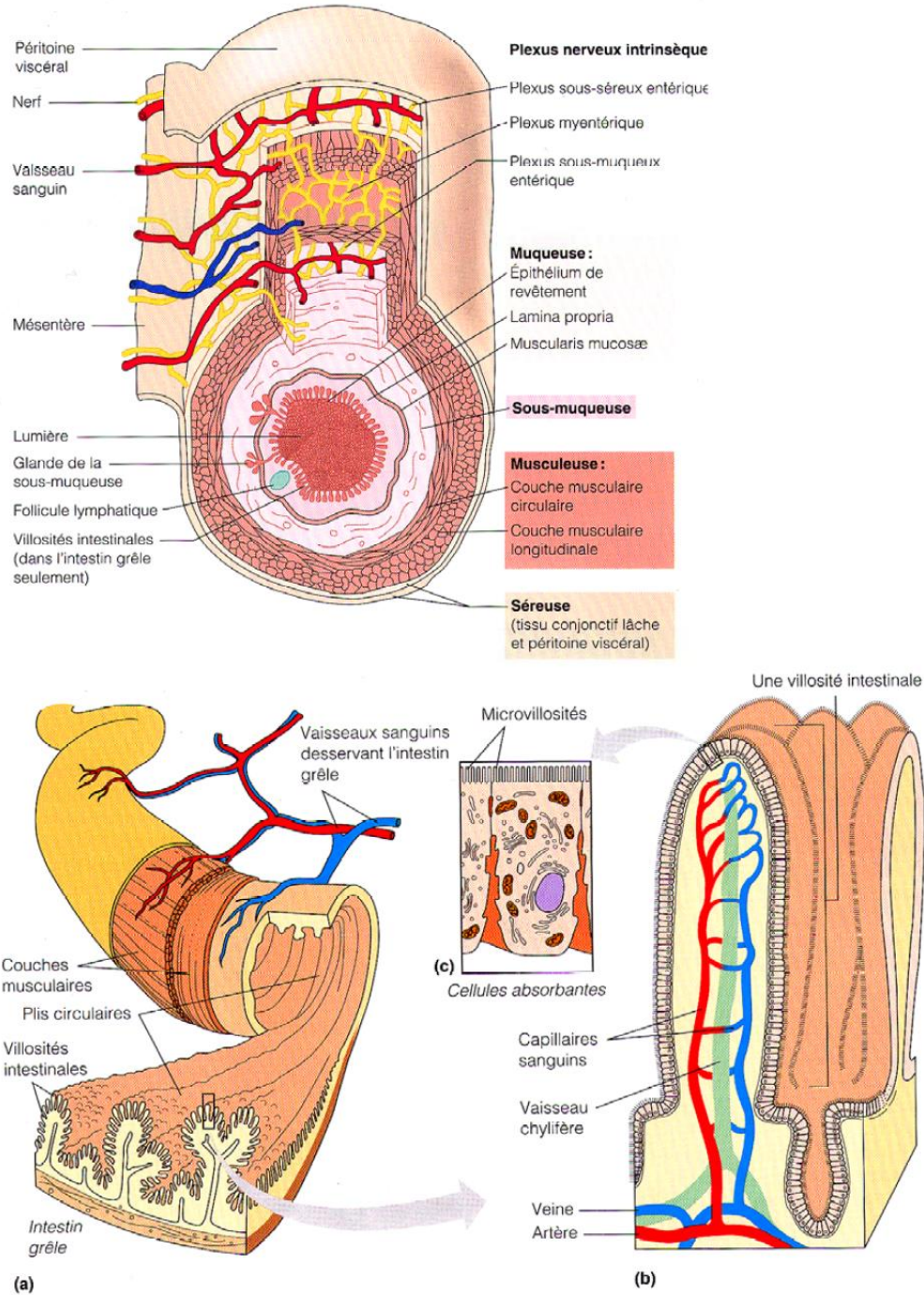


Figure 1 : Organisation structurelle de la paroi digestive

E.N. Marieb, Anatomie et physiologie humaine, Edition De Boeck Université, 1999

La muqueuse est composée de l'épithélium intestinal et de la *lamina propria*. Sa composition est variable en fonction des segments. La composition et les fonctions de ce compartiment sont détaillées ci-dessous.

La sous-muqueuse est composée d'un tissu conjonctif riche en collagène et fibres élastiques permettant le glissement de la muqueuse et d'un réseau développé de vaisseaux sanguins et lymphatiques qui drainent l'intestin.

La musculature correspond à une mince couche de fibres musculaires lisses comprenant deux feuillets formés de cellules musculaires : une couche longitudinale interne sur laquelle repose une couche circulaire externe.

La séreuse est une tunique fine du tube digestif. Formée par des cellules endothéliales nommées mésothélium, elle repose sur un tissu conjonctif lâche qui permet le soutien de l'appareil digestif et limite les forces de frottement lors des mouvements du tube digestif.

La diversité et la spécificité de ces structures permettent au tractus digestif de réaliser au mieux ses fonctions d'absorption des aliments.

B. Système nerveux entérique

L'intestin est un organe dynamique animé de mouvements péristaltiques sous contrôle du système nerveux entérique (SNE) permettant l'avancée du bol alimentaire et limitant ainsi le développement de bactéries et leur contact avec l'épithélium intestinal.

1. Description

Le système nerveux entérique SNE est composé de près de 100 millions de neurones, semblable à un 2^{ème} cerveau et est localisé tout le long de l'intestin. Au cours du développement embryonnaire, les neurones qui composent le système nerveux central SNC, vont « migrer » au niveau de l'endothélium qui deviendra le tube digestif et aboutiront à la formation de deux plexus : le plexus myentérique ou d'Auerbach, localisé dans la musculature et le plexus sous-muqueux ou de Meissner, localisé dans la sous muqueuse. Ces plexus sont des réseaux denses de neurones connectés les uns aux autres. Bien que le SNE fonctionne de manière indépendante, il est relié au système nerveux autonome via le nerf X ou nerf vague.

Le SNE régule plusieurs fonctions intestinales comme, par exemple, la sécrétion d'électrolytes par les cellules de l'épithélium ou des neurones en conditions physiologiques. Il joue également un rôle important vis-à-vis des cellules sécrétrices de l'intestin. En effet, l'arrivée des aliments induit une stimulation entérique qui conduit à la

sécrétion de *gastrin releasing factor* (GRP). Le GRP permet la libération de peptides antimicrobiens contenus dans les cellules de Paneth après stimulation cholinergique (Ayabe, Wulff et al. 2002) (Sato, Ishikawa et al. 1992). De même, une augmentation du nombre de cellules à mucus est observé chez les rats ayant subi une ablation chimique du SNE, illustrant son rôle dans la différenciation de ces cellules épithéliales (Hernandes, Pereira et al. 2003).

Les neurones qui composent le SNE vont sécréter des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine ou la noradrénaline et produisent une grande partie de la sérotonine qui module le péristaltisme. Ces neurotransmetteurs comme la sérotonine constituent un « feed back » sensoriel à la douleur ou aux réflexes qui contrôlent l'activité motrice des viscères et informent le SNC de l'homéostasie intestinale. Ces messages arrivent jusqu'à l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, ensemble complexe de régulations et d'interactions entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes corticosurréaliennes. Ce système neuroendocrinien régule des fonctions physiologiques comme la digestion mais également la perception et la réponse au stress.

Le SNE communique non seulement avec l'épithélium intestinal mais aussi avec les cellules immunitaires de la *lamina propria* comme l'indique la proximité des fibres nerveuses avec les mastocytes, impliqués dans la réponse inflammatoire. Cette proximité nerf mastocytes a été identifiée comme un élément déterminant dans la physiopathologie de maladies intestinales comme le syndrome de l'intestin irritable (Barbara, Stanghellini et al. 2004).

2. La sensibilité viscérale

« La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en terme d'une telle lésion » est la définition proposée par Merskey en 1979 et validée par l'Association Internationale de l'Etude de la Douleur (Merskey and Watson 1979). Elle tient compte de l'ensemble des mécanismes générateurs qui peuvent être d'origine physique ou psychologique. La douleur viscérale est difficile à décrire car elle peut être diffuse, irradiante et variable selon les individus.

Lorsque l'on s'intéresse à la sensibilité viscérale, il existe des stimuli nocifs qui lèsent les organes sans pour autant induire une douleur ou des stimuli nociceptifs qui produisent une sensation désagréable ou douloureuse (Ness and Gebhart 1990). Il existe deux types de douleur : l'hypersensibilité viscérale et l'allodynie. L'hypersensibilité viscérale est définie par une augmentation des réponses à des stimuli mécaniques ou thermiques, induisant la

sensibilisation des nocicepteurs périphériques. L'allodynie se caractérise par la sensation d'une douleur à la suite d'une stimulation qui est normalement non nociceptive (Gebhart 1999).

Un remodelage du SNE, reflété par l'apparition de réseaux neuronaux plus denses, est induit par l'inflammation et permet de l'entretenir (Margolis, Stevanovic et al. 2011). L'activation des TLR4 (*Toll Like Receptor 4*) par le LPS (LipoPolySaccharide) conduit à une diminution de l'excitabilité des neurones entériques et à la libération du neuropeptide Y (NPY) (Lukewich and Lomax 2013). Certains neuropeptides ont une action anti-inflammatoire (galanine), d'autres ont une action pro-inflammatoire (substance P ou NPY). La substance P est connue pour activer les mastocytes (Bot, de Jager et al. 2010) (Cross, Beck-Sickinger et al. 1996) et induire la chemotaxie des neutrophiles (Hafstrom, Ringertz et al. 1993). Le NPY régule à la baisse les TLRs 2 et 4, limitant la réponse immunitaire innée et adaptative (Arranz, Juarranz et al. 2008). La libération de NPY en réponse à un stress inhibe la production de catécholamines et de cortisol présynaptique via les récepteurs Y2 (Nguyen, Sartori et al. 2009).

C. La muqueuse intestinale

1. Organisation structurelle

La surface d'échange au niveau de l'épithélium intestinal est démultipliée grâce à différentes structures que sont les replis, les villosités et les microvillosités. Le rôle de défense de l'organisme vis-à-vis de l'environnement extérieur est permis par divers mécanismes de défense. Certains sont non spécifiques, c'est-à-dire qu'ils ne nécessitent pas la reconnaissance d'un antigène particulier pour être effectifs, comme la présence d'un microbiote commensal, le renouvellement rapide de l'épithélium grâce aux cellules souches, la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes ou la sécrétion de peptides antimicrobiens par les entérocytes ou les cellules de Paneth. D'autres sont spécifiques, c'est-à-dire qu'ils nécessitent une réponse spécifique à un antigène, comme la production d'immunoglobulines A (IgA) sécrétoires par les plasmocytes contenus dans la *lamina propria* (Macpherson, Gatto et al. 2000).

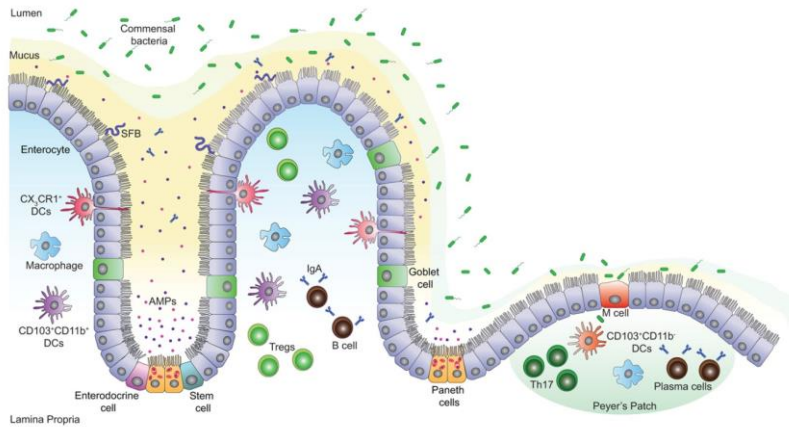


Figure 2 : Eléments composants la muqueuse intestinale au niveau de l'iléon (Muniz, Knosp et al. 2012)

La muqueuse intestinale constitue une surface hautement organisée qui limite et contrôle l'entrée des antigènes contenus dans la lumière intestinale (antigènes alimentaires ou issus du microbiote). L'épithélium est une couche monostratifiée composée principalement de cellules épithéliales intestinales mais également de cellules spécialisées comme les cellules M, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth, situées au niveau des cryptes ou les cellules caliciformes (Goblet cells). Ces dernières produisent le mucus qui tapisse l'épithélium intestinal. Ce mucus contient des immunoglobulines produits par les cellules de la lamina propria ou des peptides antimicrobiens, limitant le contact avec le microbiote commensal présent dans la lumière intestinal. La lamina propria regroupe un nombre important de macrophages, de lymphocytes T, de plasmocytes à IgA ou de cellules dendritiques. Ces cellules dendritiques permettent le développement de lymphocytes T auxiliaires comme les lymphocytes T régulateurs contribuant au maintien de l'homéostasie intestinale.

La muqueuse se divise en 3 zones:

- L'épithélium monostratifié est constitué principalement d'entérocytes entre lesquelles s'intercalent des cellules plus spécifiques comme les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules M, les cellules entéroendocrines, les cellules Tuft et les cellules souches.
- La *lamina propria* est un tissu conjonctif fin, dense en capillaires sanguins et en vaisseaux lymphatiques. Les cellules immunitaires qui s'y trouvent contribuent au maintien de l'homéostasie intestinale et participent à la défense contre d'éventuels agents pathogènes.
- La *muscularis mucosae* (musculaire de la muqueuse) est composée de deux couches fines de muscles lisses : la première longitudinale externe et la seconde circulaire interne dont les mouvements limitent l'adhésion des particules.

Selon que l'on se trouve dans l'intestin grêle ou le gros intestin, les structures diffèrent. En effet, dans l'intestin grêle, l'épithélium présente des invaginations nommées cryptes de Lieberkuhn qui ne sont pas présentes dans le côlon.

Au niveau des cryptes, on trouve les cellules souches qui assurent le renouvellement de l'épithélium intestinal. Il existerait deux types de cellules souches :

- les cellules souches découvertes par Cheng et Leblond en 1974 expriment le gène *lgr5* et sont situées entre les cellules de Paneth, au fond des cryptes (Cheng and Leblond 1974). Sous le contrôle de la signalisation Wnt, ces cellules ont la capacité de continuellement donner naissance aux cellules transitoires en prolifération.
- le second type de cellules souches expriment le gène *bmi1* et résident en position + 4 à partir de la base des cryptes (Potten, Owen et al. 2002). Elles restent en phase quiescente en l'absence de dommage de l'épithélium ou de rupture de l'homéostasie intestinale. En cas d'élimination des cellules *lgr5+*, ces cellules prolifèrent de manière importante pour recomposer les cryptes et les villosités donnant naissance aux cellules différenciées (Yan, Chia et al. 2012).

Au niveau des cryptes, on retrouve également les cellules de Paneth qui produisent des peptides antimicrobiens. Elles contribuent ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale en limitant le développement des bactéries lumineales (Santaolalla and Abreu 2012).

Les villosités sont constituées à 80% d'entérocytes dont la face apicale est couverte de microvillosités permettant de démultiplier leur surface d'absorption et d'échange. L'épithélium se compose aussi de cellules spécialisées :

- les cellules caliciformes, produisant le mucus
- les cellules M qui constituent le FAE (Follicle Associated Epithelium) au niveau des plaques de Peyer
- des cellules entéroendocrines qui sécrètent des hormones et des peptides (substance P, sérotonine...) qui ont un rôle dans le contrôle de la sécrétion intestinale et la motricité du système digestif
- les cellules Tufts, capables de produire des opioïdes et qui pourraient donc être impliquées dans la perception de la douleur (Gerbe, van Es et al. 2011).

Dans le gros intestin, les cellules de Paneth sont absentes et la production de mucus par les cellules caliciformes y est plus importante, ces deux éléments pourraient contribuer à expliquer une charge bactérienne plus importante dans ce segment de l'intestin.

Le renouvellement de l'épithélium intestinal se fait environ tous les 3-5 jours. Les cellules souches et les cellules de Paneth ont une durée de vie plus importante (d'environ 20 jours pour les cellules de Paneth). Lorsque les cellules atteignent l'apex des villosités, elles se détachent et sont expulsées dans la lumière intestinale par un phénomène appelé anoïkose.

2. Perméabilité de l'épithélium intestinal

La fonction première de l'intestin est l'absorption des nutriments issus de l'alimentation pour l'ensemble des cellules du corps humain. La perméabilité intestinale décrit le passage de molécules de tailles diverses au travers de l'épithélium intestinal. L'épithélium intestinal est polarisé avec un pôle apical au contact de la lumière intestinale et un pôle basolatéral coté muqueux. Cette polarité est maintenue grâce aux nombreuses jonctions intercellulaires permettant le passage des molécules d'intérêt et limitant celui des microorganismes. Il existe trois types de jonctions intercellulaires en partant du pôle apical vers le pôle basal: les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. On trouve également les jonctions gap ou communicantes, structure composée de canaux intercellulaires regroupés en plaque, qui permettent la circulation du cytoplasme entre deux cellules. Les jonctions adhérentes sont constituées principalement par les cadhérines, par exemple l'E-cadhérine qui est reliée à l'actine grâce à l' α et β caténine, renforçant la liaison intercellulaire.

Deux voies de passages des composés luminaux à travers l'épithélium intestinal ont été identifiées: une voie paracellulaire et une voie transcellulaire.

i. La voie paracellulaire

Les jonctions serrées sont des structures dynamiques qui vont réguler la perméabilité paracellulaire (entre les cellules) (Nusrat, Turner et al. 2000) et déterminer la taille des pores permettant le passage des molécules (Shen, Li et al. 2011). Les jonctions serrées sont plus visibles au niveau des villosités que dans les cryptes illustrant une perméabilité plus importante (Marcial, Carlson et al. 1984). Ce complexe jonctionnel est constitué de protéines transmembranaires (occludine, claudine et JAM pour *junctional adhesion molecule*) reliées à des protéines intracellulaires (ZO pour *zonula occludens*) qui sont rattachées à l'actine, composant du cytosquelette de la cellule (figure 3).

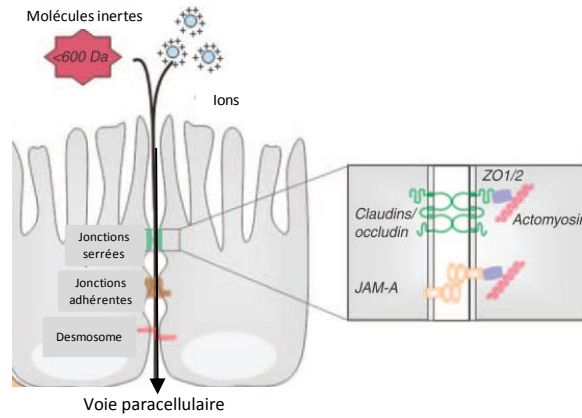


Figure 3 : Perméabilité intestinale par la voie paracellulaire et structures associées

(Adaptée de (Menard, Cerf-Bensussan et al. 2010))

La perméabilité paracellulaire correspond au passage de molécules de faible poids moléculaire au travers de pores formés par les complexes protéiques de jonctions serrées.

Les claudines composent une famille de 27 protéines chez la souris et de 24 chez l'Homme (Morita, Furuse et al. 1999) (Lal-Nag and Morin 2009). Leurs poids moléculaires varient de 20 à 27 kDa. Les claudines renforcent la barrière physique mais jouent également un rôle essentiel dans la sélection du passage des ions au travers des jonctions serrées grâce à la formation de pores par leurs boucles extracellulaires. Par exemple, la claudine 2 est non sélective alors que la claudine 16 est restrictive de Mg^{2+} (Gonzalez-Mariscal, Hernandez et al. 2008). De plus, d'autres protéines de jonctions serrées ont été identifiées comme l'occludine, la molécule d'adhésion des jonctions ou JAM ou les ZO.

L'ensemble de ces jonctions permet donc la mise en place d'une perméabilité paracellulaire intestinale sélective entre les cellules de l'épithélium intestinal. En conditions physiologiques, le diamètre des molécules capables de traverser l'épithélium intestinal par voie paracellulaire est compris entre 4 et 9 Å dans les villosités et de 50 à 60 Å dans les cryptes (Fihn, Sjoqvist et al. 2000) (Powell 1981). Le passage par la voie paracellulaire permet le passage des ions et des molécules hydrophiles jusqu'à un poids moléculaire de 600 Da (Watson, Rowland et al. 2001). Cette voie est utilisée par les petites molécules qui ne peuvent traverser la membrane plasmique hydrophobe de manière passive. La voie paracellulaire est déterminée non seulement par la taille des pores formés par les protéines de jonctions mais aussi par les mouvements d'eau par voie transcellulaire conduisant à un gradient osmotique. Un défaut ou une perte de certaines protéines de jonctions permettrait le passage de molécules avec un poids moléculaire supérieur entre les cellules de l'épithélium.

Le cytosquelette est décrit comme un acteur important dans le maintien structural de la monocouche des cellules épithéliales. Il se compose de deux types de protéines : l'alpha intégrine qui se polymérise en microtubules et l'actine qui forme des filaments d'actine. Les

microtubules jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité cellulaire, l'orientation du transport et de la sécrétion intracellulaire et dans la coordination des mouvements des organelles. Les filaments d'actine s'associent avec la chaîne légère de myosine (MLC) et d'autres protéines pour former un anneau périjonctionnel d'actino-myosine (Turner 2000). Celui-ci interagit avec les jonctions adhérentes et les jonctions serrées telles que la claudine et l'occludine (Mooseker 1985) (Turner 2009). Les jonctions serrées peuvent ainsi être régulées par la phosphorylation de la MLC par la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) qui induit la contraction du cytosquelette qui conduit à l'ouverture des jonctions serrées (Moriez, Salvador-Cartier et al. 2005) et donc une augmentation de la perméabilité paracellulaire.

ii. La voie transcellulaire

Ce passage s'applique pour le transport de molécules de haut poids moléculaire et pour les bactéries ou les antigènes alimentaires. Cette voie de transport est particulièrement représentée au niveau des cellules M tapissant les plaques de Peyer ou dans les follicules lymphoïdes isolés (Neutra, Mantis et al. 2001) (Keita, Gullberg et al. 2006). Les molécules traversent la cellule M et se retrouvent au contact de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dans la *lamina propria*. Ce passage se fait de manière préférentielle au niveau des plaques de Peyer en raison de la présence de cellules M mais également car le dôme concentre un nombre important de cellules immunitaires, capables de réagir rapidement selon l'antigène. Dans l'épithélium qui compose les plaques de Peyer, on retrouve un type cellulaire particulier, les cellules M qui s'intercalent entre les entérocytes. Les cellules M sont caractérisées par l'absence de bordure en brosse et de mucus, un système lysosomal très réduit et la présence d'une profonde invagination de la membrane plasmique délimite une poche intra-épithéliale dans laquelle viennent se loger les lymphocytes, les cellules dendritiques et les macrophages. Ce lieu est une zone privilégiée de passage de par le faible nombre de cellules à mucus, une absence de synthèse du récepteur polymérique des IgA par les cellules M, donc d'IgA sécrétoires à leur surface, une absence de glycocalyx et d'enzymes hydrolytiques, permettant l'endocytose des macromolécules qui arrivent à la membrane basolatérale au niveau de la poche intra-épithéliale (Frey, Giannasca et al. 1996). Les cellules M ne possèdent que peu de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC II) mais permettent le passage de l'antigène intact depuis la lumière intestinale favorisant le contact entre l'antigène et les CPA professionnelles localisées sous l'épithélium, dans le dôme (figure 4).

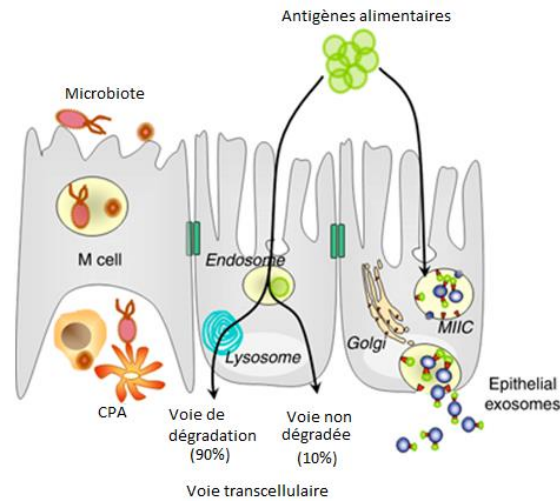


Figure 4 : Perméabilité intestinale par la voie transcellulaire

(Adaptée de (Menard, Cerf-Bensussan et al. 2010))

Dans des conditions physiologiques, le transport de molécules de poids moléculaires supérieur à 600 Da, comme les antigènes alimentaires, s'effectue par endocytose par les entérocytes au niveau apical de la cellule. Durant cette transcytose, la protéine est plus ou moins dégradée par les lysosomes présents dans la cellule. Ces antigènes sont ensuite expulsés de la cellule au niveau basolatéral. Des endosomes précoces exprimant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et contenant des antigènes alimentaires partiellement dégradés permettent la formation de petites vésicules membranaires appelées exosomes (40-90 nm) portant des complexes CMH de classe II chargés d'antigènes. Les exosomes peuvent diffuser dans la membrane basale et interagir avec les cellules immunitaires locales. Ces peptides présentés par les exosomes interagissent beaucoup plus facilement que les peptides libres avec des cellules dendritiques, induisant la stimulation des lymphocytes T.

- *La transcytose*

Le passage des antigènes alimentaires est associé à un processus de dégradation dans les cellules épithéliales. En effet, les cellules épithéliales dégradent les protéines en peptides d'environ 1500 Da, une taille compatible avec le MHC II (Terpend, Boisgerault et al. 1998). Il a également été démontré par radiochromatographie liquide que les grosses protéines prises en charge par les cellules épithéliales étaient libérées au pôle basal sous trois formes différentes : soit comme peptide immunogène (environ 40%), soit sous formes d'acides aminés totalement dégradés (environ 50%), soit sous forme d'antigène intact (10%) (Heyman, Ducroc et al. 1982). Ces molécules seront alors prises en charges par les CPA comme les cellules dendritiques dans la *lamina propria* (Chirido, Millington et al. 2005). Les cellules épithéliales sont aussi capables de produire des petites vésicules, d'environ 80 nm de diamètre, nommées exosomes (Raposo, Nijman et al. 1996) (van Niel, Raposo et al. 2001). La présentation des antigènes via les exosomes permet une reconnaissance plus efficace par les CPA (Mallegol, Van Niel et al. 2007).

- *Transport médié par les récepteurs aux immunoglobulines*

Au niveau de la *lamina propria*, on retrouve des plasmocytes à Ig qui sont majoritairement à IgA mais on peut aussi retrouver des IgG et des IgE notamment dans les cas

d'allergies d'alimentaires. Les IgA sont produites au niveau de la *lamina propria* et sont transportées et libérées sous forme d'IgA sécrétoires (sIgA) dans la lumière intestinale. Ce transport du pôle séreux au pôle muqueux est assuré par le récepteur aux Ig polymériques (pIgR) exprimé à la membrane basale des entérocytes (Brandtzaeg, Bjerke et al. 1987). Les IgA vont se fixer au pIgR, être transportées à la face apicale où elles acquièrent le composant sécrétoire suite au clivage du pIgR et aboutissent à une IgA sécrétoire (sIgA). Les sIgA constituent un pan important de la protection immunitaire intestinale en retenant les antigènes potentiellement nocifs au niveau de la lumière intestinale (Fernandez, Pedron et al. 2003) (Lamm 1998). Bien que leur fonction première soit de limiter l'entrée des antigènes au niveau de la *lamina propria*, un rétro-transport apico-basal de complexe IgA/antigènes luminaux a été décrit. Au niveau des plaques de Peyer, un rétro-transport d'IgA couplées aux bactéries a été identifié (Mantis, Cheung et al. 2002) (Kadaoui and Corthesy 2007), permettant la reconnaissance par les cellules dendritiques (Boullier, Tanguy et al. 2009). Ceci induit une réponse protectrice vis-à-vis de la bactérie qui est impliquée dans le maintien de la barrière intestinale. De plus, ce rétro-transport a aussi été décrit pour des complexes IgA/antigènes alimentaires et notamment dans la maladie cœliaque où il pourrait contribuer au déclenchement et/ou à l'entretien de la réponse immunitaire dirigée contre la gliadine (Matysiak-Budnik, Moura et al. 2008).

La lumière intestinale contient également des IgG et un transport bidirectionnel des IgG via le récepteur néonatal Fc (FcRn) a été mis en évidence (Simister and Mostov 1989). Ce transport médié par les IgG semble être principalement impliqué dans l'immunité protectrice. Au pôle apical de la cellule, l'absorption des IgG se fait par attachement au récepteur FcRn en raison d'un pH acide (Jones and Waldmann 1972) (Simister and Rees 1985). La dissociation du complexe IgG – FcRn à pH neutre conduit à la libération des IgG au niveau du pôle baso-latérale de la cellule épithéliale. Une augmentation de sensibilité à l'infection par *Citrobacter rodentium* est observée chez les souris n'exprimant pas le récepteur FcRn (Yoshida et al., J Clin Invest, 2006). Ce même processus a été décrit pour un *E. coli* commensal, mettant en lumière le rôle important de ce récepteur dans le maintien de l'homéostasie intestinale.

De même, les CPA ont la capacité de « capter » les bactéries depuis la lumière intestinale en projetant leur dendrites entre deux cellules épithéliales (Rescigno, Rotta et al. 2001).

iii. La translocation bactérienne

- *Description*

En conditions physiologiques, de très faibles quantités de bactéries traversent l'épithélium intestinal par la voie transcellulaire ou sont capturées par les cellules présentatrices d'antigènes. La perméabilité intestinale aux bactéries commensales permet la mise en place de la tolérance vis-à-vis du microbiote et est particulièrement observée chez le nouveau-né dont l'épithélium immature est hyperperméable. L'épithélium intestinal, le système immunitaire associé et le microbiote intestinal interagissent étroitement permettant l'établissement de l'homéostasie intestinale et la fonction de barrière de l'intestin. Lorsque cette homéostasie est rompue, il peut se produire une translocation bactérienne (TB) (Balzan, de Almeida Quadros et al. 2007) (Brenchley and Douek 2012). Ce phénomène se traduit par un passage important de bactéries vivantes depuis la lumière intestinale vers les organes immunitaires locaux comme les ganglions mésentériques ou systémiques comme le foie ou la rate, pouvant conduire à une septicémie (MacFie, O'Boyle et al. 1999).

- *Facteurs impliqués*

La translocation bactérienne est détectée par culture microbiologique de microorganismes provenant de la lumière intestinale dans les ganglions mésentériques et cette analyse peut être complétée par des prélèvements hépatiques, spléniques ou plasmatiques (Alexander, Gianotti et al. 1991) (Redan, Rush et al. 1990). Trois grands facteurs sont impliqués dans la TB : la barrière intestinale, le microbiote ou le système immunitaire.

- ✓ *L'altération de l'intégrité physique de l'épithélium intestinal*

La capacité des bactéries à causer des infections systémiques passe par l'expression d'entérotoxines. Beaucoup d'entérotoxines produites par *Escherichia*, *Salmonella* ou *Clostridia* visent les protéines de jonctions, élément essentiel de la cohésion de l'épithélium (Hopkins, Walsh et al. 2003). De même, dans le cas d'une infection virale, une augmentation de la perméabilité intestinale est observée associée à des diarrhées favorisant les phénomènes de TB. L'inflammation est également un facteur favorisant la TB. La sécrétion d'interféron γ (IFN γ), une cytokine pro-inflammatoire, est connue pour augmenter non seulement la perméabilité paracellulaire, via une modification des claudines (Chiba, Kojima et al. 2006), mais aussi la perméabilité transcellulaire (Madara and Stafford 1989) (Heyman and Desjeux 2000).

✓ Déséquilibre de la réponse immunitaire

Un défaut d'IgA, Ig majoritaires au niveau des muqueuses, est le premier marqueur d'immunodéficience et peut avoir des causes génétiques (délétion des chaînes lourdes, dysfonctionnement des cellules T ou altération de la sécrétion de cytokines) (Ye 2010). Bien que la plupart des personnes qui sont déficientes en IgA soient asymptomatiques, ces individus ont une prédisposition aux développements des infections ou aux pathologies gastro-intestinales comme la malabsorption ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Edwards, Razvi et al. 2004). Dans le cas d'une infection par des protozoaires, le défaut d'IgA permet une meilleure adhésion à l'épithélium ainsi qu'une meilleure prolifération de *Giardia lamblia* (Zinneman and Kaplan 1972). De même, le défaut d'IgA permet le passage de molécules contenues dans la lumière intestinale jusqu'à la *lamina propria*. Ce défaut en local conduit, au niveau systémique, à une augmentation des IgG spécifiques des antigènes contenus dans la lumière intestinale, qu'ils soient alimentaires ou bactériens (Cardinale, Friman et al. 1992). De plus, les souris déficientes en pIgR ne présentent pas d'Ig fécales et ont une augmentation de la pénétration des bactéries commensales et une réponse systémique vis-à-vis des bactéries commensales (Johansen, Pekna et al. 1999).

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) 3, exprimant le récepteur nucléaire ROR γ t et produisant de l'IL17 et de l'IL22, sont également importantes dans l'intégrité de la barrière intestinale. Les souris déficientes en ILC3 sont plus sensibles à une infection par le virus de la grippe (H3N2 strain Scotland/20/74) (Lochner, Ohnmacht et al. 2010). De même, il a été démontré récemment que la sécrétion d'IL22 permettait de mieux contenir une infection par *Citrobacter rodentium* (Takatori, Kanno et al. 2009), mettant en évidence le rôle crucial de ces cellules dans l'immunité innée et l'intégrité de la barrière intestinale.

II. Immunité innée intestinale

A. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est l'un des éléments clef de la réponse immunitaire innée au niveau de l'intestin (Hoffmann, Kafatos et al. 1999) (Ganz and Lehrer 1998). Elle assure la défense de l'organisme vis-à-vis des pathogènes et contrôle la colonisation bactérienne. Les peptides antimicrobiens ont des spectres étendus d'activité qui couvrent la majorité des espèces bactériennes ou fongiques. Vaste ensemble de peptides et de protéines (plus de 500 ont été identifiés), la taille des peptides antimicrobiens varie de 20 à 50 acides aminés, sont de

type lévogyre, aux propriétés amphiphiles et au caractère cationique. Leur diversité structurale définit trois grandes familles : les peptides linéaires formant des hélices (cécropines (4kDa) et magainines (2kDa)), les peptides riches en cystéines avec un ou plusieurs ponts disulfures (α et β défensines) et les peptides contenant un pourcentage élevé d'un type d'acides aminés (comme l'histidine).

1. *Les peptides et protéines antimicrobiens (PAM)*

i. Le lysozyme

Protéine formée de 129 acides aminés, le lysozyme se trouve dans de nombreuses sécrétions corporelles comme le lait maternel ou la salive. Produit principalement par les cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle ou par les neutrophiles (Short, Nickel et al. 1996), cette protéine antimicrobienne ne se trouve qu'au niveau de ce segment intestinal, le côlon étant dépourvu de cellules de Paneth. Le lysozyme cible particulièrement les bactéries Gram positives.

ii. Les défensines

Les défensines sont l'une des familles de peptides antimicrobiens la plus exprimée et abondante dans l'intestin. Il existe trois sous familles de défensines : les α , β et θ défensines (Selsted and Ouellette 2005) qui sont de petits peptides de 2 à 6 kDa. Les défensines présentent un résidu cystéine qui forme des ponts disulfures, conduisant la structure tertiaire de la protéine (Ganz 2004). Environ 50 α défensines et 90 β défensines ont été identifiées dans les cellules de Paneth, les neutrophiles ou les cellules épithéliales (Lai and Gallo 2009) (Duits, Ravensbergen et al. 2002). Les défensines sont synthétisées sous forme d'un précurseur inactif, nécessitant un clivage protéolytique. Le spectre d'activité antimicrobienne comprend les bactéries Gram négatives ou positives et les défensines peuvent être efficaces vis-à-vis de certains champignons, virus ou protozoaires (Selsted and Ouellette 2005). Les θ défensines sont uniquement présentes chez les primates non humains (Conibear and Craik 2014) (Cheng, Li et al. 2014).

- *Les α défensines :*

Ces peptides cationiques amphipatiques de 2 à 3 kDa font partie des peptides antimicrobiens les plus abondants et les plus divers. Elles représentent 70% des peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth (Bevins and Salzman 2011). Sur les 6 α défensines identifiées chez l'Homme, HNP1, 2, 3 et 4 sont produites par les neutrophiles et HD5 et 6 par les cellules de Paneth. La production d' α défensines assure une protection contre la colonisation par les agents pathogènes. En effet, les souris transgéniques exprimant l' α

défensine 5 humaine sont beaucoup plus résistantes à l'infection par *Salmonella typhimurium*, (Salzman, Ghosh et al. 2003). L'expression des α défensines est dépendante du facteur de transcription TCF4 via la voie Wnt, de manière constitutive, et du gène SOX9, qui permet la différenciation des cellules de Paneth.

Chez la souris, les α défensines sont nommées cryptdines et sont produites également par les cellules de Paneth. En plus des cryptdines, la souris possède des « cryptdin-related sequence » (CRS) qui possèdent 4 ponts disulfures intramoléculaires et plusieurs dimères covalents permis par un pont disulfure intermoléculaires (Hornef, Putsep et al. 2004). Ces CRS peuvent former des homo ou hétérodimères, augmentant le nombre de combinaison possible entre les peptides et leur efficacité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries Gram négatives ou positives. Selon la souche de souris, les CRS ne sont pas les mêmes. Les C57BL/6 expriment préférentiellement CRS1C alors que les C3H/HeN, les FvB, 129/SvJ expriment CRS4C (Karlsson, Putsep et al. 2008). De même, les C57BL/6 produisent les α défensines 20, 21, 23, 24 et 27 alors que 129/SvJ, C3H/HeN, FvB et BalbC les α défensines 1, 2, 4, 6 et 7 (Shirafuji, Tanabe et al. 2003). Cela a un impact sur la composition du microbiote de chaque souche de souris.

- *Les β défensines*

A la différence des α défensines, les β défensines sont synthétisés par les entérocytes, à la fois dans l'intestin grêle et le côlon (O'Neil, Porter et al. 1999). Bien que 28 β défensines aient été identifiées dans le génome, seulement 6 sont exprimées chez l'Homme et 5 chez la souris (Schutte, Mitros et al. 2002). De plus, les β défensines peuvent également agir comme chemoattractant pour les cellules immunitaires comme les cellules dendritiques ou les cellules T (Biragyn, Ruffini et al. 2002).

L'expression des β défensines est inductible à l'exception de hBD1 et mBD1 qui sont produites de manière continue et stable, même dans un contexte d'inflammation (O'Neil, Porter et al. 1999) (Krisanaprakornkit, Kimball et al. 2000). L'expression de certaines β défensines est dépendante du microbiote commensal notamment par l'activation du TLR5 (Gallo and Hooper 2012).

- iii. *Les cathélicidines*

C'est la deuxième classe de molécules antimicrobiennes la plus répandue au niveau des épithélia et le représentant chez l'Homme est LL37. Elles ont un profil cationique et possèdent une hélice α présentant un domaine C-terminal variable et un domaine N-terminal présentant une cathéline de 14 kDa correspondant au cathepsine. Le gène CAMP/hCAP18

code pour ce peptide. Le butyrate issu de la fermentation des bactéries du microbiote commensal et la vitamine D sont impliqués dans la régulation de l'expression de ce gène (Schwab, Reynders et al. 2007) (Schwab, Reynders et al. 2007) (Bucki, Leszczynska et al. 2010). Produit par les neutrophiles et les cellules épithéliales du côlon de l'adulte, LL37 est activée par la protéinase 3 (Sorensen, Follin et al. 2001). Comme les défensines, leurs actions antimicrobiennes passent par une perturbation de l'intégrité de la membrane bactérienne. LL37 interagit avec le système immunitaire et possède des effets de chémoattraction sur les cellules immunitaires. *In vitro*, LL37 est capable de recruter des cellules comme les monocytes, les macrophages ou les cellules T (Koczulla, von Degenfeld et al. 2003) et induit la sécrétion de cytokines de type Th1 par les cellules dendritiques (Davidson, Currie et al. 2004).

CRAMP ou « *cathelin-related antimicrobial peptide* » est l'équivalent de LL37 chez la souris. Le clivage ainsi que le mécanisme et le spectre d'action sont identiques à celui de LL37. Toutefois, la vitamine D ne module par son expression (Bucki, Leszczynska et al. 2010).

iv. La phospholipase A2

Cette enzyme ubiquitaire est principalement produite par les cellules de Paneth ou les macrophages (Harwig, Tan et al. 1995) (Vadas, Browning et al. 1993).

v. L'angiogenine

L'angiogenine 4 (ANG4) appartient à la famille des RNase. L'ANG4 est produite exclusivement par les cellules de Paneth et présente un spectre d'action large étant efficace à la fois contre les Gram négatives et positives (Hooper, Stappenbeck et al. 2003) mais dont le mécanisme reste méconnu.

vi. Les lectines

Les lectines de type C sont également des peptides antimicrobiens à l'action inconnue. Leur production dépend du gène *Reg 3α* chez l'Homme et de deux gènes *Reg3γ* et *Reg3β* chez la souris (Muniz, Knosp et al. 2012). *RegIIIγ* chez la souris ou HIP/PAP (« *hepatocarcinoma-intestine-pancreas / pancreatic-associated protein* ») chez l'Homme est exprimée dans de multiples cellules intestinales comme les lymphocytes intra épithéliaux, les entérocytes ou les cellules de Paneth (Cash, Whitham et al. 2006) (Christa, Carnot et al. 1996). L'expression de *Reg3γ* est sous le contrôle de la voie MyD88 et de l'IL22 produite par les cellules lymphoïdes innées. Absente chez les souris axéniques, le rétablissement du microbiote rétablit leur

expression, indiquant son rôle important dans la production de ce peptide (Muniz, Knosp et al. 2012).

2. Mode de sécrétion des PAM

La plupart des peptides antimicrobiens sont produits par des cellules spécialisées nommées les cellules de Paneth. Les cellules de Paneth représentent entre 3 et 7% de la population cellulaire selon le segment de l'intestin grêle chez la souris (Karam 1999). Leur espérance de vie est comprise entre 2 et 3 semaines (van der Flier, van Gijn et al. 2009). Leur activité est essentielle dans la résistance de l'épithélium et dans le contrôle de la composition du microbiote commensal (Salzman, Hung et al. 2010). Leur dégranulation passe par différentes molécules. En effet, des neurotransmetteurs produits au niveau local vont activer les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine induisant la dégranulation des cellules de Paneth (Sato, Ishikawa et al. 1992). La carbamylcholine est une catécholamine également connue pour faire dégranuler les cellules de Paneth (Barkla and Tutton 1974) (Sato, Ishikawa et al. 1989) (Sato, Habara et al. 1995). Le TNF α , cytokine proinflammatoire, active la voie TNF1(P55) qui conduit à un dysfonctionnement des cellules de Paneth et des cellules à mucus (Van Hauwermeiren, Vandenbroucke et al. 2014). Récemment, des études ont montré le rôle important de l'IFN γ dans le contrôle de la dégranulation des cellules de Paneth. En effet, l'IFN γ provoque une dégranulation de ces cellules mais également leur mort cellulaire (Farin, Karthaus et al. 2014). Dans le cas d'infection par *T. gondii*, la libération d'IFN γ conduit à la perte des cellules de Paneth induisant une dysbiose (Raetz, Hwang et al. 2013). De plus, les cellules de Paneth expriment le récepteur IL13 α 1. La stimulation par l'IL13, cytokine de type Th2, conduit à la dégranulation des cellules de Paneth, via la phosphatidylinositol 3-kinase associée à la protéine B kinase (Stockinger, Albers et al. 2014).

Certains PAM comme les β défensines sont sécrétées de manière constitutive, sans stimulation particulière des cellules qui les produisent. Les mécanismes de sécrétion ne sont pour l'instant pas connus.

Certains peptides sont sécrétés sous forme de pré-pro-peptides dans la lumière intestinale, comme les α défensines ou les cathélicidines. Une fois dans la lumière intestinale, les α défensines sont activées par la trypsine (Ghosh, Porter et al. 2002). Les cryptdines murines sont activées par la métalloprotéase MMP7 (Wilson, Ouellette et al. 1999) (Nijnik and Hancock 2009). Toutefois, MMP7 n'est pas suffisante pour activer les pro-formes d' α défensines *in vivo*, mettant en lumière l'implication d'autres enzymes encore non identifiées (Bevins and Salzman 2011). Les β défensines sont activées par un clivage selon un processus qui reste inconnu à ce jour (Gallo and Hooper 2012). Des études montrent néanmoins que

l'environnement réducteur de la lumière intestinale favorise l'activité antimicrobienne de BD1 (Schroeder, Stange et al. 2011) (Schroeder, Wu et al. 2011).

3. Mode d'action des PAM

De par leur charge positive, les peptides antimicrobiens cationiques interagissent avec les membranes des bactéries chargées négativement. Plusieurs modélisations explicatives existent sur le mode d'action des PAM, le modèle de référence étant celui de Shai-Matsuzaki-Ynag (figure 5).

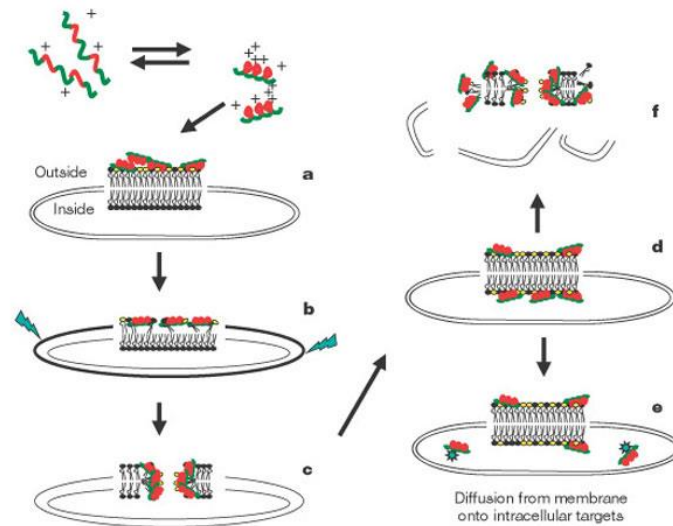


Figure 5 : Modèle Shai-Matsuzaki-Ynag des mécanismes d'action des peptides antimicrobiens (Zasloff 2002)

(a) Recouvrement en tapis de la membrane externe ; (b) Intégration du peptide dans la membrane entraînant une déstabilisation ; (c) Phase de transition et formation d'un pore ; (d) Fuite des lipides et peptides vers le milieu extracellulaire ; (e) Transport des peptides vers ses cibles intracellulaires ; (f) Rupture de la membrane et mort du microorganisme.

Le lysozyme est une glycosidase qui hydrolyse le lien 1,4 β -glycosidique entre le N acétylglucosamine et le N acétyl-acide-murannique qui constitue les peptidoglycanes, formant la paroi des bactéries positives. De ce fait, le lysozyme est plus efficace contre les bactéries Gram positives. En effet, le peptidoglycane qui compose la couche externe de leur paroi est plus accessible que chez les bactéries Gram négatives (Ganz 2004). Les lectines possèdent un domaine lectine en position C-terminal qui se lie aux peptidoglycanes et conduisent à la mort de la bactérie. La phospholipase A2 de groupe IIA détruit les bactéries en hydrolysant les phospholipides qui composent la paroi bactérienne, compromettant l'intégrité de la membrane de la bactérie (Koprivnjak, Peschel et al. 2002). C'est le caractère basique de l'enzyme qui lui permet de pénétrer la paroi bactérienne et d'atteindre la membrane (Beer, Munding et al. 2002). Comme le lysozyme, ce polypeptide est plus efficace contre les bactéries Gram positives.

L'action des défensines passe par une altération du potentiel de membrane grâce à leur caractère hautement basique et cationique. Elles se fixent à la surface des membranes bactériennes grâce à des interactions électrostatiques avec les phospholipides négatifs qui la composent. Lorsque la quantité de défensines fixée est suffisante, des pores se forment à travers la membrane induisant la perte de métabolites et d'ions et à la lyse osmotique de la bactérie (Brogden 2005) (Kagan, Selsted et al. 1990) (Bechinger and Lohner 2006).

La LL37 se fixe à la membrane bactérienne via des interactions électrostatiques induisant une perturbation de l'homéostasie de la membrane de la bactérie (Bals and Wilson 2003). Elles sont efficaces face aux bactéries Gram négatives et positives mais aussi vis-à-vis de champignons. L'action de l'angiogénine passe par sa capacité à hydrolyser l'ARN de la bactérie mais le mécanisme enzymatique n'est pas connu à l'heure actuelle.

4. *L'activité immunomodulatrice des PAM*

i. Propriétés chimiotactiques et régulatrices dans l'activation des cellules immunitaires

Les α et β défensines possèdent des propriétés chimiotactiques vis-à-vis des monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les cellules dendritiques immatures (Yang, Chertov et al. 2001) (Niyonsaba, Iwabuchi et al. 2002) (Territo, Ganz et al. 1989). Elles activent également les neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques via l'expression d'IL8 et de CCR2 (Muniz, Knosp et al. 2012). L'action des β défensines est dépendante des récepteurs CCR6 et CCR2, celui des α défensines n'étant pas aujourd'hui clairement identifié (Rohrl, Yang et al. 2010).

Les défensines sont également impliquées dans l'établissement de la réponse inflammatoire en modulant l'expression de certaines cytokines pro inflammatoires par les voies impliquant la MAPK et NF- κ B. Les α défensines humaines induisent une augmentation de TNF α et d'IL8 par les monocytes activés. Les β défensines induisent une augmentation d'IL6 et d'IL10 (Oh, Kim et al. 2013).

ii. Modulation de l'inflammation par les cathélicidines

Les cathélicidines participent à la réponse pro inflammatoire par induction de l'expression de cytokines pro inflammatoires. LL37 et CRAMP possèdent des propriétés chimiotactiques pour les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T par activation des récepteurs FPRL1 et 2 (Agerberth, Charo et al. 2000) (Kurosaka, Chen et al. 2005). De plus, LL37 participe à la dégranulation des mastocytes et induit l'expression

d'IL1 β dans les monocytes. La synergie entre LL37 et IL1 β conduit à l'expression d'IL6, d'IL10.

De manière contradictoire, LL37 et CRAMP peuvent réguler à la baisse la réponse pro inflammatoire. En se fixant au lipopolysaccharide (LPS), ils inhibent l'activation de la voie via le TLR4 au niveau des cellules dendritiques. CRAMP inhibe la voie Myd88 dans les macrophages (Pinheiro da Silva, Gallo et al. 2009).

B. Le mucus, interface protectrice et d'échange

Les épithélia qu'ils soient pulmonaires, vaginaux ou intestinaux sont recouverts d'un gel dynamique semi-perméable, le mucus. Dans l'intestin, ce mucus est produit par les cellules caliciformes. Initialement le mucus était principalement décrit comme un lubrifiant facilitant le passage du bol alimentaire (Gendler and Spicer 1995) mais son étude plus approfondie a montré qu'il avait un rôle plus complexe dans l'homéostasie intestinale, en agissant comme un filtre sélectif empêchant le passage des microorganismes jusqu'à l'épithélium intestinal tout en fournissant une niche pour les bactéries commensales (Cone 2009).

1. Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes ou dites « à mucus » sont localisées tout le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin, représentant 10 à 20% des cellules de l'épithélium selon le segment et l'espèce. Leur espérance de vie est courte, de 3 à 5 jours (Karam 1999).

La différenciation des cellules caliciformes se fait via le gène *Math 1* et par l'activation du facteur de transcription KLF4 qui est exprimé dans les cellules post mitotiques situées dans les 2/3 supérieurs de la crypte ou des villosités. KLF4 régule de manière négative la voie Wnt/ β -caténine/TCF en se fixant directement sur la β -caténine l'empêchant de former le complexe de transcription avec le TCF (Zhang, Yan et al. 2006). KLF4 est donc un inhibiteur de la prolifération cellulaire permettant l'induction de gènes induisant l'arrêt du cycle cellulaire comme les gènes *Cdk* et *p21^{CIP1}*. L'analyse de souris KO *klf4* a montré que la délétion de ce gène induisait une perte de plus de 90% des cellules à mucus au niveau du côlon (Altmann 1983). Néanmoins, son action est différente au niveau de l'iléon, où le nombre de cellules à mucus est plus important chez les souris KO. Le gène *klf4* régulerait le nombre et la maturation des cellules caliciformes de l'iléon et jouerait un rôle dans la maturation et la différenciation de ces cellules au niveau du côlon (Ghaleb, McConnell et al. 2011) (Yu, Chen et al. 2012).

La production de mucus se fait en continu car il est éliminé en permanence par l'organisme grâce aux mouvements péristaltiques et à sa digestion par les bactéries du microbiote (Powel, 1987). Environ 10L de mucus est sécrété par jour par les cellules caliciformes chez l'Homme (Cone 2009). A maturité, les cellules caliciformes produisent et sécrètent des protéines appelées mucines.

2. Organisation fonctionnelle du mucus

i. Les mucines

Ces mucines sont des glycoprotéines dont le représentant majoritaire, retrouvé dans l'intestin, est MUC2. La superposition de ces mucines hautement glycosylées conduit à la formation d'un réseau viscoélastique, le mucus (Johansson, Ambort et al. 2011). Le mucus est un gel très hydraté contenant environ 95% d'eau et des mucines mais également des électrolytes, des acides gras et phospholipides, des immunoglobulines, des protéines des molécules anti microbiennes (Lichtenberger 1995) (Allen, Flemstrom et al. 1993) (Ehehalt, Wagenblast et al. 2004).

C'est l'organisation de ces mucines qui définit les propriétés du mucus. Les mucines sont présentent sous deux formes :

- les mucines sécrétées utilisent leurs N- et C-terminaisons pour former un polymère comparable à un gel aboutissant à la formation d'un réseau stable et organisé. Famille composée de 5 membres, la mucine principale est MUC2, résistante aux protéases endogènes et aux enzymes digestives grâce aux glycanes, ces N- et C- terminaisons sont stabilisées par de nombreux liens cystéine-aminoacides. Les mucines subissent des N et O glycosylations dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Une fois complètement glycosylées, les mucines sont stockées dans des vésicules (Thornton, Rousseau et al. 2008) avant d'être sécrétées par exocytose soit de manière constitutive soit par une voie d'activation calcium dépendante. Cette sécrétion peut être également stimulée par les hormones, des composés bactériens ou des bactéries, des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1a beta??? IL4, IL13 (Forstner 1995) (Plaisancie, Barcelo et al. 1998) (Songhet, Barthel et al. 2011), mais aussi des neuromédiateurs dans le côlon (Davis and Dickey 2008). De même, certains pathogènes comme *H. pylori* peuvent réguler à la baisse la production de mucus favorisant leur implantation (Linden, Wickstrom et al.

2008). Il existe également 3 mucines, de petites tailles, qui ne forment pas un gel de par leur incapacité à se polymériser.

- les 11 mucines transmembranaires sont composées d'un domaine extracellulaire (structure rigide), un domaine transmembranaire (ancrage de la mucine dans la membrane apicale de l'entérocyte) et une queue cytoplasmique en C terminale offrant des sites potentiels de phosphorylation et de transduction de signaux. Ces mucines ont la capacité d'être clivées par un processus enzymatique ou auto catalytique encore inconnu (Soto, Zhang et al. 2006) (Lidell and Hansson 2006). Localisées au pôle apical de la cellule épithéliale, MUC3, MUC12 et MUC17 forment le glycocalyx (Weiss, Babyatsky et al. 1996). Le rôle de ces mucines n'est pas clairement décrit mais elles joueraient un rôle important de barrière de diffusion au niveau de l'épithélium intestinal, inhibant le passage de larges molécules (Ito 1969) (Hattrup and Gendler 2008).

ii. Barrière antimicrobienne au niveau de l'iléon

A la différence du côlon, l'intestin grêle ne présente qu'une seule couche de mucus, peu adhérente et non stratifiée (figure 6). Ainsi, la couche est nettement plus fine au niveau de l'intestin grêle, n'altérant pas l'absorption des nutriments. Composée principalement par MUC2, elle présente des propriétés proches de la couche externe du mucus colique mais reste extrêmement peu colonisée par le microbiote commensal. La protection des cellules de l'épithélium est assurée par la concentration en molécules bactéricides ou immunologiques comme les peptides antimicrobiens, les immunoglobulines ou les cytokines au niveau de cette couche de mucus. Les peptides antimicrobiens sécrétés forment avec le mucus une barrière physique et antimicrobienne hautement concentrée afin de prévenir l'attachement des bactéries et l'invasion par des pathogènes (Meyer-Hoffert, Hornef et al. 2008). Ainsi ce complexe mucus/composés antibactériens contrôle et limite les interactions entre l'épithélium et le microbiote intestinal sans toutefois modifier le nombre de bactéries présentes dans la lumière intestinale (Johansson and Hansson 2011).

De plus, le mucus joue un rôle dans la mise en place de la tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux. Les glycanes des mucines piègent les pathogènes dans le mucus qui seront ainsi éliminés par le péristaltisme (Johansson, Phillipson et al. 2008) (McGuckin, Linden et al. 2011). Les glycanes associés avec MUC2 permettent la création d'un complexe *galactin 3 Dectin 1 FcγRIIB* conduisant à l'activation de la β -caténine dans les cellules dendritiques (Shan, Gentile et al. 2013). L'activation de cette voie bloque la synthèse de

cytokines proinflammatoires en inhibant la voie NFκB, et active la sécrétion d'IL10 qui contribue à la mise en place de la tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux (Shan, Gentile et al. 2013).

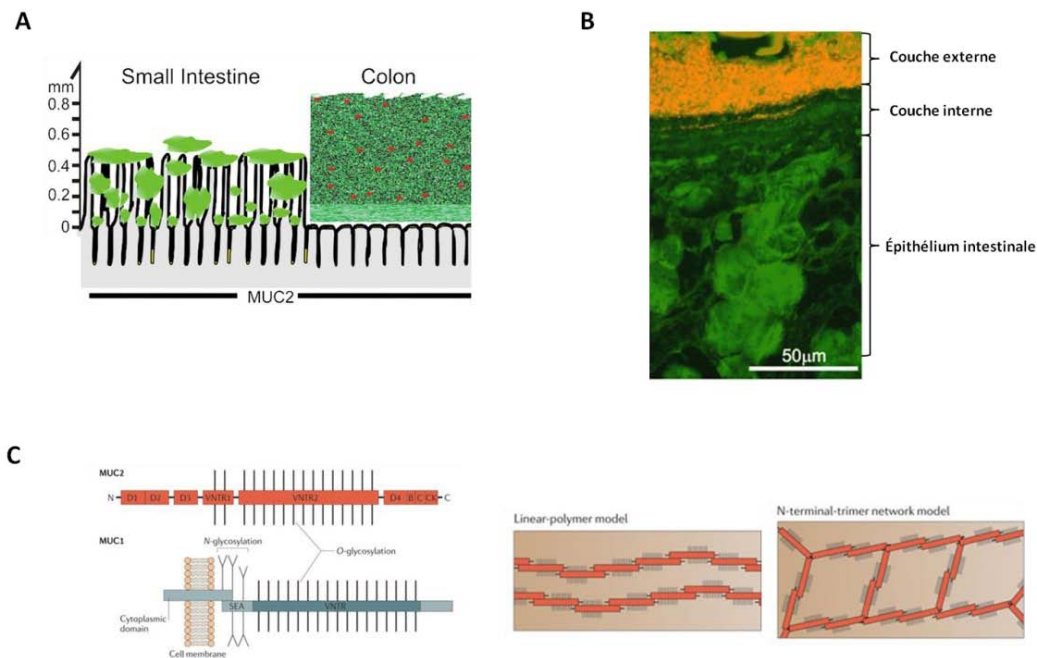


Figure 6 : Comparaison de la structure du mucus dans l'intestin grêle et le côlon (adapté de (Johansson, Larsson et al. 2011) (McGuckin, Linden et al. 2011))

(A) Les cellules caliciformes produisent des mucines qui conduisent à la formation d'un gel, nommé mucus. Le réseau de mucus est plus ou moins colonisé par les bactéries de la lumière intestinale. Une seule couche de mucus est observée au niveau de l'iléon ; au niveau du côlon, le mucus se compose de deux couches distinctes par leur organisation. (B) : au niveau du côlon, deux couches de mucus sont visibles, l'une stérile au contact de l'épithélium intestinal et la seconde externe colonisée par les bactéries de la lumière intestinale ; visualisation du mucus par Fluorescent In Situ Hybridization ; MUC2 apparaît ici en vert. (C) : mucines et type de maillage observé selon la couche de mucus, dense pour la couche interne et plus lâche pour la couche externe.

iii. Niche écologique au niveau du côlon

Au niveau colique, le mucus se décompose en deux couches successives qui se distinguent par leurs différentes propriétés physico-chimiques et mécaniques (Johansson, Ambort et al. 2011) (figure 6) :

- la couche externe est moins dense et épaisse, facile à retirer et fait face à la lumière intestinale. Issue de la couche interne devenue inerte, son épaisseur est augmentée de 4 à 5 fois par clivage protéolytique de MUC 2 permettant son déploiement dans l'espace. Cette expansion offre une niche nutritive au microbiote commensal et à l'épithélium intestinal (production d'acides gras à chaînes courtes issus de la dégradation du mucus par les bactéries) (Wong, de Souza et al. 2006). Son épaisseur est de l'ordre de 800 µm chez le rat (Atuma,

Strugala et al. 2001) (Hansson 2012). Néanmoins, les mécanismes à l'origine de la transition entre les couches internes et externes sont inconnus (Johansson and Hansson 2011) mais semblent indépendants de la colonisation bactérienne car une couche externe de mucus est observé chez les souris axéniques (Johansson, Phillipson et al. 2008).

- la couche interne ou adhérente, en contact avec l'épithélium intestinal, est fine, dense et stratifiée (Atuma, Strugala et al. 2001). Lors de l'exocytose, les mucines se déploient jusqu'à atteindre 1000 fois leurs volumes et elles s'entassent les unes sur les autres jusqu'à l'obtention d'une couche ancrée à la surface de l'épithélium (Round, Rigby et al. 2012). Cette couche mesure plusieurs centaines de micromètres chez l'Homme et est plus fine chez le rongeur (entre 50 et 100µm) (Johansson, Phillipson et al. 2008). Son renouvellement est assuré par les cellules caliciformes. En conditions physiologiques, cette couche est dépourvue de bactéries vivantes mais on y retrouve des motifs bactériens en contact avec l'épithélium (Johansson, Phillipson et al. 2008). Ces derniers participent à l'homéostasie intestinale en « stimulant » la production de peptides antimicrobiens ou de mucus par l'épithélium (Meyer-Hoffert, Hornef et al. 2008).

Des modèles de transfert de microbiote chez les animaux axéniques ont montré que la reconnaissance des bactéries par l'épithélium intestinal induisait la production et la sécrétion de mucus (Tomas, Wrzosek et al. 2013). De plus, une mutation du gène MUC2 altère la production de mucus induisant une susceptibilité au développement de colite spontanée (Van der Sluis, De Koning et al. 2006). Chez les souris IL10^{-/-} ou MUC2^{-/-}, la couche interne de mucus colique normalement stérile est colonisée par des bactéries alors que son épaisseur n'est pas modifiée. Ces résultats suggèrent l'importance de sa « qualité » plus que de sa « quantité » (Johansson, Gustafsson et al. 2014). Chez les souris IL10^{-/-} / MUC2^{-/-}, la production de cytokines pro-inflammatoires et la perte de la protection par le mucus conduisent à une inflammation plus importante que chez les souris qui ne sont déficientes que pour un seul des deux gènes (Burger-van Paassen, van der Sluis et al. 2011). Le mucus joue donc un rôle essentiel dans la barrière physique mais aussi dans le contrôle du microbiote intestinal, limitant son accès avec l'épithélium.

C. Les cellules de l'immunité innée

1. Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées ou ILC sont divisées en 3 groupes les ILC3 impliquées dans la réponse innée vis-à-vis du microbiote commensal, ILC2 réponse au parasites et ILC1 dans la résistance à l'inflammation (Sawa, Lochner et al. 2011). Elles sont définies par 3 grandes caractéristiques : une absence du récepteur associé au gène d'activation de recombinaison (RAG), une absence de TCR (*T cells receptor*) et un manque de marqueurs phénotypiques des cellules myéloïdes, des cellules dendritiques et de morphologie lymphoïde (Spits and Cupedo 2012). De récentes études ont montré que les ILC seraient des effecteurs importants dans la réparation des tissus, la maîtrise de la colonisation bactérienne et contribuent au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Monticelli, Sonnenberg et al. 2011) (Sonnenberg, Monticelli et al. 2012) (Sonnenberg, Monticelli et al. 2011). De plus, les ILC seraient impliquées dans les maladies inflammatoires digestives.

Il existe 3 groupes d'ILCs (figure 7) :

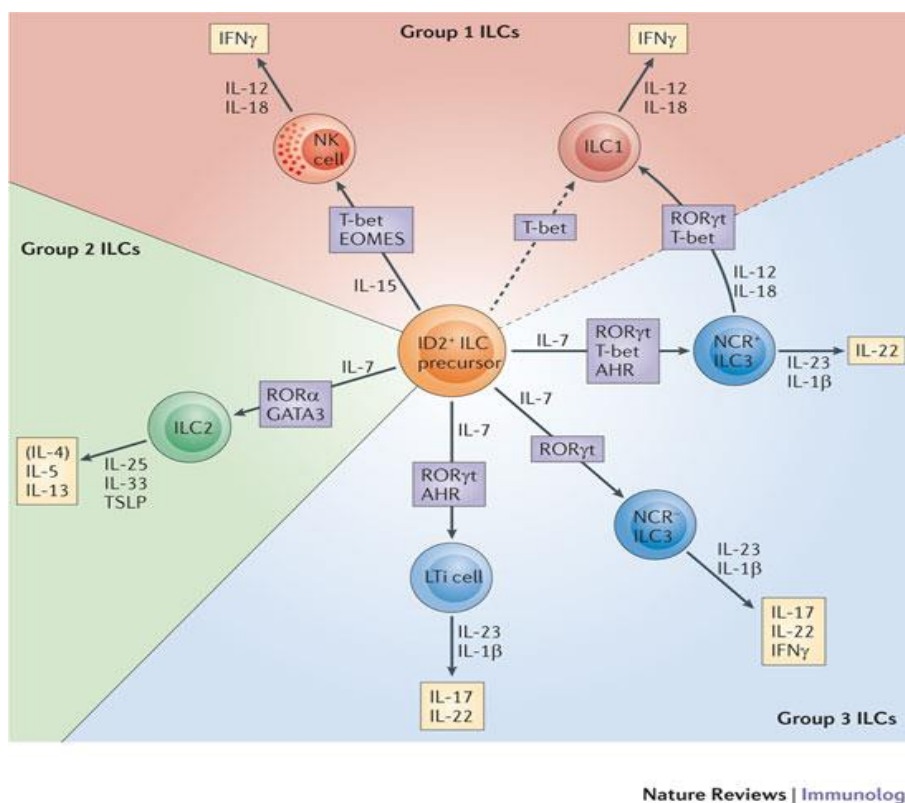


Figure 7 : Classification des cellules lymphoïdes innées et critères fonctionnels (Spits, Artis et al. 2013)

Issues d'un même précurseur, les ILC vont s'orienter selon l'environnement et l'expression de gènes, qui vont activer des récepteurs. Selon le groupe, les ILC sécrèteront différentes cytokines.

- **Les ILC1 et cellules Natural Killer** : elles sont caractérisées par la production d'IFN γ et leur capacité à produire des cytokines associés aux profils Th1 (IFN γ) ou Th17. Les NK ne possèdent pas seulement une activité cytotoxique mais peuvent produire une

grande quantité d'IFN γ après activation. Le facteur de transcription T-bet associé aux cellules Th1 (codé par le gène *Tbx21*) collabore avec l'eomésodermine, un autre facteur de transcription T-bet dans la régulation du développement et la fonction des cellules NK (Gordon, Chaix et al. 2012). NKp46 n'est pas un marqueur exclusif des cellules NK, il est aussi exprimé par les ILC productrices d'IL22 chez la souris et chez l'Homme. Chez l'Homme, les ILC sont définies par l'expression de CD16, CD56 et CD94. Un autre sous-groupe d'ILC1 ne produisant que de l'IFN γ et différent des NK a été identifié chez la souris et chez l'Homme. Ces cellules ne présentent pas le CD117 et expriment fortement le T-bet et très peu ROR γ t (Bernink, Peters et al. 2013), le tout sous l'influence de l'IL12 produite par des ILC exprimant ROR γ t. T-bet régule positivement la production d'IFN γ et négativement la production d'IL17 (Powell, Walker et al. 2012).

- **Les ILC2** : ces cellules nécessitent la présence d'IL7 dans l'environnement pour être induites et produisent des cytokines associées au profil Th2 (IL4, IL5 ou IL13) suite à leur activation par l'IL25 ou l'IL33 (Moro, Yamada et al. 2010) (Hurst, Muchamuel et al. 2002). L'activation par l'IL25 des ILC2 permet la libération d'IL5 induisant une résistance à l'infection par le parasite *Nippostrongylus brasiliensis* (Fallon, Ballantyne et al. 2006). Les ILC peuvent également libérer de l'IL6 et de l'IL9 nécessaires pour la résistance vis-à-vis des nématodes (Wilhelm, Hirota et al. 2011). Tout comme les cellules de type Th2, les ILC2 sont dépendantes du facteur de transcription GATA3 et ROR α pour leur développement et la mise en place de leur fonctions (Hoyler, Klose et al. 2012) (Halim, MacLaren et al. 2012). Chez l'Homme, les ILC2 expriment ST2 (appelé aussi IL-1RL1), élément essentiel dans la composition du récepteur à l'IL33, et l'IL-17RB, sous unité du récepteur à l'IL25 (Monticelli, Sonnenberg et al. 2011). Les ILC2 expriment également CRTH2 et CD161 (Mjosberg, Bernink et al. 2012).
- **Les ILC3** : ces cellules sont caractérisées par la production d'IL17A et/ou d'IL22. Comme les cellules de type Th17, les ILC3 sont dépendantes du facteur de transcription ROR γ t mais également de l'IL7. Le premier sous-groupe décrit est composé des cellules LT_i, qui sont essentielles dans la formation des organes lymphoïdes secondaires durant la gestation. Ces LT_i sont capables de produire l'IL17A et de l'IL22 après stimulation (Takatori, Kanno et al. 2009). Plus récemment, un autre sous-groupe, toujours sous le contrôle du facteur de transcription ROR γ t, se différencie des cellules LT_i par son phénotype. En effet, les cellules de ce groupe expriment NCR NKp46 et produisent de l'IL22 et pas de l'IL17 (Luci, Reynders et al.

2009) (Satoh-Takayama, Vosshenrich et al. 2008). Cette production d'IL22 est essentielle dans la réponse innée contre certaines bactéries comme *Citrobacter rodentium* dans l'intestin (Satoh-Takayama, Vosshenrich et al. 2008). Un dernier sous-groupe est caractérisé par l'absence de NKp46 et produit de l'IL22 mais aussi de l'IL17 et de l'IFN γ . Chez l'Homme, les LTI sont retrouvés dans les nœuds mésentériques durant la vie fœtale. Ils ne présentent pas le CD4 comme marqueur de surface (Cupedo, Crellin et al. 2009) mais expriment des équivalents du NCR comme NKp30 ou NKp44 (Cella, Fuchs et al. 2009). Les ILC3 peuvent influencer la réponse immunitaire adaptative. En effet, les ILC3 expriment le MHC II, leur permettant de présenter l'antigène et limitent la réponse immunitaire adaptative vis-à-vis du microbiote commensal. Une diminution des ILC3 altère cette réponse T, induisant une inflammation intestinale spontanée et dérègle la réponse humorale spécifique vis-à-vis du microbiote conduisant à une inflammation de bas grade au niveau systémique (Hepworth, Monticelli et al. 2013) (Sonnenberg, Monticelli et al. 2012).

2. *Les mastocytes*

Ce sont des cellules produites au niveau de la moelle épinière issues de cellules pluripotentes. Les mastocytes expriment des récepteurs membranaires qui reconnaissent les immunoglobulines E avant même la fin de leur maturation. Leur différenciation dépend de cytokines comme l'IL3, IL4 ou IL10 (Metcalfé, Baram et al. 1997). Les précurseurs des mastocytes passent par la circulation générale et expriment leur phénotype final sous l'influence du Stem Cell Factor ou des cytokines présentes au niveau local. On les retrouve généralement au niveau des nerfs, vaisseaux sanguins ou lymphatiques et leur nombre est constant.

Les mastocytes produisent des granules sécrétoires qui libèrent leur contenu après la reconnaissance d'un ligand à leur surface. Les médiateurs libérés sont de nature variée comme l'histamine, les prostaglandines, des protéases, des médiateurs préformés associés aux granules sécrétoires ou des cytokines. Le plus souvent, la dégranulation se fait par la reconnaissance d'allergènes mais aussi par des stimuli non immunologiques comme des neuropeptides ou des facteurs physiques (Moriwaki, Fujii et al. 1997). Les mastocytes sont des cellules effectrices des réactions d'hypersensibilité immédiate mais sont également impliqués dans le développement et la modulation de réactions inflammatoires et immunologiques locales. En effet, l'étude de la proximité entre les mastocytes et les nerfs a montré un lien direct entre ces deux acteurs dans la modulation de la douleur viscérale dans certaines pathologies intestinales comme le syndrome de l'intestin irritable.

3. Les récepteurs de l'immunité innée

Les cellules épithéliales doivent être capables de réagir rapidement et efficacement lors d'un contact avec un microorganisme. Des récepteurs spécifiques nommés PRR (*pattern recognition receptor*) reconnaissent les MAMPs (*Microbiota-associated molecular patterns*), structures définissant les groupes bactériens, commensaux ou pathogènes (Janeway, Dianzani et al. 1989). Ces PRRs regroupent des récepteurs de surface comme les TLRs (*Toll-Like Receptor*) et des récepteurs intracellulaires comme les NODs (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*). Ces récepteurs se retrouvent sur les cellules épithéliales mais également les cellules immunitaires. L'activation via un de ces récepteurs provoque une cascade de réactions conduisant à l'activation de gènes de la réponse immunitaire innée permettant de restaurer l'homéostasie intestinale.

i. Les TLRs

Les TLRs sont des récepteurs présents chez les mammifères, y compris l'Homme et sont issus du même gène *Toll* que celui décrit chez la drosophile. Ces récepteurs transmembranaires possèdent un domaine de reconnaissance au ligand extracellulaire, riche en leucine appelé LRR (*Leucine-Rich Repeat*) et un domaine intracellulaire nommé *Toll/IL-1 receptor homology* (TIR) (Akira and Takeda 2004). La famille des TLRs regroupent 10 récepteurs (TRL1 à TRL10) chez l'Homme et 12 chez la souris (O'Neill 2006) (figure 8). Les TRLs peuvent être exprimés au niveau de la membrane plasmique (TLR 1/2/4/5/6/10), en intracellulaire (TLR 3/7/8/9) (Takeda and Akira 2005) ou sur les endosomes (Kanzler, Barrat et al. 2007). Ces récepteurs ont été retrouvés sur de nombreux types cellulaires différents comme les cellules du système immunitaire (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T...) et des cellules non immunitaires (fibroblastes, cellules épithéliales...) (Iwasaki and Medzhitov 2004). Les cellules épithéliales intestinales expriment les TLR2/3/4/5/9.

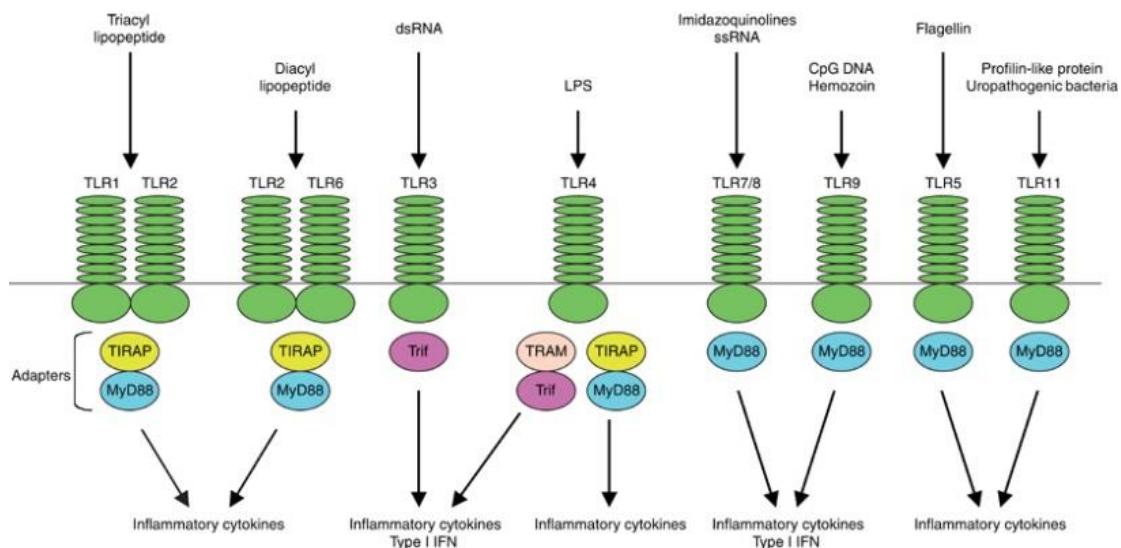


Figure 8 : Les TLRs et leurs ligands (Kawai and Akira 2006)

L'activation de ces récepteurs se fait au moment de la liaison avec la molécule ligand présente dans les microorganismes, les MAMPs, et cela de manière spécifique : chaque TRL reconnaît un certain type de MAMPs (par exemple, la flagelline qui compose le flagelle des bactéries est le ligand de TLR5) (figure 8). A l'exception de TLR3, la voie de signalisation des TLRs passe par le MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*), recrutant la kinase IRAK 1 et 4, induisant majoritairement la voie NF- κ B conduisant à l'expression de gènes proinflammatoires, de facteurs antimicrobiens et de molécules de co-stimulation sur les cellules présentatrice d'antigènes ou les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

ii. Les NODs

NOD 1 et 2 sont des récepteurs intracellulaires qui reconnaissent le peptidoglycane de la paroi des bactéries Gram négatif et positif, induisant la voie NF- κ B (Chamaillard, Girardin et al. 2003). NOD 1 reconnaît les fragments de PNG composés de meso-diaminopimelic acid (meso-DAP), retrouvés chez beaucoup de bactéries Gram négatives et chez certains Gram positives (Girardin, Boneca et al. 2003). NOD 2 reconnaît lui le muramyl dipeptide (MDP) qui est un motif du peptidoglycane des bactéries Gram positives et négatives (McDonald, Chen et al. 2005).

Ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans le contrôle du microbiote commensal et la mise en place de la réponse immunitaire innée dans l'intestin (Clarke, Davis et al.). Ils collaborent de manière étroite avec les TLRs et participent à la mise en place de la réponse immunitaire innée vis-à-vis des pathogènes. Lors de l'entrée de bactérie par phagocytose ou par invasion, l'activation des NOD induit la production de cytokines proinflammatoires ou de peptides antimicrobiens dans les cellules de Paneth (Girardin, Boneca et al. 2003) (Fritz, Ferrero et al. 2006). Toutefois, le lien entre NOD2 et la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth est discuté. Il avait été démontré que les souris déficientes en NOD2 avaient une diminution significative de la production de peptides antimicrobiens (Kobayashi, Science, 2005). Mais des travaux récents indiquent que la fonctionnalité des cellules de Paneth est indépendante de NOD2 (Shanahan, Carroll et al. 2014). L'obtention de ces résultats divergents pourraient être attribué à la variabilité du statut sanitaire dans les animaleries et donc à la composition du microbiote de ces animaux.

III. Le GALT et immunité acquise

Lorsqu'un organisme ou une molécule de la lumière intestinale entre en contact avec l'épithélium intestinal, la cellule doit être capable de savoir s'il s'agit d'un antigène tolérable et admis, qu'il soit alimentaire ou bactérien, ou s'il s'agit d'un microorganisme pathogène qui doit être détruit. La tolérance correspond à la suppression de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène qu'il soit alimentaire ou bactérien. La muqueuse intestinale est associée à un système immunitaire intestinal, le *Gut Associated Lymphoid Tissue*, dit GALT, lui-même en lien étroit avec le système immunitaire local (ganglions mésentériques) et systémique (rate).

A. Les organes lymphoïdes de la muqueuse intestinale

Le GALT est composé de cellules immunocompétentes. Il est divisé en deux compartiments : un site inducteur, comprenant des formations lymphoïdes appelées plaques de Peyer, site principal d'initiation des réponses immunitaires, et un compartiment effecteur, composé par les plasmocytes (cellules B productrices d'immunoglobulines) et les lymphocytes T, produisant respectivement des anticorps et des cytokines. Distribués le long de l'intestin grêle et le côlon, ces deux compartiments sont reliés par les voies hémo-lymphatiques.

1. *Les plaques de Peyer*

Situées tout le long de l'intestin grêle et plus particulièrement au niveau de l'iléon, les plaques de Peyer sont composées de trois zones :

- l'épithélium associé au follicule (FAE) : épithélium spécialisé composé de cellules M et d'entérocytes, il recouvre les plaques de Peyer formant une interface entre l'environnement de la lumière intestinale et le système lymphoïde intestinal.
- le dôme sous épithélial : zone diffuse et enrichie en lymphocytes B et T associées à des cellules dendritiques et des macrophages.
- la zone folliculaire ou lymphoïde : composée de follicules de cellules B immatures associées avec un centre germinatif séparé par des zones interfolliculaires T qui sont spécialisées dans la sensibilisation des lymphocytes T.

Le renouvellement des lymphocytes B et T est permis par un pool circulant de lymphocytes. L'expression membranaire de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ permet la fixation à Mad-CAM1

(*Mucosal addressin Cell-Adhesion Molecule 1*) exprimé sur les cellules endothéliales et permettant l'adhésion des lymphocytes à la paroi des vaisseaux et leur migration dans les tissus sous-jacents où ils rejoignent les zones B ou T (Arroyo, Yang et al. 1996) (Bargatze, Jutila et al. 1995) (Wagner, Lohler et al. 1996).

2. *Cryptopatches et follicules lymphoïdes isolés*

Découverts en 1996, les cryptopatches sont des amas de cellules lymphoïdes, divisés en deux sous types de populations (Ishikawa and Minami 1996). Au centre, des lymphocytes qui expriment le récepteur IL7 α , le CD44 et le c-kit, mais n'expriment aucun marqueur des lymphocytes T, B ou des macrophages, ce qui les rend semblables à des cellules précurseurs aux lymphocytes T. Ces cellules sont entourées de cellules dendritiques CD11c⁺. Ces structures ne sont visibles chez le rongeur qu'à partir de 14 jours et sont localisés dans l'intestin grêle et le côlon. De plus, l'expression du récepteur CCR6 par les cellules formant les cryptopatches permet le développement des follicules lymphoïdes isolés (Lugering, Kucharzik et al. 2003). Ces follicules lymphoïdes isolés sont composés d'un épithélium associé, de cellules dendritiques, de macrophages et de lymphocytes T et B (Neutra, Mantis et al. 2001) (O'Brien, Fitzpatrick et al. 2008). Après reconnaissance d'un antigène, les cellules dendritiques vont se disperser dans la *lamina propria* et permettre la maturation des lymphocytes B (Lindhout, Koopman et al. 1997).

3. *Les cellules dendritiques : cellules de reconnaissance et d'activation*

Les cellules dendritiques font partie des CPAs. Elles jouent un rôle essentiel dans l'activation et la présentation des antigènes aux lymphocytes T ou B permettant l'élimination efficace des antigènes indésirables ou pathogènes. Les CPAs dérivent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Grâce à l'influence de facteurs environnementaux, ces cellules vont se différencier et acquérir de nouveaux récepteurs membranaires comme le CMH classe II ou le CD 11 a/b/c. Selon le précurseur exprimé par la cellule, la différenciation terminale conduira à un monocyte/macrophage ou à une cellule dendritique.

Les cellules dendritiques ou DCs sont considérées comme les sentinelles de l'organisme et participent à la mise en place et la régulation de la réponse immunitaire face aux antigènes luminaux. Ces cellules peuvent être immatures ou matures. Les cellules immatures sont localisées dans les tissus périphériques et dans les muqueuses, portes d'entrée potentielles pour les pathogènes. Lors de la reconnaissance d'un antigène luminal, la DC de la muqueuse intestinale va produire des cytokines permettant le recrutement de la première ligne de défense de l'organisme (neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules *Natural Killer*

(NK)). La DC peut libérer de l'IL10 ou du TGF β afin de mettre en place une tolérance vis-à-vis de l'antigène reconnu ou bien de l'IL12 qui va orienter vers une réponse pro inflammatoire de type Th1. Les DCs exposent à leur surfaces des fragments ou peptides antigéniques apprêtés et migrent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Ces organes, en particulier les ganglions mésentériques, constituent une réserve majeure de cellules immunitaires (Worbs, Bode et al. 2006).

Les DCs possèdent des projections caractéristiques, nommées dendrites, spécialement conçues pour capter et présenter l'antigène aux lymphocytes. L'acquisition de nouveaux récepteurs membranaires terminent leur maturation induisant leur capacité à présenter ces antigènes aux lymphocytes T ou B, devenant eux aussi des lymphocytes spécifiques et matures. Par exemple, l'acquisition des facteurs de co-stimulation CD80/86 permet l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺.

Les populations de DCs retrouvées majoritairement dans l'intestin grêle sont des cellules dendritiques conventionnelles de type CD11b⁺ CD11c⁺ ayant la capacité de présenter l'antigène aux cellules T naïves (Farache, Koren et al. 2013) (Farache, Zigmund et al. 2013). La présence du CD103⁺ permet le maintien de l'homéostasie intestinale grâce à la sécrétion de facteurs régulateurs comme le TGF β ou de l'acide rétinoïque induisant la différenciation des cellules T naïves en lymphocytes T régulateurs (Scott, Aumeunier et al. 2011) et au développement de plasmocytes à IgA (Uematsu, Fujimoto et al. 2008).

La présence du microbiote permet l'induction des lymphocytes T régulateurs (Treg) et des IgA via les DC (Cong, Feng et al. 2009). Présents au niveau des plaques de Peyer, de la *lamina propria* et dans les organes lymphoïdes secondaires, elles permettent la tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux, alimentaires ou bactériens. Elles initient la réponse immunitaire adaptative. En effet, les DCs sont capables de distinguer les bactéries commensales limitant l'initiation d'une réponse immunitaire inappropriée de type pro inflammatoire (Rizzello, Bonaccorsi et al. 2011) (Akira and Takeda 2004). Les bactéries liées aux DCs restent retenues au niveau des ganglions mésentériques sans aller jusqu'à la rate, évitant une réponse humorale IgG systémique spécifique (Macpherson and Uhr 2004).

B. La réponse immunitaire au sein de la muqueuse intestinale

Après avoir pénétré l'épithélium intestinal, les antigènes ou microorganismes sont soit directement phagocytés et détruits par les macrophages, soit captés et apprêtés par les DC immatures. Les DCs peuvent induire deux types de réponse qui dépendent de leur migration

vers les zones T ou B et de l'environnement dans lequel elles se trouvent, permettant l'établissement d'une immunité adaptative. La réponse humorale est organisée par les lymphocytes B et la réponse cellulaire par les lymphocytes T. Elle est médiée par les CPAs via le CMH classe II induisant la production de cytokines et d'anticorps.

1. La réponse humorale

La réponse humorale est assurée par les lymphocytes B, producteurs d'immunoglobulines (Ig). Les IgA représentent 75% des Ig de la muqueuse intestinale (Macpherson, McCoy et al. 2008). Sous l'influence de cytokines comme le TGF β ou l'IL10 produits par les DCs, les lymphocytes B immatures qui produisent des IgM vont subir une commutation de classe et produire des IgA. La majorité des plasmocytes intestinaux à IgA provient de plasmocytes sensibilisés au niveau des plaques de Peyer. Les IgA peuvent être également produites par des structures lymphoïdes organisées comme les plaques de Peyer ou les follicules lymphoïdes isolés. L'activation des cellules dendritiques, stromales ou des lymphocytes T ou B permet la libération de cytokines comme le TGF β , induisant la production d'IgA (Suzuki and Fagarasan 2008). Ces IgA seront ensuite sécrétés dans la lumière intestinale grâce à des récepteurs spécifiques pIgR (voir chapitre I, Partie I.C.2.ii) (figure 9).

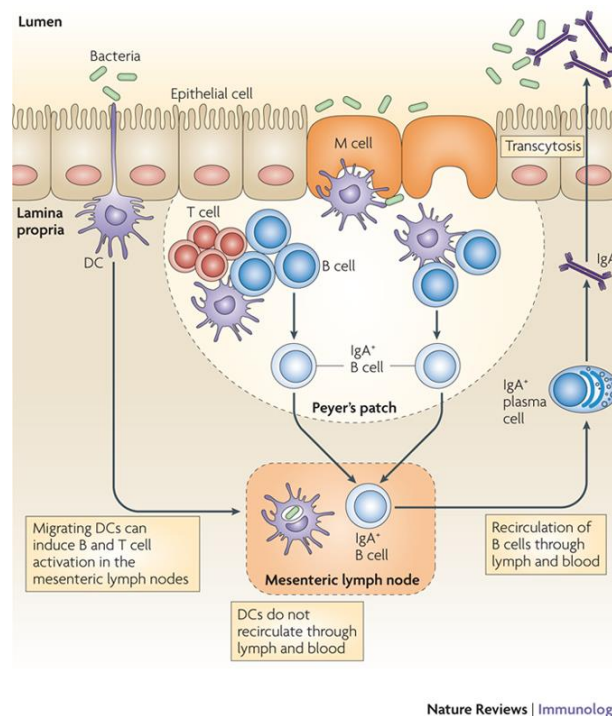


Figure 9 : Organisation structurelle d'une plaque de Peyer et capture de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Hooper and Macpherson 2010)

Dépourvues de mucus, les cellules M sont en contact avec les antigènes de la lumière intestinale. Les CPA peuvent également capturer directement les antigènes. Une fois dans la lamina propria, les CPA les présentent aux lymphocytes, ici des plasmocytes à IgA, soit au niveau de la plaque de Peyer, soit au niveau des ganglions mésentériques. Cette reconnaissance conduit à la sécrétion d'sIgA dans la lumière intestinale, afin de maintenir l'homéostasie intestinale.

Chez la souris, le composant sécrétoire assure l'ancrage des sIgA polymériques dans le mucus à la surface des entérocytes grâce à des résidus glycosylés (Phalipon, Cardona et al. 2002). La fonction clé des sIgA dans la défense anti microbienne dans la muqueuse intestinale s'effectue grâce à la formation de complexes immuns qui sont retenus dans le mucus et éliminés par le péristaltisme intestinal (Mazanec, Kaetzel et al. 1992) (Schwartz-Cornil, Benureau et al. 2002) (Fagarasan and Honjo 2003). La plupart des bactéries commensales sont recouvertes de sIgA (van der Waaij, Limburg et al. 1996). Cette affinité est permise par la présence de glycane dans les sIgA (Mathias and Corthesy 2011). Le microbiote participe à la régulation de la production d'IgA. En effet, les souris axéniques, dépourvues de bactéries commensales, présentent une diminution des sIgA intestinales, confirmant le rôle du microbiote sur la production d'IgA. Les sIgA bloqueraient la capacité des bactéries à induire une réponse inflammatoire et limiteraient leur colonisation et pénétration à travers l'épithélium (Peterson 2007) (Phalipon and Corthesy 2003). Il existe donc une interaction et une régulation importante entre IgA et microbiote. La production d'IgA est induite par la colonisation bactérienne qui est elle même régulée par la production d'IgA.

Le pIgR permet le transport des sIgA vers la lumière intestinale (voir chapitre I, Partie I.C.2.ii). Les souris déficientes en pIgR présentent une entrée excessive d'antigènes alimentaires ou issus des bactéries commensales en provenance de la lumière intestinale, conduisant à une sensibilisation au niveau systémique (Johansen, Pekna et al. 1999) (Karlsson, Johansen et al. 2010). De manière intéressante, ces souris ont une augmentation des Treg après un gavage continu d'antigènes alimentaires et présentent une hypersensibilité des cellules T et productrices des IgG au niveau systémique. La réponse humorale permet une maturation adéquate de la barrière intestinale, à l'âge adulte. En renforçant la barrière, les sIgA inhibent l'activation inappropriée par les microorganismes et autres antigènes au niveau de la lumière intestinale.

2. La réponse cellulaire T

Les lymphocytes T (LT) qui migrent dans la muqueuse intestinale sont des lymphocytes conventionnels qui proviennent de la recirculation de LT activés par un antigène au niveau des plaques de Peyer. Cela permet une réponse immunitaire plus efficace et la mise en place d'une tolérance vis-à-vis du microbiote et des antigènes alimentaires. Ces lymphocytes expriment le *T Cell Receptor* (TCR) $\alpha\beta$ et les molécules $CD4^+$, caractéristiques des LT auxiliaires *helper* ou $CD8^+$, définissant les LT cytotoxiques.

Au niveau des plaque de Peyer ou des follicules lymphoïdes isolés, les lymphocytes T $CD4^+$ sont dits naïfs, de type Th0. Au contact des cellules dendritiques et des signaux

produits, ces lymphocytes vont alors se différencier dans la *lamina propria* en LT de type Th1, Th2, Th17 ou Th22 selon l'environnement local (cytokines produites, CD, antigènes...).

La réponse Th se compose de (figure 10):

- Les LT CD4⁺ Th1 sont induits par des agents infectieux comme les bactéries ou les virus et la présence d'IL12 au niveau local. Ils produisent des cytokines pro inflammatoires comme l'IFN γ , le TNF α ou l'IL 2 et expriment des facteurs de transcription comme T-bet.
- Les LT CD4⁺ Th2, induits en présence d'IL4, contrôlent l'immunité humorale et la réponse allergique en produisant des cytokines pro inflammatoires l'IL4, l'IL5 et l'IL13, qui favorisent la production d'anticorps de type IgE par les lymphocytes B et l'activation des mastocytes nécessaires pour la lutte des parasites extracellulaires. Ils expriment le facteur de transcription GATA-3.
- Les LT CD4⁺ Th17 sont induits par l'IL6, l'IL23, IL1 β et le TGF β (Jager and Kuchroo 2010) (Weaver, Hatton et al. 2007) et possèdent des propriétés plus ou moins pro inflammatoires, selon le contexte (Harrington, Hatton et al. 2005). Ils produisent majoritairement de l'IL17 mais aussi de l'IL21, l'IL22 ou de l'IL10 (Ouyang, Kolls et al. 2008). L'IL17 peut activer les polynucléaires et la production de peptides antimicrobiens. Elle contribue également à la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales (Brenchley, Paiardini et al. 2008) (Louten, Boniface et al. 2009) en diminuant le recrutement des neutrophiles. IL17 exerce également un contrôle négatif sur les cellules de type Th1 productrices d'IFN γ (O'Connor, Kamanaka et al. 2009).
- Les LT CD4⁺ Th22 sont des lymphocytes auxiliaires immunocompétents. Ils sont impliqués dans la supervision et la coordination de la réponse pro inflammatoire (Zhang, Li et al. 2011). L'IL22 appartient à la même famille de cytokine que l'IL10 (Pestka, Krause et al. 2004) et jouerait un rôle inducteur sur l'immunité innée (Wolk, Kunz et al. 2004). La production d'IL22 par ces lymphocytes permet d'avertir les cellules d'une infection ou d'une réaction inflammatoire. Leur effet est considéré comme protecteur chez les sujets sains alors que l'expression d'IL22 est augmentée dans diverses pathologies comme la maladie de Crohn (Zhang, Li et al. 2011).

La réponse anti inflammatoire est possible grâce aux propriétés immunorégulatrices de certains LT, capables de moduler l'activité des cellules Th1 et/ou Th2. Ces LT régulateurs (Treg) sont CD4⁺ CD25⁺ et expriment le facteur de transcription FoxP3 (figure 10). Ils contrebalancent les fonctions pro inflammatoires des LT effecteurs, diminuent la maturation des DCs par la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme le TGFβ ou l'IL10, permettant le maintien de la tolérance face aux antigènes luminaux (Izcue, Coombes et al. 2006) (Izcue and Powrie 2008). En effet, les souris invalidées pour l'IL10 ou le TGFβ présentent une rupture de la tolérance vis-à-vis du microbiote (Khoo, Proctor et al. 1997). De même, des souris qui ont des cellules B dépourvues de récepteurs à TGFβ sont incapables de produire des plasmocytes à IgA (Borsutzky, Cazac et al. 2004). Le TGFβ est donc essentiel dans la différenciation des plasmocytes et la production des IgA au niveau de la *lamina propria*. Les cellules dendritiques induisent l'expression du récepteur au TGFβ par les plasmocytes en produisant du monoxyde d'azote (Tezuka, Abe et al. 2007).

Le système immunitaire associé à l'intestin est l'objet d'une régulation complexe et possède une double fonction : une première de défense anti-infectieuse qui permet de détruire les pathogènes et une seconde qui permet la tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux alimentaires et bactériens. En conditions physiologiques, l'interaction étroite entre le contenu luminal et les cellules de l'immunité conduit à une réponse tolérogène favorisant la production d'IgA et la différenciation en Treg, capables de différencier les antigènes alimentaires et bactériens inoffensifs des microorganismes pathogènes, conduisant au maintien de l'homéostasie intestinale.

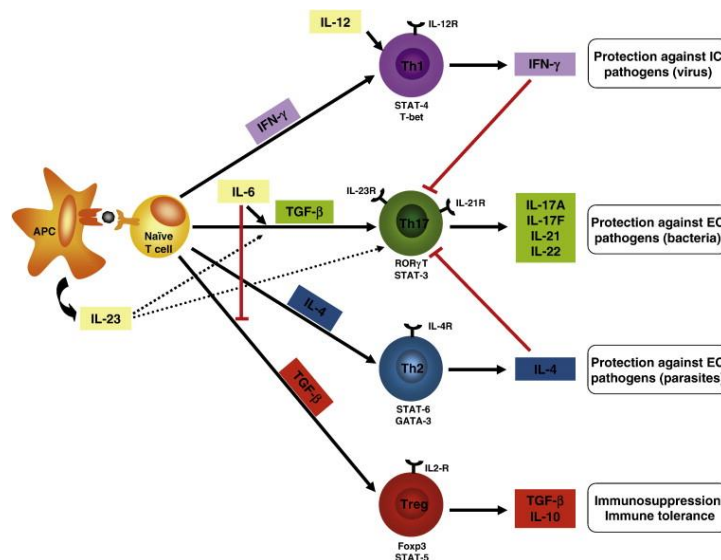


Figure 10 : Différenciation des lymphocytes T et profil de réponse cellulaire Th

La CPA (ici APC pour Antigen Presenting Cell) présente l'antigène à la cellule T naïve. Sous l'effet des cytokines présentes dans l'environnement, cette cellule naïve se différencie en s lymphocytes immunocompétents associés à une réponse inflammatoire (Th1, Th2) ou anti-inflammatoire (Treg). La combinaison des différentes cytokines produites par ces lymphocytes T permet le maintien de l'homéostasie intestinale.

3. Les lymphocytes intra-épithéliaux

Localisées entre les entérocytes, les lymphocytes intra-épithéliaux LIE sont des lymphocytes spécialisés qui interagissent de manière bidirectionnelle avec les cellules épithéliales intestinales permettant le maintien de l'homéostasie intestinale. Les LIE sont à l'interface entre l'immunité adaptative et l'immunité innée. Populations hétérogènes abondantes, 60% des lymphocytes intra épithéliaux expriment le TRC $\gamma\delta$ (Goodman and Lefrancois 1988) (Guy-Grand, Malassis-Seris et al. 1991) et sont $CD8^+$ (Mucida, Husain et al. 2013) et $CD103^+$ (Cepek, Shaw et al. 1994) (Kilshaw and Murant 1990). Les LIE forment une large population de lymphocytes, en majorité $CD8^+$. Chez la souris, une sous-population de LIE exprime l'hétérodimère $CD8\alpha\beta$. Ces LIE possèdent un récepteur T de type $\alpha\beta$ et d'activation par les antigènes du type CMH classe I pour les LT $CD8$ au niveau de l'intestin. Une seconde population de LIE, caractérisée par l'expression d'une chaîne $CD8$ homodimérique $CD8\alpha\alpha$ peut elle-même être divisée en deux sous populations portant soit le $TCR\alpha\beta$ soit le $TCR\gamma\delta$. Elle représente environ 50% des LIE. Les IEL de la souris participent au recrutement des cellules T mémoire $CD8^+$ pour permettre une réponse mémoire plus importante lors d'une seconde stimulation (Huang, Park et al. 2011). Cette forte affinité est garantie par l'expression du corécepteur $CD8\alpha$ ou $CD8\alpha\alpha^+$, interagissant avec le MHC classe I des cellules épithéliales intestinales. Ces cellules ne recirculent pas dans la circulation sanguine (Sugahara, Ohara et al. 1999) et présentent une activité immunitaire en produisant de l' $IFN\gamma$, de l' $IL2$, de l' $IL4$ et de l' $IL17$ (Shires, Theodoridis et al. 2001) (Tang, Chen et al. 2009) (Muller, Buhler-Jungo et al. 2000) (Guy-Grand, Malassis-Seris et al. 1991). L' $IL15$ sécrétée par l'épithélium intestinal semble être une cytokine essentielle dans la survie de ces cellules en augmentant l'expression de facteurs anti-apoptotiques (Malamut, El Machhour et al. 2010) (Inagaki-Ohara, Nishimura et al. 1997) (Kaneko, Mizunuma et al. 2004) (Lai, Minski et al. 1999). L'augmentation de sécrétion d' $IL15$ observée dans la maladie cœliaque, induit une perte de l'homéostasie intestinale en favorisant la survie des IEL anormaux (Mention, Ben Ahmed et al. 2003). Enfin, l' $IL-15$ permet, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, l'activation des IEL intestinaux et particulièrement des IEL $TCR\gamma\delta$ en favorisant leur sécrétion d' $IFN\gamma$ $TNFA$ et leur cytotoxicité (Inagaki-Ohara, Nishimura et al. 1997) (Mitani, Takahashi et al. 1999) (Di Sabatino, Rosado et al. 2006) (Hue, Mention et al. 2004). Cela met en évidence la régulation des LIE par l'épithélium intestinal mais les LIE sont capables en retour de réguler l'épithélium. En effet, des études *in vitro* ont montré que la production de cytokines proinflammatoires comme l' $IFN\gamma$ par les $TCR-\alpha\beta/CD8\alpha\beta$ est capable d'augmenter de la perméabilité de la monocouche épithéliale intestinale (Zufferey, Erhart et al. 2009). De plus, des souris déficientes en $TCR \gamma\delta$ présentent une diminution du nombre de cellules à

mucus et de la longueur des cryptes (Kober, Ahl et al. 2014). Enfin, les souris déficientes en IEL TCR $\gamma\delta$ présentent une susceptibilité plus importante aux infections entériques à Salmonelle (Mixer, Camerini et al. 1994) et une diminution de l'expression de l'angiogénine 4 (Walker et al. 2014). Le mécanisme proposé est le suivant: l'infection à Salmonelle induit la sécrétion d'IL23 par l'épithélium intestinal, qui à son tour induit la sécrétion d'IL22 par les IEL responsable de la sécrétion d'angiogénine 4 par les cellules de Paneth (Walker, Hautefort et al. 2013).

IV. Le microbiote intestinal

Les animaux abritent une communauté microbienne dense et diversifiée, incluant principalement des bactéries mais également des archées, des virus, des champignons, des phages... On retrouve ces microorganismes sur toutes les muqueuses de l'hôte mais la plus grande colonie bactérienne se trouve au niveau de l'intestin (Sommer and Backhed 2013). Chez l'Homme adulte, cet organe renferme environ 10^{14} bactéries, c'est-à-dire 10 fois plus que de cellules qui composent le corps humain (Savage 1977) (Xu, Bjursell et al. 2003).

A. Description et composition

Cet écosystème dynamique très complexe est composé de plus de 100 espèces bactériennes différentes; toutefois, seules 30 à 40 espèces dominantes représentent 99% du microbiote intestinal total (Tannock 1999). Cela explique pourquoi, même si le microbiote commensal de chacun est unique, tout le monde en partage « une base commune ». La colonisation massive de l'intestin débute lors de la naissance et la composition bactérienne de ce dernier évolue tout au long de la vie (figure 11).

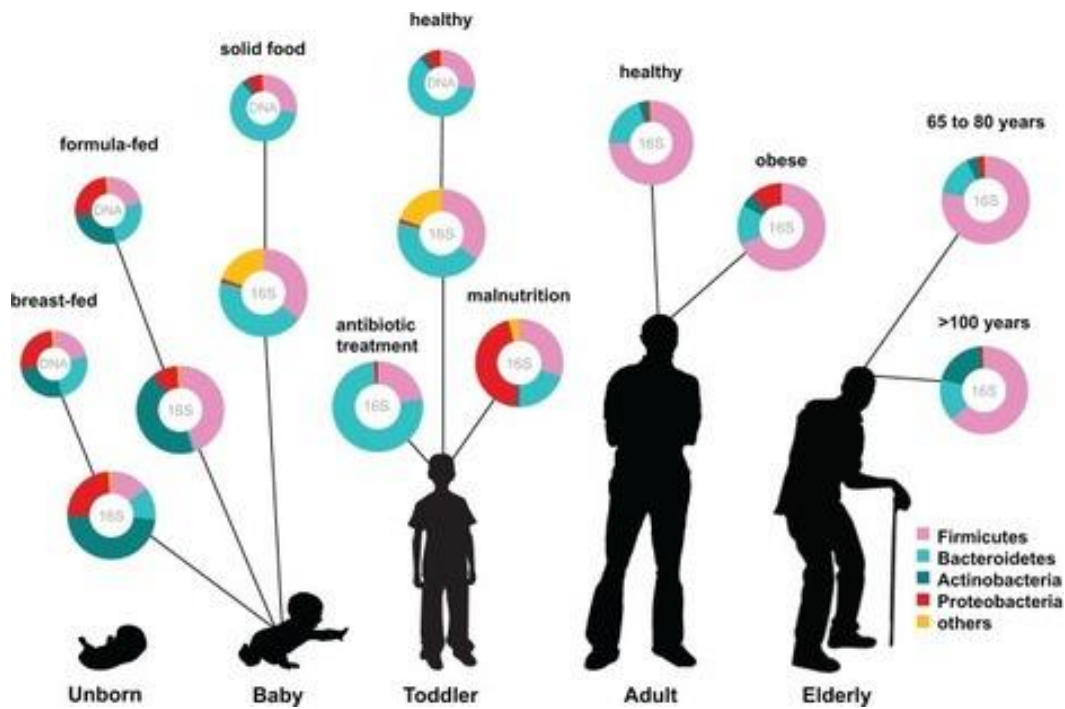


Figure 11 : Evolution du microbiote intestinal selon l'âge et les facteurs environnementaux (Ottman, Smidt et al. 2012)

Le microbiote est principalement acquis à la naissance. Il va alors évoluer de manière importante durant les premiers mois de la vie. Bien qu'il soit plus stable à l'âge adulte, de nombreux facteurs environnementaux comme l'alimentation peuvent l'influencer.

Le microbiote intestinal varie, que ce soit au niveau de sa composition ou de sa densité. Le sevrage ou diversification alimentaire chez l'Homme est une étape clé qui marque le passage d'un microbiote « plastique », instable et peu diversifié, caractéristique de celui d'un nourrisson, vers un microbiote stable observé chez l'adulte. L'apport de nutriments complexes va permettre le développement sélectif de certaines bactéries. Ces dernières vont être capables de transformer ces aliments en d'autres nutriments qui vont pouvoir être utilisés, soit par l'hôte en traversant la barrière épithéliale intestinale, soit par les bactéries commensales les aidant à se maintenir. Ces modifications, aussi bien qualitatives que quantitatives, sont visibles à l'échelle des *phyla*, des genres et des souches de bactéries. Ainsi les *Firmicutes* constituent le *phyla* dominant tout le long de la vie mais sont présents en plus grande proportion chez l'Homme adulte au détriment des *Bacteroidetes* (Xu, Xu et al. 2013).

En condition physiologique, le microbiote est caractérisé par la présence de deux *phyla* majoritaires, les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes*, bien qu'il existe de fortes variations de sa composition au niveau interindividuel. Différents entérotypes ont été définis selon la présence dominante d'un des trois genres *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus* (Arumugam, Raes et al. 2011). Selon le segment intestinal considéré, des variations qualitatives et quantitatives du microbiote ont été observées (Drasar 1974). Ainsi la quantité de bactéries dans la lumière intestinale augmente depuis le duodénum jusqu'au côlon. Le duodénum accueille environ 10^3

bactéries par gramme de contenu luminal avec une prédominance d'espèces aérobies ou anaérobies facultatives, en raison d'un transit relativement court, des acides biliaires induisant un pH acide et des peptides antimicrobiens produits (Porter, Weisblum et al. 2002). Présentant des conditions moins hostiles, le jéjunum et l'iléon contiennent respectivement 10^4 et 10^7 bactéries/gramme de contenu intestinal, permettant l'émergence de certaines bactéries comme les *Enterobacteriaceae* ou des bactéries anaérobies strictes. Le côlon est la zone du TD qui renferme la plus grande densité de bactéries commensales, soit environ 10^{14} bactéries/gramme de contenu colique (Simon and Gorbach 1984). Les espèces majoritaires sont les *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* et *Peptostreptococcus* et environ 100 à 1000 fois plus de bactéries anaérobies que de bactéries aérobies (Sekirov, Russell et al. 2010). Chez l'adulte, les *E. coli*, *Klebsiella* ou *Lactobacillus* représentent des populations sous dominantes. La majorité des transformations et des fermentations des aliments non absorbés par l'épithélium intestinal sont réalisés dans le côlon, grâce à la grande diversité de bactéries présentes permise par la présence importante de mucus dans ce compartiment intestinal.

B. Rôles physiologiques

1. Participation à la nutrition

Certains composés comme les fibres, les oligosaccharides, les monosaccharides ou les disaccharides ne sont pas absorbés au niveau de l'intestin grêle et sont résistants aux enzymes de l'hôte. Toutefois, ils peuvent être dégradés par les bactéries commensales. La fermentation des carbohydrates est réalisée par le microbiote au niveau du côlon et permet notamment la synthèse des acides gras à chaînes courtes (AGCC) comme le propionate ou le butyrate. Ces AGCC sont une source d'énergie importante pour les colonocytes (Pryde, Duncan et al. 2002). Le butyrate est aussi capable de contrôler la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales et cancéreuses (Comalada, Bailon et al. 2006) et joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes Treg (chapitre II D 1). Le microbiote permet aussi la synthèse de vitamines essentielles comme les vitamines B et K ou facilite leur absorption comme c'est le cas pour la vitamine D (Smith, McCoy et al. 2007) (Resta 2009).

2. Barrière physique écologique

En se développant tout le long du TD, le microbiote commensal constitue une ligne de défense supplémentaire en établissant une compétition avec les bactéries pathogènes ce qui limite leur développement ainsi que leur adhésion aux cellules épithéliales (Bernet, Brassart et al. 1993). Des études réalisées sur des animaux axéniques démontrent le rôle protecteur du microbiote contre l'infection. D'ailleurs, l'infection résulte très souvent d'une perturbation du microbiote associée à une réponse immunitaire altérée (Bleich, Kirsch et al. 2008). A la

naissance, l'épithélium intestinal est caractérisé par une hyperperméabilité, la colonisation par les bactéries primo colonisatrices contribue à renforcer la barrière en diminuant la perméabilité intestinale. Certaines souches bactériennes comme *Escherichia coli* Nissle 1917 permettent d'augmenter la résistance transépithéliale en induisant l'expression de gènes codant pour les protéines de jonctions serrées ou en modulant directement l'organisation de ces jonctions (Zareie, Riff et al. 2005) (Ukena, Singh et al. 2007). Le microbiote a également la faculté d'influer, directement ou indirectement, sur la production et la qualité du mucus. Les bifides ou le butyrate peuvent augmenter l'expression de certains gènes comme *muc2* (Wrzosek, Miquel et al. 2013) (Gaudier, Rival et al. 2009) modulant ainsi le profil de la couche de mucus qui, lui-même, participe à l'efficacité de barrière. Ce mucus représente une source nutritive importante pour certaines bactéries comme *Akkermansia muciniphila*, dont il favorise le développement (Ouwwerkerk, de Vos et al. 2013). Le microbiote régule également positivement la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth ou les entérocytes comme Reg3 β and Reg3 γ , lesquels se retrouvent piégés dans le mucus, intensifiant son effet de barrière (Larsson, Tremaroli et al. 2012).

3. *Rôle dans la maturation de la barrière intestinale et la mise en place de la tolérance*

Le microbiote induit des fonctions immunomodulatrices (Arrieta and Finlay 2012) et permet la mise en place d'une tolérance. Le recours aux animaux axéniques a largement contribué à montrer que le microbiote est également essentiel à la maturation de l'épithélium intestinal (Tomas, Wrzosek et al. 2013). Son évolution avec la diversification alimentaire ou le sevrage montre à quel point le microbiote façonne l'architecture et la fonctionnalité de l'épithélium intestinal. En effet, les souris axéniques présentent une hypertrophie du cæcum, une surface intestinale réduite (Gordon 1967) et une bordure en brosse moins différenciée ainsi que des villosités allongées et des cryptes réduites (Falk, Hooper et al. 1998). La colonisation par le microbiote va permettre la maturation de la barrière intestinale et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée. En effet, Les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques sont sous-développés chez les animaux axéniques indiquant une immaturité et une déficience du système immunitaire (Renz, Brandtzaeg et al. 2011). L'introduction de bactéries primo colonisatrices, chez ces animaux, provoque une phase de prolifération suivie d'une phase de différenciation terminée par une phase de maturation de l'épithélium intestinal permettant le déclenchement de mécanismes de défenses innées chez l'hôte et l'établissement d'un écosystème adapté à la colonisation par le microbiote commensal (Tomas, Wrzosek et al. 2013). De nombreuses études ont montré le développement des structures immunitaires par l'introduction d'un microbiote diversifié, chez les animaux axéniques : expansion des

lymphocytes intra épithéliaux (Helgeland, Vaage et al. 1996), apparition et développement de centres germinatifs contenant des cellules productrices d'immunoglobulines dans les follicules et la *lamina propria* (Cebra, Periwal et al. 1998). Le microbiote stimule également l'activité phagocytaire (Nicaise, Gleizes et al. 1993) et oriente le profil cytokinique des lymphocytes T selon la bactérie. *B. fragilis* induit une prolifération des lymphocytes T de type Th1 grâce au polysaccharide A. Chez les animaux axéniques, cette bactérie modifie la balance Th1/Th2 en augmentant la sécrétion de cytokines de type Th1 et en limitant la prolifération des lymphocytes de type Th2 (Mazmanian, Liu et al. 2005). Inversement, les cellules Th17 sont fortement induites par les « *Segmented Filamentous Bacteria* » (SFB) (Ivanov, Atarashi et al. 2009) (Gaboriau-Routhiau, Rakotobe et al. 2009). Ces bactéries, qui sont attachées à la muqueuse, en particulier au niveau de l'iléon distal, sont principalement retrouvées après le sevrage chez la souris.

La localisation, le niveau d'expression des récepteurs de l'immunité innée tel que les TLRs et les molécules permettant leur activation sont régulés à la baisse lors de la colonisation en inhibant la voie NF- κ B, MAPK via des molécules comme IRAK-M, TOLLIP, SIGIRR, A20, Nod2, and PPAR γ de manière à protéger l'hôte de réponses immunitaires excessives (Shibolet and Podolsky 2007). La stratégie de reconnaissance diffère entre les bactéries commensales et pathogènes. Par exemple, le TLR4 reconnaît le LPS. Alors que le LPS des *Bacteroides* ne l'active pas, le LPS des *Enterobacteriaceae* active le TLR4 (Sansonetti and Medzhitov 2009), indiquant son rôle essentiel dans la primocolonisation. Chez l'adulte, ces *Bacteroides* sont majoritaires et les *Entérobactéries* sous dominantes conduisant à une moindre activation du TLR de la muqueuse intestinale et, de fait, ces bactéries sont mieux tolérées (Chassin, Kocur et al. 2010). Le microbiote commensal régule les modifications épigénétiques du gène codant pour le TLR4 pour induire la tolérance (Takatori, Kanno et al. 2009). Les bactéries commensales induisent une tolérance en modulant la voie NF- κ B (Chowdhury, King et al. 2007). Ces bactéries non pathogènes vont préserver la forme inactive du NF- κ B ou l'exporter hors du noyau pour limiter l'expression des gènes impliqués dans la réponse proinflammatoire (Kelly, Campbell et al. 2004). La production des métabolites comme le butyrate modulent la méthylation des histones régulant la transcription de l'ADN (Mischke and Plosch 2013). Certains métabolites comme les acides gras à chaînes courtes, produits par les bactéries, peuvent également jouer dans la régulation de la réponse immunitaire. Le butyrate induit une différenciation des lymphocytes T en Treg. En effet, *in vitro*, le contact d'un surnageant fécal issu de souris sauvage exempt d'organismes pathogènes spécifiques, induit l'expression de FoxP3 dans les cellules CD4⁺ conduisant à une différenciation en Treg (Arpaia, Campbell et al. 2013). Ce résultat se retrouve *in vivo* puisque

les souris ayant reçu du butyrate par la nourriture ont une augmentation des Treg dans le côlon. Cette localisation limitée au côlon dépend de la voie d'entrée du butyrate car son administration dans l'eau de boisson induit une augmentation systémique et non pas local des Treg (Arpaia, Campbell et al. 2013). L'action du butyrate passe par sa capacité à favoriser l'acétylation des histones et donc l'expression de certains gènes, en particulier des gènes cibles de FOXP3 (Furusawa, Obata et al. 2013). Le butyrate possède donc un effet anti-inflammatoire en protégeant les animaux de la colite.

Les bactéries et les produits de leur activité modulent également le taux de renouvellement de l'épithélium, de prolifération et de différenciation cellulaire (Payros, Secher et al. 2014). Ce mécanisme est d'ailleurs décrit comme un moyen de lutte contre les bactéries pathogènes. Normalement contenues au niveau de la lumière intestinale, une rupture de la barrière intestinale peut entraîner un passage anormal des bactéries à travers l'épithélium.

Chapitre II : Développement périnatal de la barrière intestinale

L'épithélium et les fonctions de barrière intestinale se développent durant les premières semaines et/ou mois de vie, permettant la régulation de la réponse immunitaire et la mise en place d'une tolérance vis-à-vis du contenu luminal comme le microbiote intestinal ou les antigènes alimentaires. La naissance est un moment crucial qui permet la colonisation massive de l'individu et plus particulièrement de son tube digestif par les microorganismes de son environnement proche. Cette mise en place du microbiote intestinal associée à des facteurs génétiques et épigénétiques influencent la barrière intestinale et la maturation du système immunitaire associé.

I. Colonisation par le microbiote intestinal

Dès la naissance, l'Homme est exposé à de nombreux microorganismes qui proviennent principalement de la mère et de l'environnement présent lors de l'accouchement. La composition du microbiote varie à deux âges de la vie : un microbiote primo colonisateur, de la naissance au sevrage (ou commencement de la diversification alimentaire) et un microbiote « stable », à l'âge adulte. La maturation du microbiote intestinal est un processus dynamique qui se fait durant les premières années de vie de l'Homme (Palmer, Bik et al. 2007) (Roger, Costabile et al. 2010), qui est aussi une période critique pour la mise en place du système immunitaire. Cette immaturité est cruciale et permet l'établissement de la tolérance vis-à-vis des bactéries commensales et l'interaction symbiotique entre l'hôte et son microbiote. Ce microbiote va alors évoluer pour atteindre un équilibre lui permettant de conserver une certaine stabilité, tout en étant réceptif à l'influence des facteurs environnementaux.

A. Primo-colonisation, processus dynamique

Le microbiote de la mère, d'origine vaginale et fécale, constituerait le premier *inoculum* important de l'enfant né par voie basse. Les mêmes sérotypes d'*E. coli* ont été retrouvés dans la bouche des nouveaux nés et les fèces de la mère (Bettelheim, Teoh-Chan et al. 1974). La diversité bactérienne est faible durant la première semaine de vie et de nombreuses espèces apparaissent et disparaissent durant le premier mois (Favier, Vaughan et al. 2002). De plus en plus de travaux montrent que les individus sont en contact avec de

l'ADN ou des motifs bactériens durant la période de gestation qui pourraient influencer la colonisation (pour revu (Rautava, Luoto et al. 2012)). Toutefois, la colonisation massive de l'intestin se fait durant les premières heures de la vie par les bactéries avec lesquelles le nouveau-né est en contact au moment de la naissance.

Les *Enterobacteriaceae*, les *Enterococcaceae*, les *Streptococcaceae* et les *Staphylococcaceae* sont dites des bactéries primo-colonisatrices car elles sont retrouvées dans les selles après 24h de vie à une concentration de 10^9 Unités Formant Colonies (UFC)/g de fèces. Le pyroséquençage des fèces a montré que les enfants âgés de 4 semaines présentaient une prédominance du phylum *Proteobacteria* (37%) dont la majorité appartenait à la famille des *Enterobacteriaceae* (Fouhy, Ross et al. 2012). Parmi les *Enterobacteriaceae*, les souches d'*Escherichia coli* sont très classiquement observées chez l'enfant à terme, et plus particulièrement chez les enfants nés prématurément (Arboleya, Salazar et al. 2012), les premières bactéries colonisatrices atteignent une densité 100 fois plus forte que chez l'adulte (Hopkins, Macfarlane et al. 2005). Quel que soit le mode d'accouchement, ce taux d'*E. coli* est de 0.5 à 1 log plus élevé que pour les autres entérobactéries ou entérocoques, durant la première année de vie.

Parce que ces bactéries sont aéro-anaérobies facultatives (BAAF), elles peuvent coloniser et se développer en utilisant le dioxygène (O_2) contenu dans le TD, à la naissance. La diminution progressive de la concentration en O_2 va alors permettre le développement de bactéries anaérobies strictes (BAS) au bout d'une à deux semaines de vie (Jost, Lacroix et al. 2012). Après quelques mois, les BAS comprennent majoritairement les genres *Bifidobacterium spp.* (phylum *Actinobacteria*), *Clostridium spp.* (phylum *Firmicutes*) et *Bacteroides spp.* (phylum *Bacteroidetes*) (Scholtens, Oozeer et al. 2012). Ainsi, donc, la proportion d'*Enterococcus faecalis* est importante seulement pendant les 6 premiers mois alors que les *Bacteroides* vont augmenter d'un facteur 100 entre la naissance et le 24^{ème} mois (Hopkins, Macfarlane et al. 2005). La colonisation du TD par *Lactobacillus* est le plus souvent transitoire, durant la première année de vie (Fallani, Young et al. 2010).

Une fois cette période d'instabilité passée, ce primo-microbiote va ensuite se diversifier aux alentours de la 3^{ème} année de vie de l'enfant afin d'aboutir à un microbiote dense, complexe et stable, atteignant ainsi le profil caractéristique du microbiote observé chez l'adulte (Hopkins, Macfarlane et al. 2005) (Palmer, Bik et al. 2007) (Yatsunenko, Rey et al. 2012). Des études de colonisation chez la souris axénique ont permis de « reproduire » le dogme de post-colonisation avec une diversité bactérienne qui croît avec le temps (Gilliland, Erb-Downward et al. 2012).

B. *Escherichia coli* : bactérie primo-colonisatrice

Escherichia coli est une bactérie Gram négative et aérobie-anaérobie facultative qui appartient au phylum des *Proteobacteria*, plus précisément à la famille des *Enterobacteriaceae*. *E. coli* étant une BAAF, elle s'adapte aux conditions de vie dans le TD dès les premiers instants de la vie. Elle utilise les sucres de l'épithélium intestinal et le mucus comme source d'énergie (Herias, Midtvedt et al. 1995) (Chang, Smalley et al. 2004). Comme décrit précédemment, c'est à la naissance que le taux de colonisation est le plus élevé et son implantation diminue avec la diversification du microbiote (Nowrouzian, Hesselmar et al. 2003). Dans une maternité française, 56,5% des nouveaux nés de 3 jours étaient porteurs d'au moins une souche de *E. coli* (Payros, Secher et al. 2014) et fait partie des bactéries commensales retrouvées fréquemment chez les mammifères (90 % des hommes sont porteurs à hauteur de 10^4 à 10^8 CFU/g de fèces (Smati, Clermont et al. 2013) (Tenailon, Skurnik et al. 2010).

Au sein de cette espèce, le génome est extrêmement diversifié (parfois seulement 30% des gènes sont communs entre deux souches) (Welch, Burland et al. 2002) mais l'analyse phylogénétique réalisée à l'échelle de l'espèce, via le développement de multiples méthodes, a permis d'identifier une structuration clonale de *E. coli* caractérisée par de grands groupes phylogénétiques (au moins 6) (Touchon, Hoede et al. 2009)). Les 4 principaux sont les phylogroupes A, B1, B2 et D (Herzer, Inouye et al. 1990). En première intention, une des méthodes la plus simple pour déterminer si un isolat d'*E. coli* appartient à l'un de ces 4 phylogroupes majoritaires est la méthode développée par O. Clermont et ses collaborateurs. Elle repose sur la possibilité ou non de l'amplification simultanée par PCR de trois gènes *chuA*, *yjaA* et *TspE4.C2* (Clermont, Bonacorsi et al. 2000).

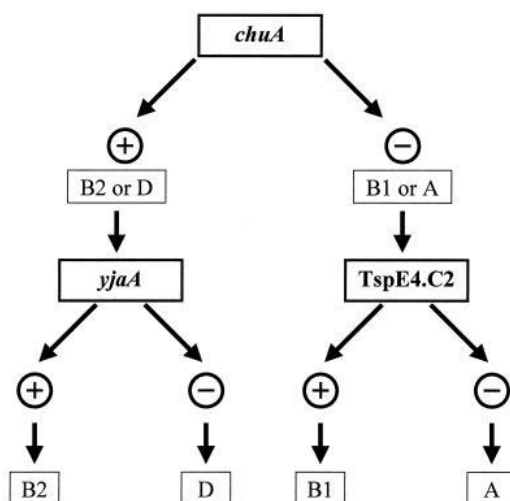


Figure 12 : Détermination du groupe phylogénétique des *E. coli* (Clermont, Bonacorsi et al. 2000)

Au sein des pays urbanisés, les souches d'*E. coli* acquises dès la naissance colonisent durablement le tube digestif mais cette persistance est dépendante du groupe phylogénétique du clone prédominant et du mode d'accouchement (Das, Singh et al. 2013) (Nowrouzian, Wold et al. 2005) (Nowrouzian, Ostblom et al. 2009). Comme chez l'adulte sain, les souches commensales d'origine fécale, retrouvées communément chez l'enfant, appartiennent majoritairement aux phylogroupes A et B1 (Duriez, Clermont et al. 2001) (Tenailon, Skurnik et al. 2010). Les souches du groupe B2 sont très souvent associées à des infections extra-intestinales mais elles colonisent également pacifiquement notre tube digestif (Logue, Doetkott et al. 2012) et particulièrement celui des enfants nés dans les pays les plus urbanisés (de Muinck, Oien et al. 2011) (Payros, Secher et al. 2014). Cette distribution phylogénétique des souches serait directement liée à nos modes de vie et de nos habitudes alimentaires (Duriez, Clermont et al. 2001) (Escobar-Paramo, Grenet et al. 2004) (Skurnik, Bonnet et al. 2008) (Tenailon, Skurnik et al. 2010).

Chez le rat, une telle fluctuation des proportions au sein des groupes phylogénétiques d'*E. coli*, en réponse à la composition de leur régime alimentaire, a d'ailleurs été démontrée (O'Brien and Gordon 2011). Le phylogroupe B1 est le plus communément retrouvé chez le rongeur de laboratoire.

Concernant un éventuel rôle de cette bactérie dans l'homéostasie intestinale, plusieurs études ont apporté des éléments de réponse, et ce, particulièrement, en période périnatale :

- Le contact avec *E. coli* CEC15 permet une maturation de l'épithélium qui module la prolifération des cellules épithéliales, renforce la barrière de mucus et réduit la perméabilité intestinale (Tomas, Reygner et al. 2014). Toutefois, cet effet semble être souche dépendant. En effet, la souche *E. coli* M1/5, de groupe phylogénétique B2, conduit à des dommages à l'ADN chez le raton nouveau-né ainsi qu'à un stress génotoxique à l'âge adulte comme perturbation de la prolifération cellulaire, des ponts anaphasiques ou la fission des cryptes intestinales et une augmentation de la perméabilité intestinale au FITC Dextran 4kDa (Payros, Secher et al. 2014).
- Certaines souches sont également considérées comme probiotiques car elles présentent des effets protecteurs pour l'hôte. La souche *E. coli* Nissle 1917 possède une activité anti-inflammatoire (Olier, Marcq et al. 2012) chez le rat. D'autres *E. coli* ont la capacité de stimuler le système immunitaire et de renforcer la barrière intestinale en rentrant en compétition avec d'autres

bactéries pathogènes (Hudault, Guignot et al. 2001) (Leatham, Banerjee et al. 2009) ou peuvent influencer la maturation des lymphocytes B, dans la première semaine de vie chez l'Homme (Lundell, Bjornsson et al. 2012).

C. Facteurs influençant le microbiote

La composition du microbiote est extrêmement variable d'un enfant à l'autre, comparée à celui décrit à l'âge adulte. Malgré cette variabilité interindividuelle, il existe toutefois un noyau bactérien commun nommé le « *common bacterial core* ».

Le principe de la primo-colonisation repose sur l'idée d'une succession de vagues de colonisation du TD, définies par des facteurs environnementaux : le mode de vie de la mère, le mode d'accouchement, l'alimentation, l'environnement familial et de la vie quotidienne, la prise d'antibiotiques et la génétique. Cela explique la grande variabilité interindividuelle malgré une faible diversité microbienne et la différence entre le microbiote primo-colonisateur et celui de l'adulte : « un Homme = un microbiote ? ». De nombreuses études décrivent la composition du microbiote chez les nouveaux nés prématurés et montrent que ces individus présentent une dysbiose associée à une augmentation des BAAF et un affaiblissement relatif des BAS. La diversité des *phyla* retrouvée chez les enfants nés à terme est largement différente de celle des nouveaux nés prématurés (Wang, Hoenig et al. 2009) et un retard de colonisation par les BAS est également observé (Arboleya, Salazar et al. 2012). Néanmoins, ces différences semblent disparaître avec la croissance de l'individu. Le mode d'accouchement impacte également la nature du primo-microbiote à la naissance. La césarienne, qui est de plus en plus pratiquée dans les pays urbanisés, requiert des conditions d'hygiène qui altèrent la primo-colonisation en comparaison de celle des nouveau-nés par voie basse. Par césarienne, le nouveau-né serait plus en contact avec le microbiote cutané de sa mère. En effet, il ne serait en contact avec le microbiote vaginal et fécal de sa mère que dans le cas d'une rupture de la poche des eaux avant la procédure. L'alimentation du nourrisson change et modifie rapidement la diversité et la proportion de chaque population bactérienne (Walker, Ince et al. 2011). En effet, le lait maternel impacte la colonisation bactérienne du TD. Par exemple, il a été montré que le microbiote des enfants nourris au lait maternel est associé à davantage d'*Actinobacteria* en comparaison de celui d'enfants nourris au lait maternisé pour qui le *phylum Firmicutes* est davantage représenté (Azad, Konya et al. 2013).

II. Développement de la muqueuse intestinale

En raison de la gestation longue, la barrière immunologique à la naissance, chez l'Homme, est bien plus mature que chez le rongeur, que ce soit vis-à-vis de son architecture ou de sa composition cellulaire. Les cryptes et villosités se mettent en place dès 10 – 12 semaines de gestation avec l'apparition de structures spécifiques comme les cellules de Paneth à la fin du premier trimestre, chez l'Homme. La gestation des rongeurs (rat ou souris) ne durent que 21 jours et les cryptes ainsi que les cellules de Paneth ne sont visibles que dix jours après la naissance. Cela met en avant le caractère immature des barrières épithéliale et immunitaire, chez le rongeur, en période néonatale.

A. L'hyperperméabilité intestinale

Comme dit précédemment, l'épithélium intestinal est très perméable en période périnatale et cette hyperperméabilité diminue progressivement durant les premiers mois de vie chez l'Homme, un processus semblable au « *gut closure* » (fermeture de l'intestin) observé chez les rongeurs (Urao, Moy et al. 1995). Cette hyperperméabilité intestinale permet l'absorption de grosses molécules impliquées dans la nutrition et la mise en place de la tolérance par le système immunitaire. Toutefois, une perméabilité intestinale trop élevée prédispose aux passages de molécules potentiellement pathogènes, générant une réponse inflammatoire exacerbée en raison des fonctions immunitaires encore immatures chez le jeune (Insoft, Sanderson et al. 1996). Des facteurs tels que l'âge ou la nutrition de l'enfant influent sur l'état de perméabilité intestinal. Des enfants nés prématurément (avant 37 semaines) ont une perméabilité intestinale plus importante les 4 premiers jours de vie avant de se rétablir, illustrant une adaptation rapide (van Elburg, Fetter et al. 2003).

Ce qu'on appelle donc « *gut closure* », correspond à l'établissement d'une barrière physique mature limitant le passage accru de molécules luminales. Elle se développe durant les premiers jours de vie, pour les humains, et jusqu'au sevrage chez la souris. En effet, la souris présente à la naissance une perméabilité intestinale plus élevée que celle du nouveau-né humain, né à terme. L'analyse de l'évolution de la perméabilité intestinale chez le rongeur permet de mieux comprendre comment évolue le profil des différentes protéines de jonctions serrées comme l'occludine, la JAM ou la ZO1. Seules l'expression et la localisation des protéines de la famille des claudines semblent être modifiées entre la naissance et l'âge adulte (Holmes, Van Itallie et al. 2006). De plus, l'expression de certaines claudines (les 3, 4, 7, 12 et 15) va augmenter au cours du développement alors que d'autres (les 1, 2 et 18) vont diminuer. Les plus fortes modifications sont visibles entre le 14^{ème} et le 21^{ème} jour, période de

sevrage chez le rongeur. Un suivi de la perméabilité intestinale au FITC-Dextran 4 kDa en période périnatale montre que la perméabilité est stable durant les deux premières semaines de vie puis chute brutalement et évolue vers une diminution progressive, à partir de la 4^{ème} semaine de vie et jusqu'à l'âge adulte (Patel, Myers et al. 2012).

B. Interaction entre le microbiote et l'épithélium intestinal

Malgré, une diminution de la sensibilité des cellules épithéliales via la stimulation des TLRs, chez les souris, beaucoup de voies de signalisation de la réponse immunitaire innée sont fonctionnelles. En effet, les infections par le rotavirus de l'intestin chez la souris en période néonatale passe par « *l'helicase retinoic acid* » induit par le gène I (RIG-I) et « *Melanoma Differentiation* » associé au gène 5 (MDA5) (Bates and Whittington 2007) (Broquet, Hirata et al. 2011). Lors de la colonisation, au contact des bactéries commensales, l'épithélium intestinal du nouveau-né doit ajuster sa sensibilité vis-à-vis du microbiote et adapter sa réponse au premier contact des bactéries pathogènes ou des virus.

Que ce soit chez l'Homme ou la souris, la formation des structures lymphoïdes secondaires, comme les plaques de Peyer ou les nœuds mésentériques, se fait pendant la gestation mais leurs tailles et leurs développements dépendent de la colonisation par le microbiote commensal, après la naissance (Weitkamp, Rudzinski et al. 2009) (van de Pavert and Mebius 2010). En parallèle de la colonisation par le microbiote commensal, le homing des lymphocytes au niveau de la muqueuse intestinale semble suivre une régulation postnatale par des signaux à la fois endogènes et exogènes. Les cellules innées, comme les lymphocytes inductibles ou les « *Natural Killer* », migrent pendant les 4 premières semaines de vie depuis le foie jusqu'à la muqueuse intestinale, induisant des signaux endogènes (Sawa, Cherrier et al. 2010). Au contraire, le recrutement des Treg dans la muqueuse intestinale et la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL10 permet le processus de colonisation, limitant le développement d'une réponse proinflammatoire qui pourrait être délétère pour la barrière intestinale (Round, Lee et al. 2011). Il semble exister une période propice pour l'induction de la tolérance immunologique au niveau de l'intestin et des structures associées, en particulier durant la période périnatale. La mise en place et le processus de maturation et de tolérance dépend d'une communication étroite entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs, grâce aux cellules présentatrices d'antigènes (Brandtzaeg 2010).

C. Evolution de la réponse immunitaire innée

1. Modulation de l'activité antimicrobienne

L'épithélium intestinal est caractérisé par un renouvellement et une prolifération importante des cellules épithéliales. Une augmentation du renouvellement cellulaire et la reprogrammation transcriptionnelle des entérocytes conduit à l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme, transport des nutriments et de la différenciation cellulaire (Harper and Sigman 2011) (figure 13). Le spectre entérique des peptides antimicrobiens change de manière significative durant la période néonatale chez la souris. Durant les deux premières semaines de vie, l'épithélium intestinal exprime la « *Cathelicidin-Related-Antimicrobial-Peptides* » (CRAMP) (Menard, Forster et al. 2008). L'expression de CRAMP diminue jusqu'au sevrage, au profit de l'apparition des cellules de Paneth. Cette diminution est indépendante du microbiote et CRAMP n'est plus exprimé par les entérocytes, après le sevrage (Gallo, Kim et al. 1997) (figure 13) au niveau du grêle mais est toujours exprimé par les colonocytes à l'âge adulte. CRAMP n'est pas impliqué dans la prolifération cellulaire mais plus dans l'immunité intestinale, en période néonatale car les souriceaux CRAMP^{-/-} sont plus sensibles à l'infection par *Listeria monocytogenes*.

La différenciation des cellules de Paneth passe par le gène *Sox9* et le facteur de transcription Math1. En effet, l'inactivation de *Sox9* conduit à la formation de cryptes aberrantes dans lesquelles le nombre de cellules à mucus est réduit et les cellules de Paneth et les cellules lgr5⁺ sont remplacées par des cellules prolifératrices (Bastide, Darido et al. 2007). De plus, la perte du facteur de transcription Math1 conduit à la perte des cellules de Paneth et des cellules à mucus (Durand, Donahue et al. 2012). La maturation terminale de ces cellules est assurée par la voie Wnt/ β caténine-TCF (van Es, Jay et al. 2005). Les cellules de Paneth vont alors produire des signaux comme Wnt, Nocht et EGF pour les cellules souches proches (Sato, van Es et al. 2011). Alors que l'apparition et la maturation des cellules de Paneth ne dépend pas de la colonisation par le microbiote commensal (Putsep, Axelsson et al. 2000), le microbiote intestinal induit leur dégranulation (Satoh, Huh et al. 1988), celle-ci prouvant être bloquée par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs muscariniques. De plus, l'expression d'autres peptides antimicrobiens produits par les entérocytes, comme REG3 γ , nécessite la colonisation bactérienne de l'intestin, entretenue par la présence d'IL22 dans les lymphocytes ROR γ ⁺ NKp46⁺ (Sanos, Bui et al. 2009). Les lectines de type C, Reg3 γ et Reg3 β sont faiblement exprimées dans les premiers jours de vie (Muniz, Knosp et al. 2012). L'augmentation importante de Reg3 γ fait de ce peptide antimicrobien un élément important du mucus à l'âge adulte.

L'expression des α défensines et de MMP7 augmentent avec l'apparition des cellules de Paneth (Menard, Forster et al. 2008). Chez le souriceau, l'augmentation de la défensine 5 est rapide et accompagne le développement des cellules de Paneth alors que l'augmentation des défensines 1, 3 et 6 est graduelle (Inoue, Tsuruta et al. 2008) (Ouellette, Greco et al. 1989).

L'évolution de la composition en peptides antimicrobiens et de l'activité antimicrobienne entérique durant cette période est aussi visible chez l'Homme (Kai-Larsen, Bergsson et al. 2007). La faible expression des α défensines serait une explication à la sensibilité des nouveaux nés aux infections intestinales. Une diminution de leur expression est associée à une augmentation de la sensibilité aux diarrhées d'origine infectieuses chez l'Homme (Kelly, Bajaj-Elliott et al. 2006).

2. Les récepteurs de l'immunité innée

Durant cette période, l'épaisseur de la couche de mucus est plus fine que celle à l'âge adulte. Les bactéries colonisant l'épithélium sont en contact direct avec les cellules épithéliales. L'exposition des nouveaux nés aux LPS des bactéries Gram négatives, dans les premiers instants de la vie induit une activation de la transcription au niveau de l'intestin grêle. L'augmentation de l'expression de micro-ARN-146a (miR-146a) dans les cellules épithéliales conduit à l'expression de la molécule de signalisation des TLRs, l'IL1-Receptor Associated-Kinase 1 (IRAK1). Associée avec sa molécule de dégradation TRAF6, IRAK1 contribue à la tolérance vis-à-vis de la primo-colonisation en inhibant la voie de signalisation du TLR4 (Lotz, Gutle et al. 2006). Une régulation négative de TLR4 au niveau de l'épithélium intestinal permet également l'établissement d'une tolérance vis-à-vis des bactéries colonisatrices. L'expression de TLR4 est très élevée à la fin de la gestation de la souris pour diminuer après la naissance (Gribar, Sodhi et al. 2009) alors que l'expression épithéliale du facteur de transcription inhibiteur $I\kappa B\alpha$ augmente (Claud, Lu et al. 2004). Cette combinaison permet d'augmenter le seuil d'activation du système immunitaire au niveau de l'épithélium intestinal. La diminution de l'expression de la protéine IRAK1 en période périnatale, chez la souris, nécessite une signalisation continue des TLRs. Cela permet de prolonger l'effet du miR-146a induisant l'expression de gènes essentiels à la maturation cellulaire et à l'absorption des nutriments (Chassin, Kocur et al. 2010). Cette immunité innée par les cellules épithéliales est très importante pour la mise en place de la tolérance par diminution ou inhibition d'une réponse proinflammatoire induite par la molécule transforming growth factor β (TGF β)-activated kinase 1 (TAK1), qui induit une inflammation précoce et une mortalité importante en période périnatale chez la souris (Kajino-Sakamoto, Inagaki et al.

2008). Bien qu'une stimulation inappropriée du système immunitaire innée par le microbiote doive être prévenue, une activation maîtrisée permet l'absorption des nutriments, la différenciation cellulaire et la fortification de la barrière intestinale (Hooper and Gordon 2001).

D. Mise en place de la réponse adaptative

1. Les cellules T régulatrices (Treg)

Les cellules Treg aux propriétés anti-inflammatoires sont abondantes dans les ganglions mésentériques du fœtus humain et leur homing jusqu'à la muqueuse intestinale est particulièrement actif durant l'enfance. Les cellules dendritiques CD103⁺ transportent l'antigène depuis l'intestin jusqu'aux nœuds mésentériques où ils vont induire les Treg, particulièrement en présence de TGFβ et d'acide rétinoïque. De plus, la libération d'IL10 par des macrophages permet la prolifération des Treg localisés dans la *lamina propria* (Hadis, Wahl et al. 2011). Enfin, une diminution de l'intégrité de la barrière, transitoire ou continue, dépendante des protéines de jonctions serrées, conduit à une réponse anti inflammatoire par l'induction de Treg dans l'intestin (Boirivant, Amendola et al. 2008). L'hyperperméabilité intestinale périnatale pourrait favoriser le développement des Treg, qui produiront du TGFβ et induiront la tolérance aux antigènes issus de la lumière.

Bifidobacterium infantis, une bactérie prédominante dans le microbiote commensal chez l'Homme montre, chez la souris, une induction des Treg FoxP3⁺ (O'Mahony, Scully et al. 2008). D'ailleurs, les cellules T CD4⁺ de souris nouveaux nés s'orientent préférentiellement en Treg après la stimulation par le TGFβ et l'acide rétinoïque mais également une inhibition de l'IL4, cytokine pro inflammatoire (Wang, Huizinga et al. 2009). Par la suite, les *Clostridium* cluster IV et XIVa peuvent prendre le rôle de *B. infantis* dans la promotion des Treg au niveau du côlon (Atarashi, Tanoue et al. 2011).

2. Le profil pro Th2

La période néonatale est caractérisée par une réponse spécifique des lymphocytes T orientée vers une réponse de type Th2, caractérisée par une importante production d'IL4, IL5 et IL13 (Adkins 2013). Cette réponse reste toutefois inefficace dans le cas d'une infection nécessitant une réponse de type Th1. Ce biais serait probablement dû à une régulation épigénétique de l'expression des facteurs de type Th1 et Th2. Une diminution de la méthylation au niveau des régions régulatrices des cytokines Th2 dans les lymphocytes T CD4⁺ permet une importante production d'IL4 et d'IL13 (Rose, Lichtenheld et al. 2007) (Yoshimoto, Yoder et al. 2013). Ceci est associé à une hyperméthylation des locus codant

pour les facteurs de type Th1 dans les cellules CD4⁺ de nouveaux-nés, conduisant à une faible production d'IFN γ (White, Hollams et al. 2006) (White, Watt et al. 2002).

3. La réponse humorale locale

Les plasmocytes à IgA ne sont généralement pas détectés dans la *lamina propria* avant l'âge de 10 jours, chez la souris (Brandtzaeg 2010). Généralement, le lait maternel riche en IgA comble ce manque et renforce la barrière intestinale. Les nouveaux nés qui ne sont pas allaités ont au contraire une diminution de la fonction de barrière intestinale. Le nombre de cellules intestinales productrices d'IgA se normalise environ 4 semaines après la colonisation de souris axéniques par des bactéries commensales, indiquant que ce processus est progressif et nécessite la présence du microbiote (Crabbe, Nash et al. 1970). De plus, il semble que la réponse IgA soit en adaptation perpétuelle évoluant avec le microbiote commensal, d'autant plus en période périnatale. Comme la modulation par les Treg, l'établissement de l'immunité médiée par les IgA dépend de l'environnement local, la présence de TFG β favorisant leur développement.

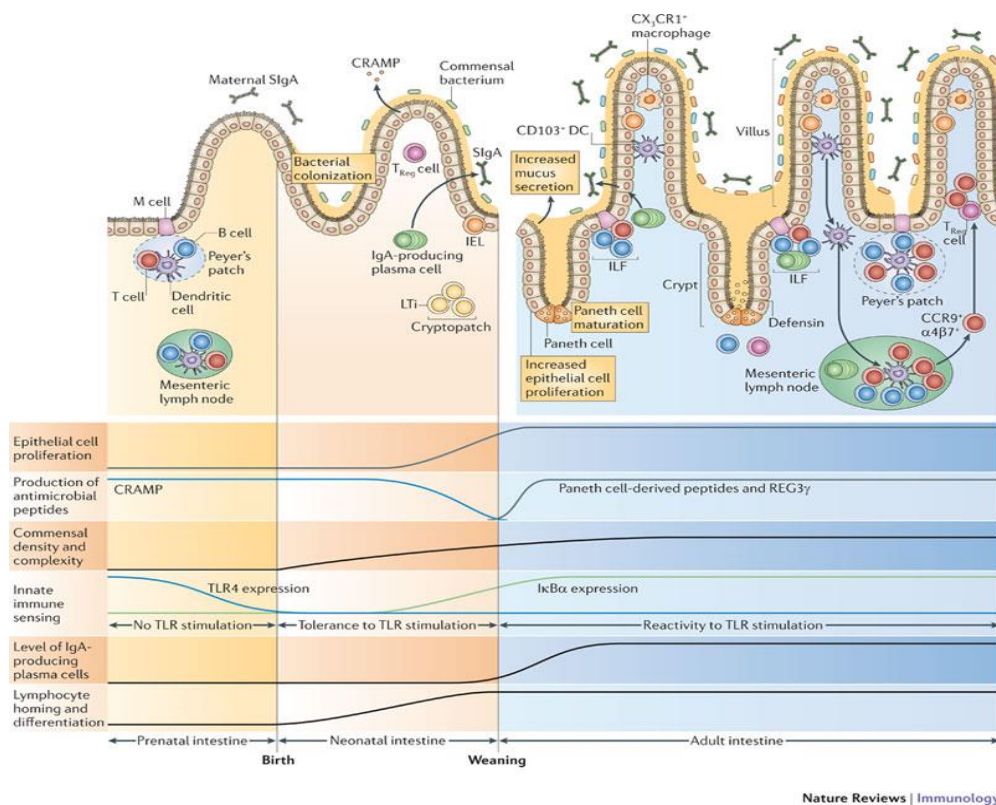


Figure 13 : Evolution de la réponse immunitaire innée et adaptative du nouveau-né jusqu'à l'âge adulte (Renz, Brandtzaeg et al. 2011)

Immature à la naissance, la barrière intestinale va évoluer avec la colonisation et la mise en place du microbiote commensal. Des structures spécifiques comme les cellules de Paneth apparaissent. Les réponses humorales et cellulaires vont s'établir au contact du microbiote commensal. Cette reconnaissance permet l'établissement du microbiote de l'individu adulte. Tous ces éléments contribuent à la mise en place de l'homéostasie intestinale.

Chapitre III : Stress et altération de la barrière intestinale

I. Le stress et son effet sur la barrière intestinale

A. Le stress

1. Définition et contexte

La barrière intestinale est en contact constant avec des éléments extérieurs contenus dans la lumière intestinale. Cette interface évolue et est sensible à de nombreux facteurs environnementaux, qu'ils soient physiques, chimiques ou même psychologiques. En effet, des éléments comme le stress ou l'anxiété sont de plus en plus souvent mis en cause dans le déclenchement et/ou l'entretien de troubles gastro-intestinaux.

Le stress se définit comme étant une menace, aiguë ou chronique, vis-à-vis de l'homéostasie de l'individu. Il induit une réponse adaptative de l'organisme, nécessaire pour la stabilité de l'individu, afin d'assurer sa survie. Toutefois, s'il existe une rupture entre la capacité d'adaptation et les éléments extérieurs qui influent sur l'individu, il s'en suit une réaction pathologique qui peut aboutir au développement de troubles fonctionnels ou organiques.

Plusieurs modèles d'étude de l'effet du stress sur la physiologie de l'hôte existent chez le rongeur qui varient selon la durée, le type de stress appliqué, aigu ou chronique. Le stress peut être appliqué à différents âges de la vie. L'utilisation des modèles animaux permet de mieux appréhender et analyser les conséquences du stress sur de nombreux paramètres physiologiques, comme sur l'homéostasie intestinale.

2. L'axe HPA

L'axe hypothalamohypophysaire (HPA) est constitué de l'hypothalamus, de l'hypophyse ou glande pituitaire et des glandes surrénales. Il compose le système neuroendocrinien qui contrôle les réactions au stress et régule de nombreuses fonctions physiologiques comme la digestion, l'immunité mais aussi les émotions. Son rôle est l'adaptation aux changements environnementaux subis par l'organisme. En réponse à un stress, l'axe HPA s'active induisant la sécrétion d'hormones spécifiques. Les neurones à « *Corticotropin Releasing Factor* » (CRF) localisés au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus stimulent la sécrétion d'« *AdrenoCorticoTropin Hormone* » (ACTH) par l'hypophyse. L'ACTH, libérée dans la circulation sanguine provoque la synthèse de glucocorticoïdes par les glandes surrénales, induisant un rétrocontrôle négatif sur la synthèse

des hormones de même axe. Le cortisol est le corticostéroïde chez l'Homme qui correspond à la corticostérone chez le rongeur. Le taux circulant de corticostérone dépend du cycle circadien avec une augmentation au début des phases d'activité (phase nocturne chez le rongeur) (Fonken and Nelson 2014) (figure 14).

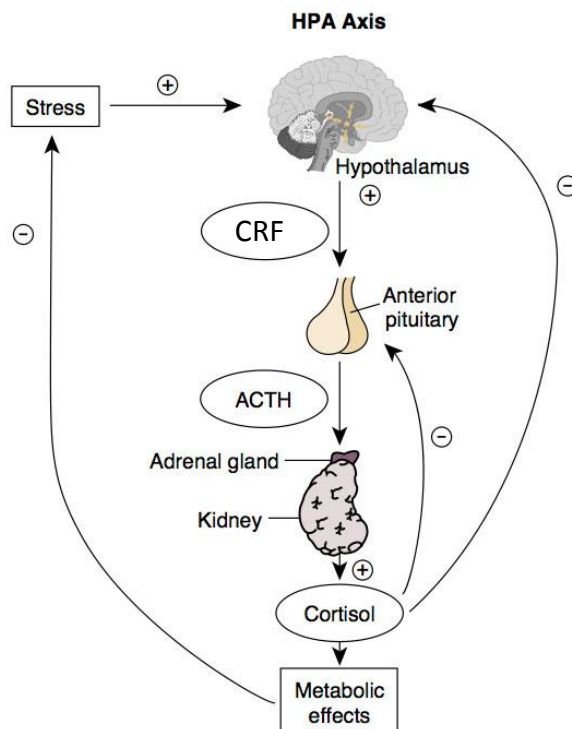


Figure 14 : Organisation schématique de l'axe HPA (Hiller-Sturmhofel and Bartke 1998)

CRF: Corticotropin Releasing Factor, ACTH: AdrenoCorticoTropin Hormone

Le principal neuromédiateur du stress est le CRF que l'on retrouve au niveau du SNC et dans le tube digestif (Tache and Bonaz 2007). Son action passe par deux récepteurs de la famille des protéines à sept domaines transmembranaires couplées à une protéine G : CRF1 et CRF2. Le récepteur CRF1 est prépondérant au niveau central alors que la forme CRF2 est prépondérante en périphérie. Le stress en induisant la production de CRF va altérer la motricité gastro-intestinale en ralentissant la vidange gastrique via le CRF2 ainsi que le transit dans le grêle et la sécrétion de CRF colique via le CRF1 que ce soit au niveau central ou périphérique.

Toutefois, l'activation inadéquate ou excessive de cet axe HPA peut conduire au développement de symptômes en lien avec des pathologies (McEwen and Stellar 1993). En effet, l'augmentation de glucocorticoïdes induite par le stress ne protège plus contre ce dernier mais altèrent les mécanismes de préservation de l'organisme vis-à-vis du stress. Ces troubles fonctionnels au niveau intestinal sont le plus souvent en lien avec une modification de la

sensibilité viscérale, de la perméabilité intestinale ou sur la réponse immunitaire conduisant à une inflammation.

B. La sensibilité viscérale et l'hyperperméabilité intestinale, deux marqueurs du stress sur la barrière intestinale

1. La sensibilité viscérale

De nombreuses études réalisées chez l'animal ont montré qu'un stress aigu ou chronique augmentait la sensibilité viscérale (Ait-Belgnaoui, Bradesi et al. 2005) (Gue, Del Rio-Lacheze et al. 1997) impliquant des mécanismes à la fois périphériques et centraux (Larauche, Kiank et al. 2009). En effet, la perception du stress induit la production de neuromédiateurs au niveau du système nerveux central et de l'intestin (Tache and Bonaz 2007). Le CRF produit au niveau central est responsable des troubles moteurs et de la sensibilité viscérale (Tache and Perdue 2004). L'augmentation de la sensibilité viscérale fait également intervenir les mastocytes du côlon, où leur nombre, leur proximité avec les fibres nerveuses et leur degré de granulation sont corrélés avec l'intensité des symptômes (Castagliuolo, Lamont et al. 1996). Il a aussi été montré que l'activation des récepteurs NK1, induisait la dégranulation mastocytaire et la libération d'histamine, de cytokines ou de NGF par les mastocytes, conduisant à une activation des terminaisons des neurones afférents (Bradesi, Eutamene et al. 2002). D'ailleurs, l'administration de doxantrazole, un stabilisateur des mastocytes, bloque l'effet délétère du CRF sur la sensibilité viscérale (Barreau, Cartier et al. 2007).

2. L'hyperperméabilité intestinale

Lors d'un stress, la perméabilité intestinale est augmentée, laissant pénétrer dans la muqueuse intestinale des molécules qui ne le devraient pas, altérant ainsi l'homéostasie intestinale. Sans qu'il n'y ait de modifications structurelles visibles au microscope, le passage paracellulaire de molécules comme le chrome EDTA (Saunders, Kosecka et al. 1994) ou le passage transcellulaire de la HRP (Kiliaan, Saunders et al. 1998) sont facilités chez des rats dans le cas d'un stress aigu de contrainte. Un stress aigu ou chronique chez le rat induit également une diminution de la résistance électrique de l'épithélium, une augmentation des échanges ioniques ainsi qu'une translocation bactérienne (Velin, Ericson et al. 2004) (Santos, Benjamin et al. 2000). Le stress d'évitement de l'eau ou « WAS » (*Water Avoidance Stress* en anglais) provoque un état d'anxiété prolongé chez le rongeur reproduisant les effets d'un stress psychologique chronique à l'âge adulte. Les animaux ayant subi ce stress présentent une augmentation significative de la perméabilité intestinale aux ions, au peptide bactérien FMLP et à la HRP (Santos, Saunders et al. 1999). Un stress acoustique répété chez la souris

induit également une hyperperméabilité de la voie paracellulaire impliquant les lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IFN γ et une translocation bactérienne (Ferrier, Mazelin et al. 2003).

L'étude de ces différents modèles a permis d'identifier des mécanismes responsables de l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le stress. Le CRF et les glucocorticoïdes sont impliqués dans le développement des maladies intestinales inflammatoires mais aussi du stress (Saunders, Santos et al. 2002). En effet, l'administration de CRF mime l'augmentation de perméabilité intestinale induite par le stress, en activant les mastocytes (Santos, Saunders et al. 1999) (Wallon and Soderholm 2009) alors qu'un blocage pharmacologique des récepteurs aux glucocorticoïdes par le RU486 bloque ces altérations de perméabilité (Meddings and Swain 2000). Inversement, l'administration de corticostérone en systémique reproduisait l'augmentation de la perméabilité intestinale par un effet essentiellement médié par les récepteurs aux glucocorticoïdes exprimés dans l'épithélium du côlon (Zheng, Wu et al.). Enfin, l'augmentation de perméabilité paracellulaire colique induirait un passage accru d'agents luminaux au travers de la barrière épithéliale, susceptibles d'activer le système immunitaire de la muqueuse et conduirait à l'activation des terminaisons nerveuses sensibles responsable d'une hypersensibilité viscérale (Ait-Belgnaoui, Bradesi et al. 2005).

L'altération de la sensibilité viscérale et de la perméabilité intestinale sont des dénominateurs communs à de nombreuses pathologies intestinales inflammatoires ou liées au stress. De plus, le rôle du stress est fortement suspecté dans le déclenchement et/ou l'entretien de ces pathologies inflammatoires chroniques.

C. Effets immunomodulateurs du stress

De nombreuses études ont montré un lien entre stress et immunité. Les effets immunosuppresseurs du système nerveux central sont médiés par de nombreux signaux bidirectionnels. Les lymphocytes, monocytes ou macrophages possèdent des récepteurs aux molécules neuroendocrines comme le cortisol (ou corticostérone chez la souris) ou les catécholamines, capables de modifier la prolifération, la sécrétion de cytokines ou la production d'anticorps. Par exemple, la stimulation *in vitro* de leucocytes du sang par des catécholamines conduit à une diminution de l'IL12 et à une augmentation de l'IL10 (Elenkov, Papanicolaou et al. 1996). Cette modification de l'environnement cytokinique peut conduire à un switch des T CD4⁺ de type Th1 vers un profil de type Th2 (Glaser, MacCallum et al. 2001) (Calcagni and Elenkov 2006).

Les effets du stress sur le système immunitaire dépendent de sa durée, de son intensité et du moment où il est subit. Un stress chronique conduit à une augmentation des niveaux de corticostérone circulant dans le sang conduisant à une immunosuppression (Straub, Dhabhar et al. 2005) comme une diminution des lymphocytes T CD8⁺ ou des macrophages dans le plasma (Gilbert, Allan et al. 2002) (Fortes, Farchi et al. 2003). Les étudiants en médecine présentent une diminution des lymphocytes T totaux et du ration T helper / T suppresseur 6 mois après avoir commencé leur formation (Kiecolt-Glaser, Glaser et al. 1986). L'effet du stress est d'autant plus effectif que la mise en place de technique de relaxation permet augmenter le pourcentage de T helper. Le stress aigu induit, au contraire, une stimulation du système nerveux sympathique, induisant une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires. Une stimulation par le LPS des cellules immunitaires contenues dans le plasma d'étudiants en médecine conduit à une sécrétion plus importante de TNF α , d'IL6 et d'IFN γ comparée à une stimulation de cellules immunitaires récupérées plusieurs semaines après la période stressante des examens (Maes, Song et al. 1998). L'apport de corticostérone exogène n'a aucun effet sur l'expansion des lymphocytes T cytotoxiques. Toutefois, combinée à un stress de contrainte chez la souris, la corticostérone limite leur expansion, mettant en avant au moins deux voies de régulation, l'une étant cortico-dépendante, et l'autre cortico-indépendante (Bonneau, Sheridan et al. 1993). Les gens qui présentent un comportement dépressif ou qui sont dans des relations de couples difficiles présentent une augmentation de l'IL6, cytokine pro inflammatoire, dans le plasma (Kiecolt-Glaser, Loving et al. 2005) (Glaser, Robles et al. 2003).

Il existe différents types de modèles animaux, induisant un stress aigu ou chronique. Le stress expérimental contribue à l'initiation et/ou à la réactivation de l'inflammation gastro-intestinale dans des modèles de colites induites au TNBS chez le rat (Gue, Del Rio-Lacheze et al. 1997), confirmé par une augmentation de l'activité de la myélopéroxydase (Collins, McHugh et al. 1996). Le stress de contrainte réactive la colite chez les souris soumises au TNBS 8 semaines plutôt (Qiu, Vallance et al. 1999), suggérant une susceptibilité de ces animaux plus importante au stress après un épisode inflammatoire. Cet effet mettrait en jeu les lymphocytes T CD4⁺ de la rate et des ganglions mésentériques, indiquant combien le stress est un élément important dans l'établissement mais également dans l'entretien de pathologies gastro-intestinales comme le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) ou les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

II. Les pathologies intestinales associées au stress

Il existe différents types de pathologies intestinales qui impliquent une altération de la barrière intestinale comme les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), troubles organiques et fortement inflammatoires, ou bien le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII), trouble fonctionnel associé à une inflammation de bas grade.

A. Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Les MICI sont des maladies multifactorielles impliquant des facteurs génétiques et environnementaux et caractérisées par une inflammation chronique importante conduisant à des lésions fonctionnelles ou structurelles irréversibles. Les MICI regroupent 2 grandes pathologies que sont : la Maladie de Crohn (MC) et la Recto-Colite Hémorragique (RCH). Les MICI apparaissent avant l'âge de 20 ans dans 1 cas sur 4, leur incidence n'a de cesse d'augmenter en Europe depuis ces dernières années (Ruemmele 2010) et sont caractérisées par un affaiblissement de la barrière intestinale associé à une rupture de tolérance vis-à-vis du contenu luminal et particulièrement des antigènes bactériens (Frehn, Jansen et al. 2014).

1. Description

Les MICI sont des maladies qui alternent entre des périodes de poussées inflammatoires et des périodes de rémission. Une sensibilité viscérale, une augmentation de la perméabilité intestinale, des diarrhées et des saignements caractérisent les phases d'inflammation. Le diagnostic repose sur l'historique des patients, des critères histologiques et endoscopiques et des marqueurs sérologiques. Dans la MC, les lésions caractérisées par une inflammation transmurale et la présence de granulomes touchent principalement l'iléon ou le côlon, à la différence de la RCH localisée dans la muqueuse du côlon et du rectum. L'usage de la chirurgie est parfois nécessaire et aucun traitement curatif satisfaisant des MICI n'existe à l'heure actuelle. Une diminution de 50% de la diversité du microbiote commensal a été observée chez ces patients atteints de MICI (Frank, St Amand et al. 2007). L'utilisation d'antibiotiques ou de probiotiques semblent avoir des effets positifs et mènent à des phases de rémission mais cela ne semble que transitoire. Cela met en évidence le rôle important du microbiote dans la physiopathologie des MICI (Kerman and Deshpande 2014).

La réponse immunitaire est sous le contrôle de l'équilibre entre les réponses Th1 et Th2 (Romagnani 1997). La libération d'IFN γ produit par les lymphocytes de type Th1 diminue l'expression des lymphocytes de type Th2 et la production de cytokines qui contrôlent la réponse humorale. La sécrétion d'IL10 ou d'IL4 par les lymphocytes de type Th2 inhibe l'expansion des lymphocytes de type Th2. Le déséquilibre de cette balance altère

la réponse immunitaire protectrice (Kidd 2003). La production élevée d'IFN γ par les lymphocytes de type Th1 caractérise la MC (Bamias, Martin et al. 2003), alors que dans la RCH, une infiltration par des lymphocytes de type Th2, produisant de l'IL13 ou de l'IL4, a été démontrée (Targan and Karp 2005).

Les MICI sont associées à de nombreux facteurs environnementaux et génétiques impactant directement la réponse inflammatoire. Le risque de développer une MICI est 8 à 10 plus élevé chez les proches parents de patients. L'étude du génome a permis de mettre en évidence les allèles associés aux MICI et un polymorphisme des gènes associés à la réponse immunitaire comme la mutation du récepteur de l'IL10 ou du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Shiotani, Kusunoki et al. 2013). De plus, une inflammation du côlon ont été observés chez des enfants présentant une mutation du récepteur à l'IL10 (Shim, Hwang et al. 2010). L'IL10 est impliqué dans le contrôle de l'inflammation intestinale. En effet, des mutations au niveau du gène de l'IL10 ou de son récepteur sont incriminées dans certaines pathologies intestinales.

2. La Maladie de Crohn

Forme la plus fréquence des MICI, la Maladie de Crohn (MC) est caractérisée par une altération de la barrière intestinale associée à une rupture de tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal. De plus, sans savoir si c'est une cause ou une conséquence de la pathologie, une dysbiose est observée chez les patients souffrant de MC.. Elle serait le résultat d'une stimulation antigénique continue par des bactéries commensales comme la flagéline ou *Saccharomyces cerevisiae*, conduisant à une activation immunitaire chez les personnes prédisposés (Adams, Heazlewood et al. 2008) (Sekirov, Russell et al. 2010). La sensibilité viscérale ainsi que l'augmentation de la perméabilité intestinale sont des composantes caractéristiques de la pathologie durant les phases de crise et sont des marqueurs de rechute (Wyatt, Vogelsang et al. 1993). La perméabilité intestinale reste d'ailleurs augmentée pendant les phases de rémission chez ces patients atteints de MC par rapport aux patients témoins, en raison d'une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées.

Un polymorphisme du gène NOD2 est positivement corrélé avec le développement de la maladie (Jostins, Ripke et al. 2012) et serait le précurseur du défaut des cellules de Paneth, mis en évidence chez les patients HD5 déficients ou des souris NOD2 déficientes (Wehkamp, Harder et al. 2004) (Cooney, Baker et al. 2010) (Kobayashi, Chamillard et al. 2005). Néanmoins, cette hypothèse maintenant discutée. En effet, dans cette étude, les animaux étaient hébergés dans des conditions d'élevage « pathogen free » et le microbiote des animaux sauvages servant de témoins était différent de celui des animaux NOD2 déficients. Une étude

plus récente indique que des souris Nod2 -/- hébergées avec des souris de type sauvage (témoins) ne présentent aucune différence dans le développement des cellules de Paneth (Shanahan, Carroll et al. 2014). Le lien entre Nod2 et déficience des cellules de Paneth reste donc à découvrir et serait dépend du microbiote commensal. De plus, un polymorphisme sur des gènes comme XBP1 ou ATG16L1 liés respectivement à l'immunité et l'autophagie a été observé dans la MC. Ces gènes sont important dans la morphologie ainsi que la fonction sécrétrice des cellules de Paneth et des cellules caliciformes (Kaser, Lee et al. 2008) (Cadwell, Liu et al. 2008) pouvant conduire à une iléite due à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 β conduisant à l'autophagie dans ces cellules, conduisant à une diminution de l'activité antimicrobienne chez ces individus (Lassen, Kuballa et al. 2014). De plus, un stress du réticulum endoplasmique des cellules de Paneth est associé avec l'augmentation d'*E. coli* invasives adhérentes (Deuring, de Haar et al. 2012). La dysbiose observée pourrait également être une conséquence directe des altérations de l'activité antimicrobienne, en particulier des cellules de Paneth. En effet, des souris MMP7 -/- déficientes produisent une forme inactive d' α défensine et, donc, ont un défaut d'activité antimicrobienne induisant une modification du microbiote commensal (Salzman, Hung et al. 2010). Enfin, une diminution des IgA sécrétoires est décrite au niveau intestinal, en faveur d'une augmentation des IgG (Lodes, Cong et al. 2004) (Landers, Cohavy et al. 2002)

Une telle modification du microbiote commensal a largement été décrite dans la MC. En effet, les patients présentent une diminution de la diversité de leur microbiote commensal, en particulier une diminution des *Firmicutes* (Joossens, Huys et al. 2011) (Perminow, Beisner et al. 2010) et la présence de souches non commensales a été mise en évidence. En effet, des *E. coli* invasives adhérentes ont été décrites dans la MC et seraient un facteur microbiologique important dans la physiopathologie (Martinez-Medina, Aldeguer et al. 2009). Leur présence serait plus faible en période de rémission et l'augmentation de la population serait un marqueur de rechute (Darfeuille-Michaud, Neut et al. 1998) (Lopez-Siles, Martinez-Medina et al. 2014). Des études réalisées par FISH (Fluorescen in situ hybridation) montrent une augmentation du nombre de bactéries au niveau du mucus (Moussata, Goetz et al. 2014) avec une relative abondance en faveur des Entérobactéries mais également une translocation dans les ganglions mésentériques et la *lamina propria*, durant la phase de crise (O'Brien, Pavli et al. 2014) (Mylonaki, Rayment et al. 2005). Ces *E. coli* appartiennent aux groupes phylogénétiques B2 ou D (Kotlowski, Bernstein et al. 2007) durant la phase de crise alors qu'une distribution identique à celles des patients témoins est observé durant la phase de rémission (Sepehri, Kotlowski et al. 2009) (Schippa, Conte et al. 2009). Le développement de

ces souches de types B2 et D conduit à une augmentation de la colonisation par *E. coli* qui participe à la persistance des symptômes, chez les patients.

Le défaut de la barrière intestinale (hyperperméabilité intestinale, défaut des cellules de Paneth et de la production d'IgA) conduit à une rupture de tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal mais pas des antigènes alimentaires (Frehne plosone 2014). Cette rupture de tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal se manifeste par la présence au niveau systémique (sang) d'une réponse humorale et cellulaire dirigée contre le microbiote intestinal (Adams, Am J GAstrol. 2008). Un défaut des lymphocytes T régulateurs et une augmentation de la réponse inflammatoire Th1 a été décrite au niveau systémique (Chamouard, Monneaux et al. 2009) (Chao, Zhang et al. 2014). Le stress est un facteur environnemental de plus en plus incriminé dans le développement et/ou l'entretien des MICI (Mawdsley and Rampton 2005) et en particulier de la MC (Ringel and Drossman 2001). Il est important de souligner que les évènements stressants survenant pendant la petite enfance ou l'enfance comparée à l'âge adulte sont plus souvent associés au développement de la MC (Wegman and Stetler 2009). La fréquence de développement de la MC est plus élevée chez les enfants ayant subis la perte d'un parent ou des abus sexuels (Jakobsen, Paerregaard et al. 2013). Cette observation est particulièrement intéressante car elle souligne la vulnérabilité de la période néonatale au stress. Le stress pourrait perturber la maturation intestinale conduisant à des effets adverses à long terme sur la physiologie intestinale, et déclencher chez des individus génétiquement des pathologies digestives comme la MC.

B. Le Syndrome de l'Intestin Irritable :

1. Description et épidémiologie

Trouble fonctionnel intestinal le plus fréquent, le SII est une pathologie chronique de faible morbidité mais avec une forte prévalence dans les pays développés, atteignant jusqu'à 20% de la population générale (Brandt, Bjorkman et al. 2002). Les symptômes peuvent varier et être très différents d'un patient à l'autre. La première étape de diagnostic de cette pathologie est l'exclusion de pathologies organiques comme la MC ou la RCH. Une classification des patients se fait à partir des critères de Rome III, publié en 2006 (Rome Foundation 2006). Ces critères visant à diagnostiquer un SII sont les suivants: persistance de douleurs abdominales ou inconfort pendant au moins trois jours par mois durant trois mois, modifications du transit et de la consistance de selles, ainsi qu'une amélioration des symptômes après défécation. En fonction de ces critères et de la consistance des selles, trois sous-types principaux de patients SII sont définis : (1) prédominance diarrhéique, (2) prédominance constipation et (3) alternance de ces deux états (Spiegel, Chey et al. 2008)

(Trinkley and Nahata 2011) (Heaton, O'Donnell et al. 1992). Un dernier sous type a été défini pour des patients développant un SII suite à une infection gastro-intestinale: le SII post infectieux. Les symptômes apparaissent entre 15 et 65 ans mais la première consultation intervient le plus souvent entre 30 et 50 ans. Dans certains cas, les troubles remontent même à la petite enfance.

Le SII se caractérise le plus souvent par une sensibilité et un inconfort digestif chronique sans aucune anomalie anatomique visible lors des biopsies, à la différence des MICI. Une inflammation de bas grade associée à une activation du système immunitaire a été décrite sans qu'aucun marqueur spécifique n'ait été défini (Chang, Adeyemo et al. 2012). Les symptômes varient avec la prise alimentaire et sont en lien direct avec la survenue d'évènements stressants. Comme pour la MC, une corrélation positive a été montrée entre l'occurrence d'évènements de stress durant la petite enfance (perte d'un parent, divorce ou abus sexuels) et le développement d'un SII à l'âge adulte (Hislop 1979) (Videlock, Adeyemo et al. 2009). Bien que le pronostic vital ne soit pas engagé, la qualité de vie des patients est négativement impactée occasionnant un surcout pour la société et le système de santé sans aucun traitement définitif à l'heure actuelle (Ducrotte 2010).

2. Mécanismes physiopathologiques

Les troubles de la motricité, la sensibilité viscérale et une inflammation de bas grade caractérise le SII. Une perturbation des voies neuro-immunes liant le système nerveux central et le système nerveux entérique a également été démontré appuyant un effet direct du stress dans cette pathologie (pour revue (Stasi, Rosselli et al. 2012)). De nombreuses études montrent comment la détresse psychologique, le stress au quotidien ou l'anxiété peuvent déclencher ou entretenir une phase critique de ces désordres, chez ces patients (Quigley and Khan 2009). L'utilisation d'antidépresseur est de plus en plus développée et s'avère efficace contre la rechute des patients (Dekel, Drossman et al. 2013). De plus, l'imagerie médicale montre l'effet positif de la thérapie par l'hypnose chez les patients SII. Ces thérapies indiquent combien le facteur stress est important dans le développement de la maladie.

Le rôle de l'environnement intestinal associé aux différents troubles du transit, diarrhée ou constipation, et à la sensibilité viscérale semble essentiel dans la compréhension de la pathologie. Certaines études rapportent une modification qualitative et quantitative du microbiote (Ohman and Simren 2010) ainsi qu'une prolifération bactérienne au niveau du côlon chez les SII. Cela est confirmé par l'effet positif d'une antibiothérapie de 10 jours sur les patients SII à dominance diarrhéique (Pimentel, Park et al. 2006). L'utilisation des données issues du séquençage de la fraction 16S ribosomale a permis de montrer les

différences de microbiote dans les fèces entre les patients SII et les sujets sains (Kassinen, Krogius-Kurikka et al. 2007). De plus, l'analyse de prélèvements fécaux de patients à dominante constipée a permis de mettre en évidence une diminution des bifidobactéries ainsi qu'une augmentation des *Enterobacteriaceae* et des bactéries sulfato-réductrices, en lien avec l'hypersensibilité viscérale retrouvée chez ces patients (Crouzet, Gaultier et al. 2013). Une étude, réalisée à partir de biopsies de la muqueuse intestinale, a confirmé les données obtenues à partir des fèces. Il a notamment été démontré une augmentation des bactéries anaérobies, ainsi que des espèces d'*E. coli* et des *Bacteroides* (Swidsinski, Weber et al. 2005).

La production locale de cytokines pro inflammatoires suggère une implication du système immunitaire (Ducrotte 2010). Bien que l'on parle d'inflammation de bas grade, les réponses humorales et cellulaires sont altérées. Une réponse immunitaire anormale vis-à-vis du microbiote a été décrite. En effet, Les patients SII présentent une augmentation des anticorps anti-flagéline (Cremon, Pallotti et al. 2008) (Schoepfer, Schaffer et al. 2008). La stimulation par des anticorps anti CD3/CD28 des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) induit un profil pro inflammatoire associé à la sécrétion d'IL1 β , cytokine pro inflammatoire, et la diminution d'IL10 (Ohman, Lindmark et al. 2009). Une seule étude a étudié les Treg chez ces patients et aucune modification n'a pu être mise en évidence comparée à des sujets sains (Holmen, Isaksson et al. 2007). De plus, il a été mis en évidence un polymorphisme du gène de l'IL10 chez les patients SII (Gonsalkorale, Perrey et al. 2003). Toutefois, le niveau d'inflammation dans le SII reste modéré, sans lésions ou réactions inflammatoires massives, décrivant une inflammation de bas grade. Ceci pourrait s'expliquer par un défaut de présentation antigénique. En effet, la stimulation des PBMC par le LPS indiquent une diminution de la fréquence des cellules CD40⁺ (Ohman, Lindmark et al. 2009).

De nombreuses études ont montré le rôle important des mastocytes dans le SII dont l'infiltration dans la muqueuse au niveau de l'iléon et du côlon est plus élevée chez les patients SII comparés aux patients contrôles (Goral, Kucukoner et al. 2010). De même, les mastocytes sont « physiquement » plus proches des nerfs au niveau du côlon mais sont également plus « chargés », signifiant que la quantité de molécules libérées est plus importante qu'en conditions physiologiques (Goral, Kucukoner et al. 2010). Un rapprochement nerfs – mastocytes serait directement impliqué dans la perception d'une douleur viscérale plus importante (Di Nardo, Barbara et al. 2014) (Barbara, Stanghellini et al. 2004).

C. Le Small Intestinal Bacterial Overgrowth

L'augmentation de la charge bactérienne au niveau de l'iléum se nomme SIBO, pour *Small Intestinal Bacterial Overgrowth*. Ce syndrome très hétérogène est caractérisé par une augmentation de la quantité de bactéries dans l'intestin grêle associée ou non à une modification qualitative. Le SIBO est diagnostiqué lorsque l'on trouve plus de 10^5 UFC par ml de contenu iléal (Gasbarrini, Lauritano et al. 2007). Cette pullulation se fait au profit des Entérobactéries comme les *E. coli* (Bouhnik, Alain et al. 1999). Le SIBO se caractérise également par une malabsorption intestinale des nutriments, et essentiellement des hydrates de carbones (Sherman, Wesley et al. 1985). L'utilisation de nombreux tests par analyse de la respiration montre que la fermentation bactérienne de ces molécules serait responsable de l'inconfort abdominal observée chez les patients. Caractérisé par des douleurs abdominales et une gêne liée aux ballonnements et à la diarrhée, cette pathologie reste mal diagnostiquée, étant souvent confondue avec d'autres pathologies intestinales plus courantes comme le SII.

Le SIBO est généralement retrouvé chez 5 à 75% de patients SII (Ford, Spiegel et al. 2009) (Mann and Limoges-Gonzales 2009), ces données variant selon la cohorte, le sous-groupe de patients SII et les méthodes de détection. De même, le SIBO est observé chez les patients atteints de MICI, en particulier chez les Crohn n'ayant plus la valvule iléo-caecale, où le contenu du côlon peut remonter plus facilement jusqu'au niveau de l'iléon (Neut, Bulois et al. 2002).

Ces pathologies présentent toutes une altération qualitative et/ou quantitative du microbiote commensal. Une modification du microbiote dans le SII ou les MICI est évidente et son implication dans la genèse des autres symptômes est suggérée. En effet, le transfert de flore de patients SII à des rats axéniques adultes induit une augmentation de la sensibilité viscérale et la flore transférée présentait une augmentation significative des Entérobactéries (Crouzet, Gaultier et al. 2013). De plus, aucune colite n'est observée chez les souris axéniques confirmant le rôle du microbiote dans l'inflammation.

L'utilisation d'antibiotiques dans le SII ou les MICI améliore la sensation de douleur durant le traitement et est souvent utilisée lors de la suspicion de rechute. La tétracycline est utilisée pour un traitement de longue durée. La prise durant 7 jours de l'antibiotique induit un retour à la normale du niveau d'hydrogène dans l'air expiré (Di Stefano, Malservisi et al. 2000). La prise d'amoxicilline diminue les douleurs viscérales mais ne modifie pas le profil de l'air expiré (Attar, Flourie et al. 1999). Le métronidazole s'est montré efficace chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Castiglione, Rispo et al. 2003). La rifaximine est un

antibiotique peu absorbé avec une activité anti bactérienne élevée, que ce soit sur les Gram positifs ou négatifs, aérobies ou anaérobies (Ojetti, Lauritano et al. 2009). Une prise durant une période de 7 à 10 jours fait disparaître le SIBO chez 80% des patients et améliorent les symptômes lesquels dans 50 à 92% des cas (Pimentel 2009). La rifaximine apparaît donc comme étant capable d’avoir des effets cliniques à plus long termes.

Toutefois, la plupart des antibiotiques montrent des effets très limités (Kruis 2004). En effet, leurs bénéfices s’estompent et disparaissent quelques semaines après l’arrêt du traitement. Un traitement des pathologies gastro-intestinales par modulation du microbiote par traitement aux probiotiques est une nouvelle piste thérapeutique. Les probiotiques sont des « microorganismes vivants qui, ingérés en quantité suffisante, procurent un effet bénéfique sur la santé de l’hôte » (définition retenue par la « Food and Agriculture Organization of the United Nations et World Health Organizations », 2002). Leur efficacité a été montrée dans le cas du SII, en particulier sur la douleur viscérale (Spiller 2008). La souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 conduit à une phase de rémission de la maladie de Crohn plus rapide que chez les individus n’ayant pas reçu la bactérie probiotique (Malchow 1997). Des effets similaires ont été observés avec *S. boulardii* associé à une période de rémission plus longue (Guslandi, Mezzi et al. 2000). Bien que l’effet semble plus efficace que l’antibiothérapie, les phases de crise réapparaissent.

Largement impliqué dans la physiopathologie du SII, la survenue d’évènements stressant dans l’enfance au moment de la maturation de la muqueuse intestinale constitue un facteur de risques dans le développement de troubles gastro-intestinaux à l’âge adulte (Bradette, Delvaux et al. 1994). En période périnatale, l’organisme non mature est d’autant plus sensible au stress induisant des problèmes de développement de la barrière intestinale pouvant avoir des conséquences à long terme sur l’homéostasie intestinale. Une fois de plus, la période postnatale apparaît donc comme une fenêtre critique extrêmement sensible aux éléments environnementaux.

III. Le stress de séparation maternelle (SSM)

L’association entre survenue d’évènements stressants en période néonatale et développement de pathologies intestinales organiques et fonctionnelle, nous a conduit à nous intéresser au stress de séparation maternel: modèle expérimental de stress néonatal chez le rongeur.

A. Le modèle de SSM

Le nouveau-né est caractérisé par une immaturité de la barrière épithéliale intestinale et du système immunitaire. Les événements survenant durant les premières semaines de vie orientent la maturation de cette barrière ainsi que la mise en place de la réponse immunitaire associée. Cette période critique est donc extrêmement sensible à tout élément extérieur, qu'il soit physique, comme l'alimentation ou le microbiote, ou qu'il soit psychologique, comme le stress.

1. *La période post natale, une période d'hyporéponse*

Afin de permettre la mise en place de l'homéostasie intestinale et la maturation des structures associées, la période périnatale correspond à une période durant laquelle la majorité des systèmes immunitaires et neuronaux sont modulés à la baisse. Chez le rongeur, la période post natale est caractérisée par une accélération du développement neuronale et de fortes modifications cellulaires, permettant l'apparition de structures spécialisées. Ceci est associé à une activité modulée de l'axe HPA définie par une diminution du seuil de réponse au stress. Elle est définie entre le 4^{ème} et le 14^{ème} jour de vie où la baisse de l'activité du système adrénocortical rend l'individu moins sensible aux stress environnants (Rosenfeld, Suchecki et al. 1992). Cette période est essentielle car elle constitue une phase d'adaptation durant le développement car ce niveau faible et stable en corticostérone est nécessaire pour le développement normal du système nerveux central.

2. *Principe du SSM*

Chez les mammifères, l'isolement social est connu pour induire des modifications profondes du comportement. Durant les premières semaines de vie, les interactions mère-enfant permettent le bon développement psychique et psychologique via l'axe HPA du nouveau-né (Levine 2002). Les contacts répétés comme le léchage ou la lactation maintiennent une période d'hyposensibilité de l'axe corticotrope.

Le stress de séparation maternelle consiste à séparer individuellement l'animal de sa mère ou à séparer la mère d'une partie seulement de sa portée. Ce stress peut être unique ou chronique (répété plusieurs jours, le plus souvent 15 jours) et le temps de séparation peut varier de 15 minutes à 24h (le plus souvent 3h), selon les protocoles d'études. La période d'exposition peut aller du 2^{ème} au 14^{ème} jour ou du 4^{ème} au 21^{ème} jour après la naissance (figure 15 je remplacerais cette figure par un tableau des différents SSM en précisant les espèces).

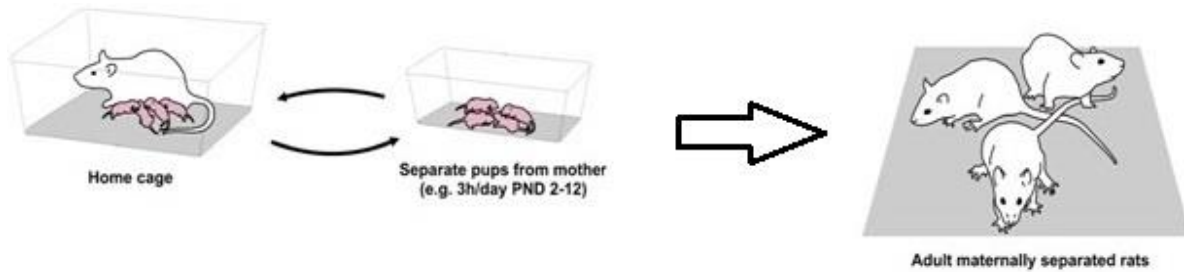


Figure 15 : Protocole de stress de séparation maternelle chez le rat (O'Mahony, Hyland et al. 2011)

Le principe consiste à séparer les petits de leur mère et les uns les autres durant les premiers jours de vie, puis d'analyser les conséquences physiopathologiques chez les animaux adultes.

Le modèle de SSM chronique chez l'animal montre que ces animaux peuvent présenter des effets à long terme jusqu'à l'âge adulte, que ce soit d'un point de vue physiologique ou comportemental (Champagne, Francis et al. 2003). Ce modèle permet de mieux comprendre l'effet délétère d'évènements stressant durant la petite enfance et comment il pourrait prédisposer aux développements de pathologies à l'âge adulte. Il a été montré chez le rat qu'un SSM chronique en période néonatale s'accompagnait chez l'adulte d'une hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale, utilisé comme stimulus périphérique douloureux (Barreau, Ferrier et al. 2004) (Rosztoczy, Fioramonti et al. 2003), soit des symptômes similaires à ceux décrits chez le patient SII. Cependant, les résultats obtenus dépendent du protocole appliqué car l'impact du stress sera différent si le petit est séparé seulement de sa mère ou s'il l'est également du reste de la portée (Arias, Solari et al. 2010).

Les études sur le SSM ont permis de montrer que le stress néonatal a des conséquences à long terme sur la physiologie intestinale. Le SSM est décrit comme un modèle expérimental permettant de mimer les grands symptômes du SII que sont l'hypersensibilité viscérale et l'hyperperméabilité intestinale. Récemment des travaux réalisés chez le rat ont montré que le SSM altérait la morphologie de l'épithélium intestinal chez l'adulte en diminuant le nombre de cellules de Paneth et caliciformes (Estienne, Claustre et al. 2010). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le SSM diminue la fonction de barrière intestinale chez l'adulte et nous nous sommes demandés si ce défaut de barrière intestinale était ou non associé à une rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux et particulièrement les antigènes bactériens comme c'est le cas dans le SII et la MC. Une rupture de tolérance vis-à-vis du contenu luminal est caractérisée par une réponse immunitaire systémique humorale et/ou cellulaire contre les antigènes luminaux. Notre objectif a donc été de caractériser la fonction de barrière intestinale et la réponse immunitaire systémique contre les antigènes luminaux (alimentaires et bactériens) chez les adultes ayant subi un SSM. Comme les outils

immunologiques disponibles sont limités chez le rat nous avons transposé le modèle SSM réalisé initialement chez le rat dans le laboratoire chez la souris.

B. Choix du protocole expérimental

L'objectif de ce travail était de caractériser les conséquences d'un stress en période périnatale sur l'homéostasie intestinale et la réponse immunitaire systémique vis-à-vis des antigènes luminaux. Plusieurs paramètres comme le fond génétique ou le protocole de SSM sont connus pour influencer la nature des résultats (Milde, Enger et al. 2004) (Ellenbroek and Cools 2000).

Plusieurs éléments méthodologiques devaient donc être définis comme la durée et la période de séparation qui sont deux paramètres importants (Lehmann, Pryce et al. 2002). Des séparations de courte durée (15 minutes) n'induisent pas une activation de l'axe HPA en réponse au stress. En effet, ces séparations « éclaires » correspondent aux périodes durant lesquelles les mères quittent la portée pour aller se nourrir dans un contexte normale. Les séparations longues (plusieurs heures) diminuent l'efficacité du rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes au niveau de l'hypothalamus (Ladd, Owens et al. 1996) (Francis, Caldji et al. 1999). De plus, une séparation maternelle de 24 heures au 3^{ème} et au 11^{ème} jour de vie induit des réponses hypophysaires (ACTH) et surrénaliennes (corticostérone) beaucoup plus importantes que celles observées chez un souriceau séparés une seule fois (van Oers, de Kloet et al. 1998). Toutefois, à l'heure actuelle, aucune donnée concernant l'impact du stress sur la barrière intestinale n'est disponible pour ces modèles. De plus, cela induit un stress métabolique. Dans le modèle chez le rat, la mesure de sensibilité viscérale à la distension colorectale permet de valider les effets à long terme du SSM. En effet, ces animaux ayant subi le SSM, de manière répétée 2 à 3 heures par jour pendant 15 jours, présentaient une hypersensibilité viscérale à l'âge adulte (Barreau, Ferrier et al. 2004).

Comme chez le rat, le choix du fond génétique de la souris étudiée est un élément capital. Différentes études montrent comment les facteurs génétiques contribuent de manière significative dans les variations interindividuelles dans la mise en place de troubles d'anxiété et de dépression (Kendler, Myers et al. 2001). L'objectif de ce travail était d'évaluer la réponse immunitaire dans le modèle de SSM. La souche ne devait donc pas présenter une orientation prédisposée pour sa réponse immunitaire. De plus, le fait de la séparer de sa portée entraîne un stress important pour la mère qui peut engendrer un fort taux de mortalité par cannibalisme. Les souris C57BL/6 sont très souvent utilisées dans des modèles de stress chroniques et de dépression. Toutefois, certains travaux montrent que l'utilisation des

C57BL/6 ne serait pas adaptée dans un modèle de SSM car ces souris développeraient des résistances vis-à-vis des effets du stress (Own and Patel 2012). De plus, le cannibalisme important par la mère conduit souvent à des protocoles d'adoption de la portée. Enfin, l'orientation immunitaire en profil pro inflammatoire de type Th1 chez ces souris induisait un biais dans notre analyse. De même pour les souris BALB/c, bien que le taux de rejet de la portée ou de mortalité soit faible, une orientation de profil pro Th2 induisait un biais dans le modèle.

Les travaux ici présentés ont donc été réalisés chez la souris C3H/HeN. Cette souche a l'avantage de ne pas présenter d'orientation inflammatoire particulière et fait preuve d'un excellent comportement maternel. Nous avons réalisé le SSM 3 heures par jour entre le 2^{ème} et le 15^{ème} jour de vie sur une période de dix jours. Le plus souvent, les animaux ont subi le SSM durant 5 jours, puis arrêt pendant 2 jours et reprise du SSM durant 5 jours. Cette période néonatale correspond à un moment critique dans la mise en place de l'homéostasie intestinale. Les portées témoins ou stressées étaient sélectionnées de manière aléatoires, toujours mixtes et composés de 6+/-1 petits afin de minimiser l'effet sexe et taille de la portée sur le comportement maternel (Alleva, Caprioli et al. 1989) (Figure 16).

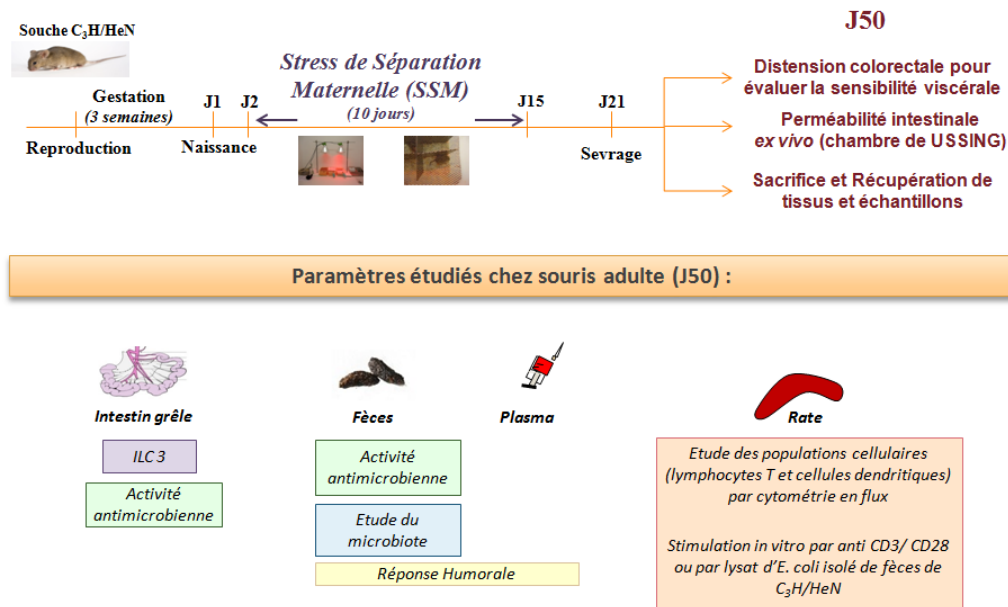


Figure 16 : Protocole de Stress de Séparation Maternelle (SSM) chez la souris C3H/HeN

Très sociable, la souche C3H/HeN présente l'avantage de ne pas avoir de prédisposition dans sa réponse inflammatoire. Le SSM est effectué sur une période de 10 jours et les animaux sont analysés à l'âge de 45 jours.

OBJECTIFS

La survenue d'évènements traumatiques au cours de la petite enfance est associée avec l'apparition et/ou le développement de pathologies digestives organiques et fonctionnelles à l'âge adulte particulièrement le SII et la MC. La période néonatale semble donc particulièrement vulnérable à la survenue d'évènements stressants qui peuvent avoir des conséquences à long terme notamment sur le déclenchement de pathologies digestives. Le rôle du stress dans le déclenchement et/ou l'entretien de pathologies intestinales tel que le SII ou les MICI a été largement décrit. Ces pathologies digestives multifonctionnelles sont caractérisées par un défaut de barrière intestinale associé à une rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux et particulièrement des antigènes bactériens. Cette rupture de tolérance se caractérise par une réponse immunitaire systémique humorale et/ou cellulaire dirigée contre les antigènes du microbiote intestinal. Un stress, en période périnatale semble altérer la fonction de barrière intestinale mais ses conséquences sur le système immunitaire et plus particulièrement sur une éventuelle rupture de tolérance vis-à-vis du contenu luminal n'a pas été étudié et fait l'objet de ce travail de thèse.

Un modèle expérimental mimant la survenue d'évènements traumatiques, en période néonatale, est celui du SSM chez le rongeur. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire chez le rat ont montré que les animaux adultes ayant subi un SSM présentent une augmentation de la perméabilité intestinale, une hypersensibilité viscérale à la distension colorectale, des modifications du microbiote et une augmentation de la proximité des mastocytes dans la muqueuse intestinale. Toutefois, les conséquences à l'âge adulte de ce stress chronique sur la fonction de barrière intestinale, le système lymphoïde associé à l'intestin, le GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue et la réponse immunitaire systémique contre les antigènes luminaux restent peu étudiés et les résultats décrits sont souvent difficiles à associer. Ce projet a pour but d'étudier l'empreinte d'un SSM chez la souris sur l'homéostasie intestinale et ses éventuelles conséquences sur une rupture de tolérance vis-à-vis du contenu luminal.

Pour réaliser ce projet de recherche, le protocole expérimental suivant a été réalisé: les souriceaux C3H/HeN ont été ou non isolés de leur mère et du reste de la portée 3h par jour pendant 10 jours à compter du deuxième jour de vie. La génération F1 a été sevrée au 21^{ème} jour de vie, séparée par sexe et gardée en cages collectives jusqu'au sacrifice, au 45^{ème} jour de vie. Les paramètres suivants ont été étudiés sur la F1: sensibilité viscérale à une distension

colique, perméabilité intestinale totale *in vivo* ou *ex vivo* en chambre de Ussing, microbiote fécal et iléal, la fonction antimicrobienne entérique, la réponse humorale dirigée contre les antigènes luminaux (lysate d'*E. coli* commensal et nourriture), la réponse cellulaire à un lysate de ce même *E. coli*, et la caractérisation des populations cellulaires de la rate (lymphocytes T, cellules présentatrices d'antigènes).

Ce travail de recherche a permis de montrer des résultats significativement différents en fonction du sexe des animaux mettant en évidence un dimorphisme sexuel important dans ce modèle de stress de séparation maternel. Afin de faciliter la compréhension des résultats obtenus, nous avons donc choisi de présenter d'une part les résultats obtenus chez les mâles et d'autre part ceux obtenus sur les femelles.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Résultat I :

Le stress de séparation maternelle altère les fonctions de barrière intestinale associée à une réponse immunitaire systémique vis-à-vis d'*E. coli* commensal chez les souris mâles jeunes adultes.

En revue dans Psychoneuroendocrinology, resoumis le 23.12.2014

A. Riba, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, C. Cartier, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, M Zill, H. Robert, S. Ellero-Simatos, M Olier, V. Théodorou, S. Ménard.

La période néonatale se caractérise par une immaturité de l'épithélium intestinal et du système immunitaire qui lui est associé. Des perturbations, au cours de cette période, sont capables d'induire des altérations à long terme de l'homéostasie intestinale, associées à une susceptibilité à développer à l'âge adulte des pathologies intestinales organiques ou fonctionnelles. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'un stress de séparation maternelle (SSM) sur des jeunes souris mâles adultes de souche C3H/HeN sur la fonction de barrière intestinale et sur la réponse immunitaire contre le microbiote intestinal.

Le SSM (i) augmente la sensibilité viscérale, la perméabilité intestinale para et transcellulaire et la production de TNF α au niveau de l'iléon (ii) diminue l'activité antimicrobienne fécale du lysozyme et la population d'ILC3 de la *lamina propria*. Ce défaut de barrière intestinale observé chez le jeune adulte est associé à une rupture de tolérance contre des antigènes bactériens attestée par une réponse systémique IgG dirigée contre un *E. coli* commensal. De plus, le SSM augmente la production d'IFN γ et d'IL10 en réponse à une stimulation anti CD3/CD28 associée à une augmentation des lymphocytes T activés CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} et une diminution des T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Enfin, le SSM diminue l'expression de CD40 sur les CD11c⁺ et CD11b⁺ expliquant ainsi la diminution de sécrétion d'IL10 et de TGF β sans modification de la sécrétion d'IFN γ en réponse à une stimulation des splénocytes par un lysat d'*E. coli* suggérant un défaut de présentation antigénique. Aucune modification de la population d'*E. coli* fécale n'a été observée chez les animaux stressés comparés aux animaux témoins.

L'ensemble de ces résultats souligne les effets néfastes du stress en période périnatale sur l'homéostasie intestinale du jeune adulte qui conduisent à une rupture de tolérance vis à vis du microbiote intestinal. Ce même défaut de barrière intestinale associé à une rupture de tolérance vis-à-vis du microbiote est observé dans les pathologies intestinales et le stress pourrait avoir un rôle important dans le déclenchement de ces pathologies chez des individus génétiquement prédisposés.

Title: Early life stressful events impaired intestinal barrier functions associated with abnormal systemic immune response toward commensal *E. coli* population in young-adult mice.

A. Riba¹, C. Lencina¹, V. Bacquié¹, C. Harkat¹, M. Gillet¹, C. Cartier¹, M. Baron¹, C. Sommer¹, V. Mallet¹, M Zill², H. Robert^{1,3}, S. Ellero-Simatos², M Olier¹, V. Théodorou¹, S. Ménard¹.

Author affiliation:

1 INRA, ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology), team Neuro-Gastroenterology and Nutrition, Toulouse, France

2 INRA, ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology) team Integrative Toxicology and Metabolism, Toulouse, France

3 Institut Universitaire de Technologie, Université Paul Sabatier, Auch, France

Corresponding author: Sandrine Ménard, Neuro-Gastroenterology & Nutrition, INRA, 180 Chemin de Tournefeuille, BP93173, 31027 Toulouse cedex 3, France. Phone: +33 561 28 57 59; email:sandrine.menard@toulouse.inra.fr

Running title: Maternal separation disrupts immune response to microbiota at adulthood

Abstract: Neonatal period is characterized by immature intestinal epithelium and immune system. Occurrence of stressful adverse events during this period induces long lasting alterations of intestinal homeostasis associated with susceptibility to develop functional or organic gastrointestinal disorders at adulthood. We analyzed the consequences of maternal separation (MS) in male C3H/HeN mice on intestinal barrier functions and systemic immune response toward commensal *E. coli*. In 50-days old male mice, MS (i) increased intestinal para- and trans-cellular permeability, TNF α expression in ileum and visceral sensitivity and (ii) decreased fecal lysozyme activity and ILC3 population in *lamina propria*. This breach in mucosal barrier functions in young-adults was associated with a systemic IgG response against commensal *E. coli*. Furthermore, MS increased anti CD3/CD28-induced IFN γ and IL10 secretion in splenocytes in accordance with an increase of CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} activated T cells and decreased CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. MS decreased CD40 expression on CD11c⁺ and CD11b⁺ leading to decrease of IL10 and TGF β secretion without any modification of IFN γ on *E. coli*-stimulated splenocytes suggesting a defect of antigenic presentation. No modification of fecal *E. coli* population was observed in young-adult MS vs. control mice. Altogether our results highlight that early stressful events had long lasting adverse effects on loss of host tolerance toward commensal *E. coli* in none predispose individuals. Consequently, one can hypothesize that occurrence of early life stressful events may contribute to trigger gastrointestinal diseases in susceptible individuals.

Keywords: Maternal separation, humoral and cellular response toward microbiota, pro-inflammatory T cell response, innate and adaptive response.

Abbreviations: AMP, antimicrobial peptides; APC, antigen presenting cells; CD: Crohn's disease; GALT, Gut Associated Lymphoid Tissue; IBD, Inflammatory Bowel Disease; IBS, Irritable Bowel Syndrome; Ig, Immunoglobulin; ILC, Innate Lymphoid Cells; MS, Maternal Separation; SILF, Small Intestine Lavage Fluids.

1. Introduction

The occurrence of stressful events is considered as a common contributing factor triggering and/or maintaining several gastrointestinal disorders including Inflammatory Bowel Disease (IBD) and Irritable Bowel Syndrome (IBS). IBD and IBS are multifactorial gastrointestinal disorders, involving genetic and environmental factors. IBD are organic chronic inflammatory gastrointestinal disorders encompassing Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis. IBS is a functional gastrointestinal disorder characterized by abdominal pain and altered bowel habits (Drossman, 2006). Even though IBS and IBDs are considered to be very different gastrointestinal pathologies in terms of clinical manifestations and severity, mounting evidence suggest that they share common environmental contributing factors (Barbara *et al.*, 2014) and features (Spiller and Lam, 2011). For instance, gut epithelial barrier impairment, and a loss of tolerance toward luminal content more particularly toward microbiota are observed in both IBD and IBS patients. Furthermore, abdominal pain, the cardinal symptom of IBS is also frequently reported in active and in remission IBD patients (Halpin and Ford, 2012). Stress is defined as an acute threat to homeostasis of an organism and drives adaptive responses that serve to defend the stability of the internal environment and to ensure the survival of the organism (Selye, 1936). IBS has been widely linked to stress (Mayer *et al.*, 2001) and more recently, psychological stress was associated with IBD (Mawdsley and Rampton, 2005) and particularly with CD (Ringel and Drossman, 2001), suggesting that dysfunctional interactions in brain-gut axis contribute to the pathophysiology of both diseases (Bonaz and Bernstein, 2013). Early life events draw particular attention since they were associated with IBS (Hislop, 1979; Lowman *et al.*, 1987; Videlock *et al.*, 2009) and IBD (Wegman and Stetler, 2009) susceptibility. Perinatal period is a crucial and critical window where intestinal barrier, immune system and microbiota mature and establish an appropriate complex relationship (Renz *et al.*, 2012). In mice, Paneth cells producing antimicrobial peptides (AMP) located in the bottom of intestinal crypts are developed 10-12 days after birth (Menard *et al.*, 2008). AMP participate in the control of microbiota colonization (Salzman and Bevins, 2013) and reciprocally microbiota participates to the development of intestinal homeostasis.

The first bacteria colonizing the gut are facultative anaerobes such as *Enterobacteriaceae* including *Escherichia coli* (*E. coli*) (Tenaillon *et al.*, 2010), *Lactobacillus spp.* and *Streptococcus spp.* (Mshvildadze and Neu, 2010). Furthermore, secondary lymphoid tissues such as mesenteric lymph nodes (MLN) and Peyer's Patches (PP) are present but underdeveloped at birth (van de Pavert and Mebius, 2010). In this study, we wonder if occurrence of adverse stressful events in neonates could induce long lasting alterations in intestinal homeostasis mimicking IBD and/or IBS features. To answer this question, we used a well-studied model of early stress in rodent, *i.e.* maternal separation (O'Mahony *et al.*, 2011) and analyzed its consequences on intestinal barrier functions and immune response toward luminal content. Indeed, we hypothesized that if early stressful events impair intestinal barrier functions it might be associated with a loss of immune tolerance toward luminal contents, *i.e.* food and bacterial antigens as observed in IBD and IBS patients more particularly toward bacterial antigens. In this study, we use *E. coli* lysate to address immune response toward microbial content as representative commensal bacteria of C3H/HeN young adult mice microbiota.

2. Material and Methods

All experimental protocols described in this study were approved by the local Animal Care Use Committee (Comité d'Ethique de Pharmacologie-Toxicologie de Toulouse - Midi-Pyrénées, Registered as N°86 at the Ministry of Research and Higher Education, France) (N° 0029/SMVT, Midi Pyrénées, France) and conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE. All animals were euthanized by cervical dislocation.

2.1 Animals

To minimize cannibalism induced by perinatal stress, we used C3H/HeN mice known to be excellent breeder. Nulliparous female C3H/HeN mice (Janvier, Roubaix, France) were mated with male for 5 days and then individually isolated. They were kept at a constant temperature (22±1°C) and

2.5 Enteric lysozyme analysis

2.5.1 Lysozyme expression in Paneth cells

Ileal samples were fixed in 4% formalin, dehydrated through graded ethanol and embedded in paraffin. Sections (5µm) were rehydrated and submerged in antigen retrieval solution (citrate buffer, 10mM, pH6, 99°C) for 30 minutes. After incubation in blocking solution (PBS 0,01% Tween 20, 1% bovine serum albumin and 2% donkey normal serum) for 15 min, sections were incubated with rabbit anti-mouse lysozyme antibody (1/100, overnight, +4°C) (Abcam, Paris, France) followed by a Alexa fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (0.75µg/ml, 1H, Room temperature) (Jackson, Suffolk, UK). After washing, sections were incubated with Alexa fluor 594-conjugated Wheat Germ Agglutinin (WGA) (10µg/ml, 45 min) (Invitrogen, Life Technology, Cergy Pontoise, France). Sections were mounted in Prolong gold antifade mounting medium with DAPI (Invitrogen) and examined under a Nikon 90i fluorescence microscope. Lysozyme fluorescence intensity in Paneth cells was quantified employing the software Nis-Elements Ar (Nikon, Champigny sur Marne, France) and results were expressed in fluorescence intensity per cell. Analyses were done on five crypts per animal and on five animals from each group.

2.5.2 Lysozyme activity in fecal content

Feces were collected and frozen at -80°C. Activity of lysozyme against the peptidoglycan was determined using the EnzChek® Lysozyme Assay Kit (Molecular probes, life technology, St Aubin, France).

2.6 Monitoring of viable commensal fecal bacteria and characterization of fecal *E. coli* population

Feces from male C3H/HeN mice were collected and homogenized in isotonic saline solution. Colibiota (i.e. *E. coli* populations) was quantified by plating tenfold serial dilutions of feces homogenates on selective ChromID™ Coli media (Biomérieux, Marcy L'Étoile, France) and aerobic and anaerobic bacteria were quantified on selective PCA (Plate Count Agar) plates (Biomérieux, Marcy L'Étoile, France) and selective Schaedler 5% sheep blood plates (Biomérieux, Marcy L'Étoile, France) respectively. Plates were incubated at 37°C and the number of CFU (Colony Forming Units) was enumerated after 24 hours. Colibiota and bacteria quantification was expressed in log (CFU / g of

of feces). Colibiota was further characterized by determining phylogenetic group of isolates using the Clermont *et al.* method (Clermont *et al.*, 2000) and performing detection of potential virulence genes. To this aim, DNA from five *E. coli* isolates from each mouse was extracted from overnight cultures using NaOH, and subjected to multiplex and uniplex PCR sets. PCR were performed on bacterial lysates (approximately 100 ng of genomic DNA) added with EconoTaq® Plus green 2X master mix (EUROMEDEX, Strasbourg, France) and 20 pmol of each primer. Primer pairs sets used for determination of the phylogenetic group were described by Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2000), PCR was performed using CFX96 (Biorad). PCR products were loaded on 2% agarose gel with TAE and Clear Sight DNA Stain (Invitrogen). Serotyping and analyze of virulence factor (toxins, adhesins, intimins) was performed to characterized commensal *E. coli* used for assessing humoral and cellular response. Those analyses were realized by the reference laboratory for *E. coli* in the University of Montréal, Canada and identified the *E. coli* as a O18 serotype devoid of any virulence factors.

2.7 Commensal *E. coli* and food lysates preparations

2.7.1 *E. coli* lysate for humoral and cellular response

Pellet of an overnight culture of one of the *E. coli* isolates previously characterized was washed in 0,9% NaCl, suspended in 1 ml of distilled water, sonicated for 1 hour, frozen in liquid nitrogen, melt and centrifuged. Supernatant was filtered in 0,22 µm and conserved at -20°C as the *E. coli* lysate used for humoral and cellular response. Lysate protein concentration was measured using BCA (bicinchoninic acid) protein Assay kit, Uptima (Interchim, Montluçon, France).

2.7.2 Food lysate for humoral response

Food was suspended in PBS, incubated and vortexed. Supernatant was filtered on 0.22 µm filter and kept at -20°C as the food lysate used for humoral response. Lysate protein concentration was measured using BCA protein Assay kit, Uptima (Interchim, Montluçon, France).

2.8 Humoral response in plasma and feces.

Blood, feces and Small Intestinal Lavage Fluids (SILF) were sampled. Intracardiac blood was recovered with heparinated needle and plasma was kept at -80°C. Fecal proteins were extracted mechanically in complete antiprotease cocktail (Roche Diagnostic, Meylan, France) and frozen at -80°C.

2.8.1 Quantification of total IgA and IgG concentrations

Plasma, fecal and SILF IgG and IgA concentrations were measured by ELISA in MaxiSorp 96-wells flat-bottomed plates (NUNC, Thermo Scientific, Dutcher, Brumath, France). Plates were coated overnight at +4°C with 50 µl of 5 µg/ml sheep anti-mouse IgA (Sigma) or goat anti-mouse IgG (SoutherBiotech, Cliniscience, Nanterre, France) in PBS. Plates were blocked with PBS-5% fetal calf serum (FCS) (GIBCO, Invitrogen, Life Technology, St Aubin, France) before incubation with diluted samples or purified IgA or IgG (SoutherBiotech). Plasma was diluted at 1:20,000 for IgG and 1:15,000 for IgA; SILF at 1:12 for IgG, 1:2,000 for IgA and fecal extracts at 1:20 for IgG, 1:6,000 for IgA. Horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgA (Sigma) or goat anti-mouse IgG (SoutherBiotech) were added, HRP was revealed using TMB (Becton Dickinson; BD, Le Pont de Claix, France) and the reaction was stopped with 25 µl of H₂SO₄ 2N before reading at 450 nm using an automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan). Results were expressed as µg/ml for plasma and SILF and as µg/mg and ng/mg of fecal proteins for IgA and IgG in fecal extracts.

2.8.2 Immunoglobulin specificity against luminal content

Maxisorp 96-wells plates (NUNC) were coated overnight at +4°C with 50 µl of a) 5 µg/ml of *E. coli* lysate or b) 20 µg/ml of food lysate or c) 15 µg/ml of gliadin (Sigma) diluted in 70% ethanol. After blocking with PBS 5%-FCS, plates were incubated for 2 hours at 37°C with either a) 50 µl of plasma samples diluted with PBS 5%-FCS to adjust IgG concentration to 20 µg/ml or b) 50 µl of SILF samples diluted with PBS 5%-FCS to adjust IgA concentration to 20 µg/ml. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (SoutherBiotech) or goat anti-mouse IgA (SIGMA) was incubated for 2 hours at 37°C and revealed as above-mentioned. Results were expressed as optical density (OD) at 450 nm and were considered positive if above two blanks (threshold, indicated by a grey dashed line in figures).

2.9 Spleen and Lamina propria cells characterization

2.9.1 Splenocytes and antigens presenting cells isolation

Spleens were removed and cells were isolated through a 70 µm nylon mesh in PBS/1% KnockOut™ SR (KO SR) (GIBCO). Cells were stimulated overnight by 40 µg/ml poly I:C (Sigma) and 20 µg/ml LPS (Sigma) prior antigen presenting cells (APC) analysis by flow cytometry. Splenocytes were stained with antibodies to the following markers: anti-CD4 (BD), anti-CD44 (BD), anti-CD62L (BD), anti-CD25 (BD), anti-foxp3 (ebioscience, Rennes, France), anti-CD11b (BD), anti-CD11c (BD), anti-CD40 (BD).

Small intestines were washed in cold PBS, cut into 0.5 cm pieces, incubated four times in 30 ml of PBS-3 mM EDTA (Sigma) for 10 min at 37°C and digested in 30 ml of RPMI 1640 added with 20% BSA and 100 U/mL of collagenase (Sigma) for 40 min at 37°C. *Lamina propria* cells were purified on a 40%–80% Percoll gradient run for 15 min at 2,000g and cells were stained with anti-MHC II and anti-RORγt antibodies (BD).

Flow cytometry data collection was performed on MACSQuant® Analyzers (Miltenyi Biotec, Paris, France). Data were analysed using VenturiOne® (AppliedCytometry) software.

2.9.2 Measurement of splenocytes activation

After washing, cells were seeded on 24-well plates at 1x10⁶ cells per well for cytokines assays in Cerrotini culture medium (Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 8% KO SR (GIBCO), 36 mg/l asparagine, 116 mg/l arginine, 10 mg/l folic acid, 1 g/l 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid, 0.05 mmol/l β-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 Kg/ml streptomycin and 1 µg/ml fungizone) in the presence or absence of a) 1 µg/ml of *E. coli* lysate or b) 5 µg/ml hamster anti-mouse CD3 and hamster anti-mouse CD28 (BD) coated wells. After 3 days of stimulation, culture supernatants were collected and frozen at -80°C prior cytokines measurement.

2.10 Cytokine measurement

Cytokines were measured in supernatant of primary cell culture of spleen and on ileal fragments previously treated as follow. Frozen ileal fragments were suspended in RIPA buffer (0.5% deoxycholate, 0.1% SDS and 1% Igepal in TBS) containing complete anti protease cocktail (Roche), proteins concentrations were measured using BCA uptima kit (Interchim).

ELISA: TNF α , IFN γ , TGF β or IL10 present in primary cells culture supernatant or ileal tissues were assayed using commercial enzyme linked immunosorbent assays (ELISA kits; Duoset R&D Systems, Lille, France). For ileal tissue TNF α concentration were normalized per mg of proteins in the supernatant and results expressed in pg of cytokine per mg of proteins.

2.11 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Results were expressed as box and whisker plots for total Ig or means \pm SEM for other results. Mean comparisons were performed using two-way ANOVA analysis followed by Bonferroni post test or non-parametric Mann Whitney tests. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

3. Results

3.1 MS in mice increased intestinal permeability and visceral sensitivity to colorectal distention

MS significantly increased total intestinal permeability to FITC-Dextran 4kDa (17.76 ± 1.18 vs. 8.09 ± 0.79 $\mu\text{g/ml}$ of plasma, Figure 1A). MS also significantly increase para- and trans-cellular permeability to respectively FSS (11.47 ± 2.56 vs. 4.9 ± 0.58 $\text{cm/sec} \cdot 10^{-7}$) and total HRP (12.45 ± 3.78 vs. 3.07 ± 0.55 $\text{cm/sec} \cdot 10^{-8}$) in jejunal fragments mounted in Ussing chambers. Furthermore, MS increased visceral sensitivity to colorectal distention at low volumes (3.99 ± 0.59 vs. 0.9 ± 0.1 mV.s at 0.02 ml; 5.24 ± 1.06 vs. 2.03 ± 0.44 mV.s at 0,04 ml; 6.34 ± 0.87 vs. 3.07 ± 0.62 mV.s at 0,06ml compared to control) (Figure 1B). This result reflects MS-induced allodynia i.e. pain response at non nociceptive stimulation. No differences were observed for higher volumes (0.08 and 0.1 ml). Finally, MS decreased corticosterone concentration in plasma (Supplemental figure 1) suggesting a defect of HPA axis.

Figure 1

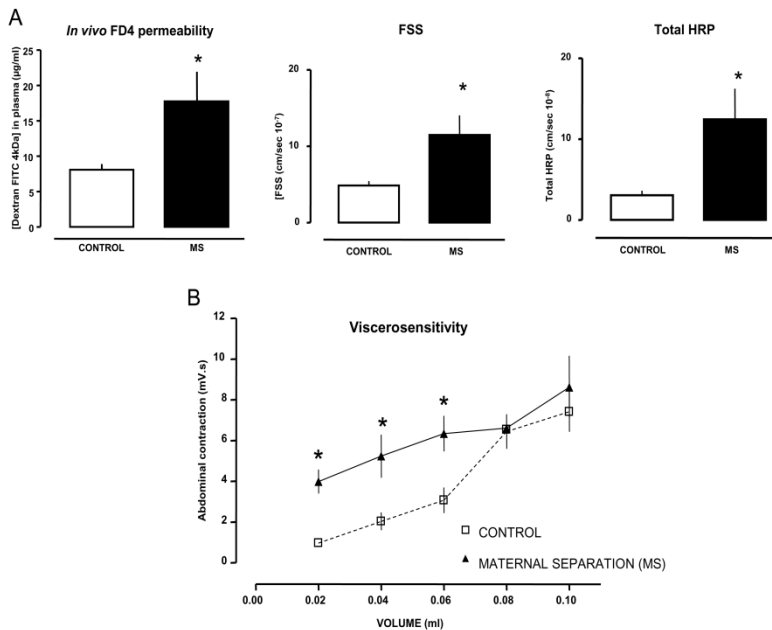


Figure 1: Effects of Maternal Separation (MS) in mice on Intestinal Permeability to various markers and visceral sensitivity on young-adult male mice.

(A) Representative histograms of Dextran-FITC 4kDa concentration measured in plasma 4 hours after gavage, jejunal permeability of Fluorescein Sodium Salt (FSS) and Horse Radish Peroxidase (HRP) measured after 2H bathing in Ussing chambers in MS group (black histogram) and control group (white histogram) ($n = 11$ to 18 mice per group).

(B) Representative curves of abdominal contraction in response to colorectal distention with increasing volumes (0.02 to 0.1ml) in MS (black triangles plain line) compared to control (white square dashed line) ($n = 16$ mice per group). * $p < 0,05$ compared to identical volumes for controls.

3.2 MS decreased ileal expression and fecal activity of lysozyme

MS decreased ileal expression of lysozyme in Paneth cells (65803 \pm 17448 vs. 160960 \pm 27224 fluorescence intensity/cell) without modification of the number of crypts producing lysozyme (Figures 2A-C). Moreover, fecal anti-peptidoglycan activity of lysozyme was decreased in MS mice compared to controls (155.5 \pm 35.28 vs. 332.2 \pm 45.43 U/mg of fecal proteins, Figure 2D).

Figure 2

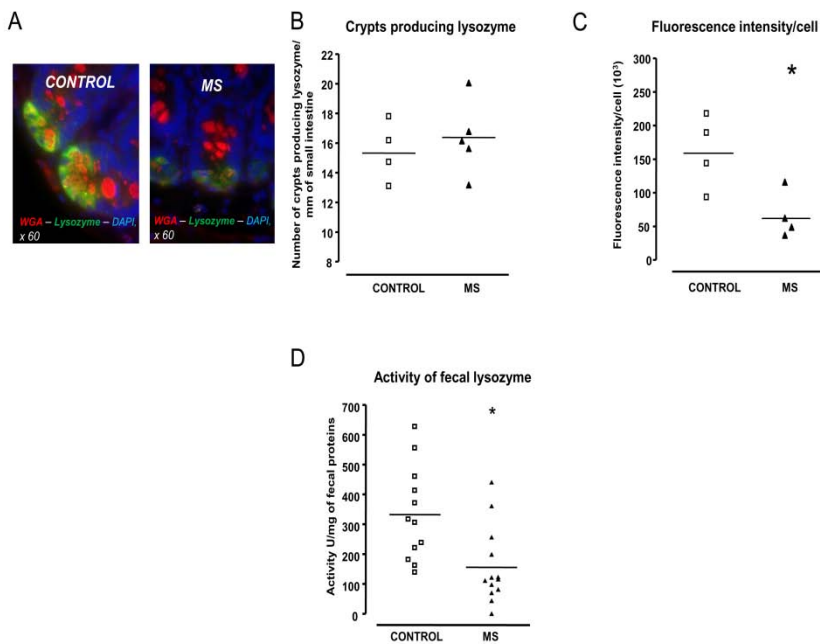


Figure 2: Lysozyme expression and activity.

(A) Immunostaining of ileum paraffin section with anti-lysozyme-FITC, Wheat germ agglutinin (WGA)-Texas red and DAPI.

(B) Number of crypts producing lysozyme on small intestine in MS (black triangles) compared to control (white square) (n = 4 to 5 mice per group).

(C) Lysozyme fluorescence intensity per crypt cell in MS (black triangles) compared to control (white square) (n = 4 mice per group).

(D) Lysozyme enzymatic activity against peptidoglycan measured in feces of MS (black triangles) compared to control (white square) (n= 7 to 8 mice per group).

* p<0.05 compared to control

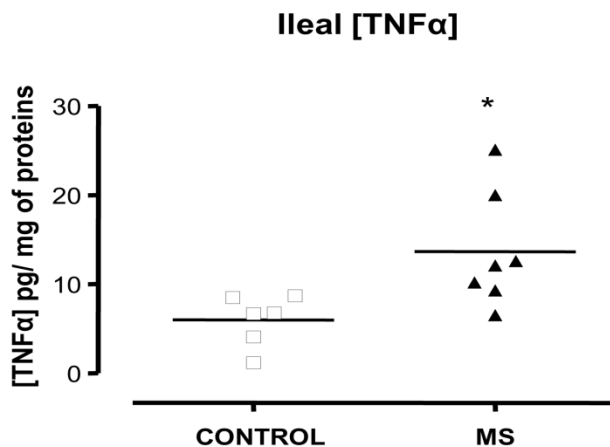


Figure 3: TNF α concentrations in ileum.

TNF α concentrations in ileal fragments measured by ELISA (n = 6-7 mice per group).

* p<0.05 compared to control.

3.4 MS decreased percentage of ILC3 in lamina propria and increased systemic humoral response against commensal *E. coli*

MS decreased ILC3 (MHCII⁺, RORγt⁺) percentage in lamina propria of small intestine (0.41±0.003% vs. 0.74±0.12%, Figure 4). This decrease was associated with an increase plasma anti-*E. coli* IgG (0.046±0.012 vs. 0.035±0.012 OD450nm) but not IgA (Figure 5B). MS did not induce any modifications of total Ig concentrations in plasma (Figure 5A) or reactivity against hydrosoluble or hydrophilic (gliadin) food antigens (Figure 5C). Of note, MS had no consequences on intestinal humoral response (total IgG and IgA or anti-*E.coli* IgG or IgA) (supplemental figure 2)

3.5 Neither fecal *E. coli* populations (colibiota) nor total viable microbiota populations were affected by MS

We wonder if the alterations of intestinal barrier functions induced by MS and mentioned above might be a consequence of MS adverse effect on intestinal colibiota. Fecal counts of colibiota fecal colonies on selective agar plates did not reveal any quantitative modification in MS mice (Figure 6). Furthermore, MS did not change the *E. coli* phylogenetic group since all *E. coli* isolated from fecal contents (five isolates per mice, 5 mice tested) belonged to B1 phylogenetic group regardless of the mice group (data not shown). Additionally, we counted aerobic and anaerobic cultivable microbiota respectively on PCA (Plate

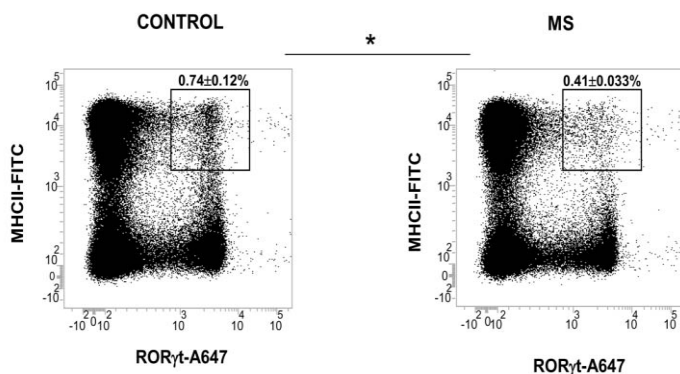


Figure 4: ILC3 populations in small intestine.

Flow cytometry analysis of ILC3 population by immunostaining with anti-RORγt and anti-MHC II on lamina propria cells from small intestine (n = 4 to 6 mice per group).

* p<0.05 compared to control

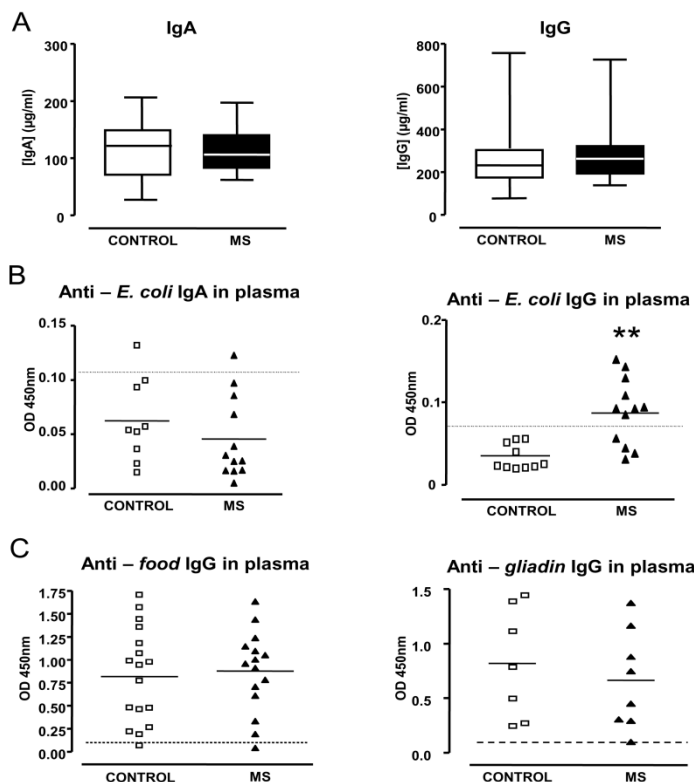


Figure 5: IgA and IgG concentrations and specificity against luminal content in plasma (*E. coli*, hydrosoluble and hydrophilic [gliadin] food lysate).

(A) Plasma IgA and IgG concentrations measured by ELISA (IgA: n = 14 to 28 mice per group; IgG: n = 27 to 35 mice per group). The lower and upper lines of the boxes are the 25th and the 75th percentiles, and the lines in the boxes are the median (the 50th percentile). The whiskers extend to the highest and lowest values.

(B) IgG and IgA specificity against *E. coli* lysate assessed by ELISA after normalizing IgG or IgA concentrations (IgG: n = 10 to 12 mice per group; IgA: n = 9 to 12 mice per group).

(C) IgG specificity against food lysate (hydrosoluble fraction) and gliadin (hydrophilic fraction) assessed by ELISA after normalizing IgG concentration (food: n = 17 to 15 mice per group; gliadin: n = 7 to 8 mice per group). Horizontal dashed lines indicate the threshold for specificity corresponding to 2 blanks.

* p<0.05 compared to control

Count Agar) (Figure 6B) and Schaedler 5% sheep blood plates (Figure 6) and did not observe any quantitative differences between MS and control group. Assessment of changes in the fecal microbial composition in response to MS was also performed through qPCR analysis. Differences in abundance were lower than three fold within the 19 phyla/groups/taxons or species analyzed. Relative changes were mainly noted within the *Bacteroidetes* phylum (*Bacteroides* spp. decrease associated with *Prevotella* spp. increase in stressed mice), but no clear clustering effect based on stress exposure was observed using Principal Component Analysis (PCA) (Supplemental figure 3).

We then used ¹H-NMR metabolomics to further investigate differences in metabolic activity of gut microbiota in MS and control mice as described in the Supplemental Methods. The fecal metabolome of the mice comprised many metabolites derived from the host-microbiota co-metabolism such as short-chain fatty acids (propionate, succinate, acetate), amino acids (leucine, valine, isoleucine...), keto-acids (5-aminovalerate...) and bile acids among others (Supplemental Figure 3). Using metabolomics, no obvious differences between MS and control animals were observed (see Principal Component Analysis in Supplemental figure 4).

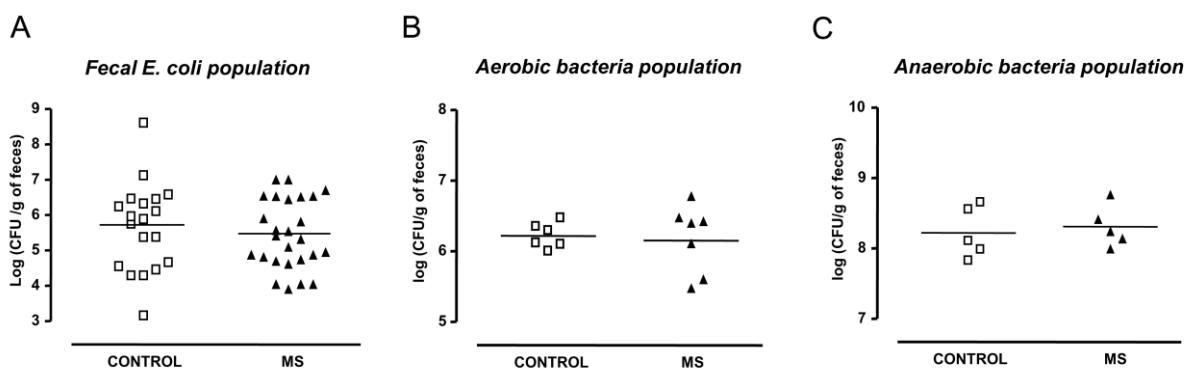


Figure 6 – Characterization of cultivable bacteria in young-adults.

- (A) Fecal *E. coli* counts in mice at D50 (Mean of *E. coli* CFU (log) per g of feces) (n = 19 to 26 mice per group).
- (B) Fecal aerobic bacteria counts (PCA plates) in mice at D50 (Mean of CFU (log) per g of feces) (n = 5 to 7 mice per group).
- (C) Fecal anaerobic bacteria counts (Schaedler plates) in mice at D50 (Mean of CFU (log) per g of feces) (n = 5 mice per group).

3.6 MS altered T and antigen presenting cells population in spleen

MS induced a splenomegaly (data not shown). A detailed analysis of splenocyte populations showed that MS increased CD4⁺ CD44^{high} CD62L^{low} activated T lymphocytes percentage (13.8±0.4% vs. 12.4±0.4%, Figure 7A) and decreased CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes percentage (1.07±0.08 vs. 1.35±0.06%, Figure 7B). MS not only altered splenic T cell populations but also antigen presenting cell populations. Indeed, MS increased CD11b⁺ cells percentage (1.8±0.11 vs. 1.1±0.23%), without modification of CD11c⁺ percentage (Figure 7C). Furthermore MS decreased CD40 expression on both CD11b⁺ and CD11c⁺ cells (2768±103 vs. 7155±1.589 and 2693±130 vs. 3238±163 mean of fluorescence intensity [MFI], respectively on CD11c⁺ and CD11b⁺) (Figure 7D).

3.7 MS altered cytokines secretions by splenocytes

Without stimulation, MS modified neither IFN γ nor TGF β secretion by splenocytes (Figures 8A and 8C) but decreased IL10 secretion by two fold (26.7±4.5 vs. 69.3±10.8 pg/ml, Figure 8B). Anti-CD3/CD28 antibodies stimulation induced IFN γ , IL10 and TGF β secretion in both controls and MS mice (Figure 8). However, anti-CD3/CD28-induced IFN γ and IL10 secretion was higher in MS mice compared to control. In contrary, MS induced a lower TGF β secretion following anti CD3/28 stimulation. We completed this study by performing a stimulation of splenocytes with an *E. coli* lysate. Splenocytes stimulation by *E. coli* lysate induced IFN γ , IL10 and TGF β secretions in both controls and MS mice. However, *E. coli* lysate-induced IL10 and TGF β secretion was lower in MS mice compared to control (Figure 8 B and

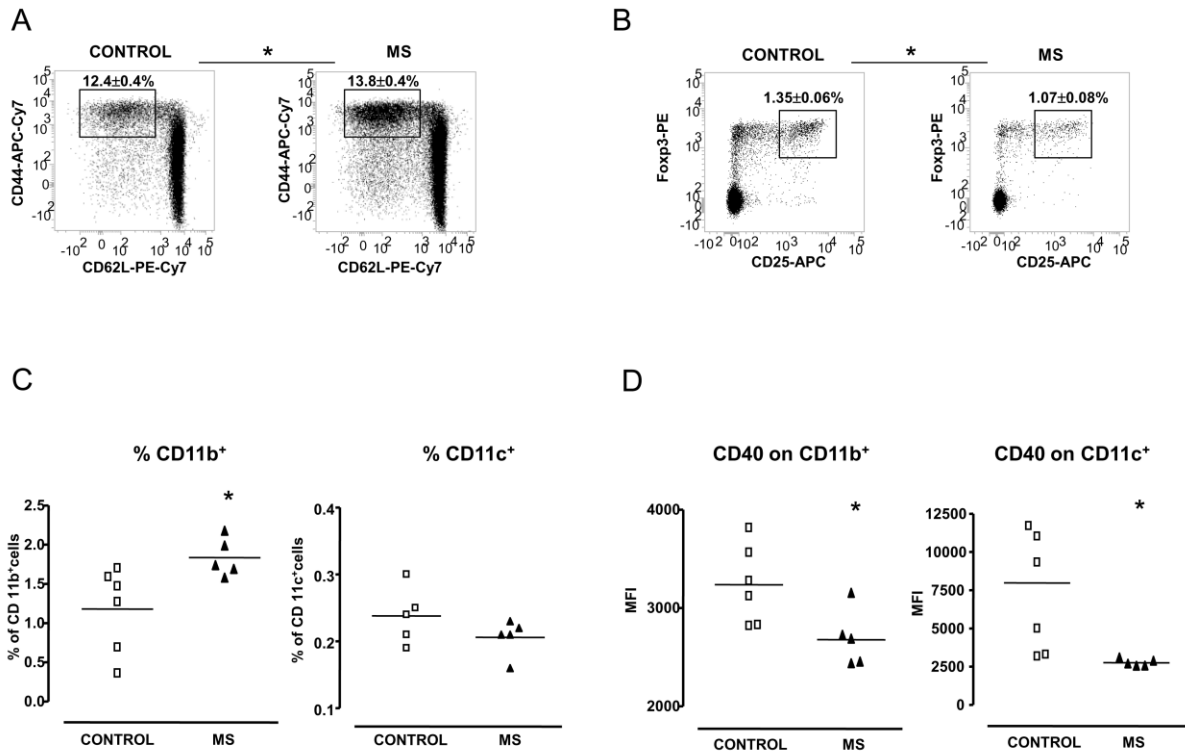


Figure 7 – T cells and antigens presenting cells (APC) populations in spleen.

(A) Flow cytometry analysis of CD4⁺ CD44^{high} CD62L^{low} expression in splenocytes (n = 9 to 14 mice per group).

(B) Flow cytometry analysis of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ expression in splenocytes (n = 4 to 5 mice per group).

(C) Flow cytometry analysis of CD11b⁺, CD11c⁺ expression in splenocytes (n = 5 to 6 mice per group).

(D) CD40 Mean of Fluorescence Intensity (MFI) on splenic CD11b⁺ and CD11c⁺ (n = 5 to 6 mice per group).

and C). No modification of *E. coli* lysate induced IFN γ secretion was observed between control and MS mice (Figure 8A).

4. Discussion

This study shows that early life stress like maternal separation, impaired host response toward representative commensal bacteria in young-adults. Indeed in young-adults, MS impaired innate intestinal barrier functions associated with a systemic inappropriate immune response toward colibacteria that might be extended to microbiota as bacteria share common antigenic motifs. As already described in rats (Barreau *et al.*, 2004), we showed that MS in mice increased intestinal permeability and visceral sensitivity to colorectal distension in young-adults. Increased permeability in response to MS in mice has already been described (Varghese *et al.*, 2006). However to our knowledge this is the first study demonstrating that MS in mice led to visceral hypersensitivity in young-adults. However, a study by Moloney *et al.* showed that maternal separation associated with unpredictable maternal stress triggered visceral sensitivity in 8

weeks old mice (Moloney *et al.*, 2012). Interestingly, both intestinal hyperpermeability and visceral hypersensitivity induced by MS at adulthood and observed herein are common features in IBS and IBD pathophysiology (Halpin and Ford, 2012; Piche *et al.*, 2009; Wyatt *et al.*, 1993) which is also linked to occurrence of early life adverse events (Hislop, 1979; Lowman *et al.*, 1987; Videlock *et al.*, 2009; Wegman and Stetler, 2009). It is noteworthy that psychiatric comorbidity such as depression or anxiety has also been observed in these patients suggesting dysfunctional brain-gut axis (Kovacs and Kovacs, 2007).

We further characterized the consequences of early life adverse events on others factors than intestinal epithelial permeability participating in maintenance of intestinal barrier integrity avoiding massive entry of luminal antigens in the *lamina propria*. Among them, antimicrobial proteins control microbiota composition and access to epithelium (Salzman and Bevins, 2013) and innate lymphoid cells contain immune response toward bacteria locally (Hepworth *et al.*, 2013; Sonnenberg *et al.*, 2012). MS decreased

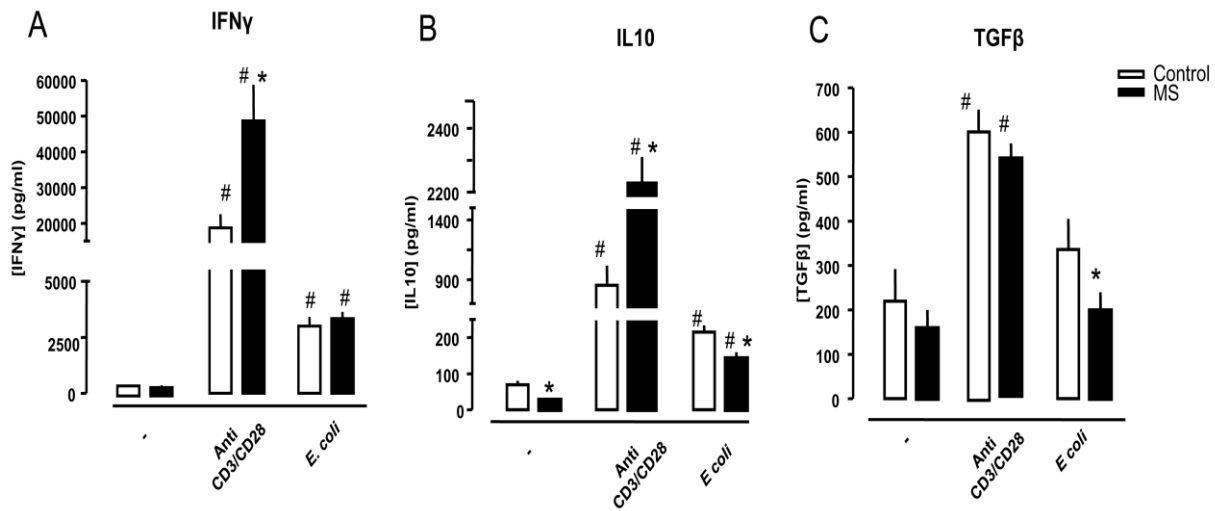


Figure 8 – Cytokines profile of splenocytes after *E. coli* or anti-CD3/anti-CD28 stimulation.

Representative histograms of IFN γ (A), IL10 (B), and TGF β (C) secretion by splenocytes in basal condition, after commensal *E. coli* lysate stimulation or anti-CD3/anti-CD28 stimulation in MS group (black histogram) and control group (white histogram) (n = 10 to 20 mice per group). # p<0.05 compared to basal conditions. * p<0.05 compared to control

lysozyme expression in Paneth cell and activity against bacterial peptidoglycan respectively in ileum and fecal content. This defect of antimicrobial peptides production by Paneth cells has been described in CD patients (HD5) (Wehkamp *et al.*, 2005) whereas to our knowledge no data are available on Paneth cells morphology or functionality in IBS patients. In addition, MS increased TNF α production in ileum that might trigger and/or maintain increase of intestinal permeability (Gitter *et al.*, 2000) and Paneth cell dysfunction (Van Hauwermeiren *et al.*, 2014). Furthermore, MS decreased ROR γ t⁺ MHC2⁺ ILC3 cells in *lamina propria*. Hepworth and al. demonstrated that a loss of ILC3 population in *lamina propria* was associated with an inappropriate adaptive immune cell response against commensal bacteria and low grade inflammation (Hepworth *et al.*, 2013). Altogether those results showed that early life stress impairs intestinal barrier functions in young-adults and mimics some of the defect observed in CD patients. Since intestinal barrier defects described in both IBS and IBD are associated with abnormal immune response against luminal content and particularly microbial antigens (Frehn *et al.*, 2014), we wondered if the alterations of the intestinal barrier observed in our model could lead to an inappropriate systemic immune response toward luminal content (bacterial and/or food antigens). Regarding luminal food antigens, no differences in plasma humoral response against either anti-hydro-soluble or hydrophilic (gliadin) food fractions were observed in young-adult mice submitted to MS.

As *E. coli* is one of the pioneer bacteria colonizing the intestinal tract (Tenaillon *et al.*, 2010) and is widely represented in the mice strain used in this study, we characterized a fecal *E. coli* isolate and studied Ig specificity against this bacteria. MS increased anti-*E. coli* IgG in plasma but not in small intestine lavage fluid. MS did not modify IgA response against *E. coli* lysate. This result is in accordance with the observed increase of antibodies toward bacterial antigens in IBS plasma samples (Cremon *et al.*, 2008; Schoepfer *et al.*, 2008) and CD patients (Landers *et al.*, 2002; Lodes *et al.*, 2004). Furthermore, stress during childhood was associated to higher antibody titers against cytomegalovirus (Dowd *et al.*, 2012), herpes simplex virus-1 (Shirtcliff *et al.*, 2009) and Epstein-Barr Virus (Slopen *et al.*, 2013). We wondered if this specific humoral response against bacterial antigens might be due to bacterial overgrowth, *E. coli* phylogenic switch and/or bacterial translocation. In the mice model used herein, which is naturally colonized at birth with a commensal *E. coli* B1 strain, MS had no effect on fecal *E. coli* load or phylogeny. More generally in young-adult mice, MS had no obvious consequences on fecal microbiota composition nor on generated fecal metabolites. In maternally separated young adult mice, we did not observe any bacterial translocation to mesenteric lymph node nor liver nor spleen (data not shown). However, as an increase in intestinal para- and trans-cellular permeability was observed, one can speculate that higher amount of bacterial antigens may cross the intestinal epithelium of MS mice and impact the

immune response. Further, in 6 days old pups submitted to MS a bacterial translocation was observed in the liver (data not shown). This is in agreement with the recent study of Moussaoui *et al.* showing that a bacterial translocation occurred in liver during a maternal separation episode in pups rats (Moussaoui *et al.*, 2014). Based on these results, we suggest that an early life occurring bacterial translocation induced by MS might also contribute to the inappropriate immune response recorded in adults. Interestingly, a defective intestinal barrier led to exacerbated humoral response toward colibacteria but not food antigens, in line with the recent observation reported by Frehn *et al.* in IBD, (Frehn *et al.*, 2014) which exclude a general loss of tolerance toward luminal content as observed in our model.

MS not only induced long lasting adverse effects on humoral but also on cellular response. Indeed, MS induced splenomegaly (data not shown) associated with an increase of activated T cells ($CD4^+CD44^{high}CD62L^{low}$) and a decrease of regulatory T cells (Treg) ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$). Those changes in T cell populations were associated with functional modifications as reflected by the increase in $IFN\gamma$ and IL10 secretion by splenocytes after anti CD3/CD28 stimulation. This increase in pro-inflammatory profile of T cells can be a consequence of bacterial translocation occurring during the neonatal period when maternal separation was applied. In agreement with this, PMA/Con-A stimulation of whole blood cell induced higher $IFN\gamma$ production in children exposed to high endotoxin levels early in life (Roiponen *et al.*, 2005). Furthermore, chronic environmental exposure to endotoxin is associated with a raise of type 1 T-lymphocyte development (Gereda *et al.*, 2000). In CD patients, a decrease of Treg (Chamouard *et al.*, 2009) and an increase of Th1 lymphocytes has been described (Chao *et al.*, 2014). Little is known on Treg population in IBS. Indeed, only one study has been identified in the literature reporting no modification of Treg on IBS patients (Holmen *et al.*, 2007) but regarding the heterogeneity of IBS population further investigations are needed. In IBS, anti-CD3/CD28 stimulation of PBMC also induced a pro-inflammatory profile as reflected by higher amount of IL1 β compared to controls without any modification in $IFN\gamma$ secretion (Ohman *et al.*, 2009a). In addition, a decrease in IL10 secretion in basal condition was observed in MS

mice reproducing the deficiency of IL10 and/or IL10 receptor described in both IBD (Glocker *et al.*, 2011) and IBS patients (Gonsalkorale *et al.*, 2003). Taken together these data point out that MS not only induced changes in T cell populations and functionality but also affected antigen presenting cells (APC) population. Interestingly, LPS stimulation of PBMC from IBS patients displayed lower frequency of $CD40^+$ cells (Ohman *et al.*, 2009b) and MS reproduced the decrease of CD40 MFI on both $CD11c^+$ and $CD11b^+$ cells after poly:IC and LPS stimulation. The defect in CD40 expression was associated with a defect of antigenic presentation. Indeed, whereas anti-CD3/CD28 stimulation of splenocytes increased $IFN\gamma$ secretion in MS mice, *E. coli* stimulation involving APC failed to reproduce this effect. Furthermore, *E. coli* lysate stimulation decreased IL10 and TGF β secretion in splenocytes of MS mice in accordance with the observed decrease of Treg frequency in these mice. This defect of antigenic presentation might explain the low grade inflammation observed despite a pro-inflammatory profile of T cells.

In conclusion, we demonstrated that early life stressful events had long lasting adverse effects on host response toward commensal colibacteria. Indeed, MS in mice impaired intestinal barrier functions including intestinal permeability, antimicrobial peptides efficiency and ILC3 population leading to an inappropriate systemic humoral response toward the commensal *E. coli* strain and impaired T cells and APC populations and functionalities. Exacerbated host response toward microbiota associated with a breach in intestinal barrier and immune response toward microbiota are common features of IBS and IBD. Altogether our results highlight that early life stressful events generate long lasting adverse effects on loss of the host tolerance toward gut commensal bacterial residents that might contribute to the occurrence of gastrointestinal diseases in susceptible individuals

REFERENCES

- Barbara, G., Cremon, C., Stanghellini, V., 2014. Inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: similarities and differences. *Curr Opin Gastroenterol* 30, 352-358.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., Bueno, L., 2004. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53, 501-506.
- Bonaz, B.L., Bernstein, C.N., 2013. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 144, 36-49.
- Chamouard, P., Monneaux, F., Richert, Z., Voegeli, A.C., Lavaux, T., Gaub, M.P., Baumann, R., Oudet, P., Muller, S., 2009. Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naive Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 54, 2084-2093.
- Chao, K., Zhang, S., Yao, J., He, Y., Chen, B., Zeng, Z., Zhong, B., Chen, M., 2014. Imbalances of CD4+ T-cell subgroups in Crohn's disease and their relationship with disease activity and prognosis. *J Gastroenterol Hepatol*.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555-4558.
- Cremon, C., Pallotti, F., Bacchilega, M., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Barbara, G., 2008. Antiflagellin antibodies suggest infective participation in irritable bowel syndrome pathogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2, 735-740.
- Dowd, J.B., Palermo, T.M., Aiello, A.E., 2012. Family poverty is associated with cytomegalovirus antibody titers in U.S. children. *Health Psychol* 31, 5-10.
- Drossman, D.A., 2006. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 130, 1377-1390.
- Frehn, L., Jansen, A., Bennek, E., Mandic, A.D., Temizel, I., Tischendorf, S., Verdier, J., Tacke, F., Streetz, K., Trautwein, C., Sellge, G., 2014. Distinct patterns of IgG and IgA against food and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases. *PLoS One* 9, e106750.
- Gereda, J.E., Leung, D.Y., Thatayatikom, A., Streib, J.E., Price, M.R., Klinnert, M.D., Liu, A.H., 2000. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 355, 1680-1683.
- Gitter, A.H., Bendfeldt, K., Schmitz, H., Schulzke, J.D., Bentzel, C.J., Fromm, M., 2000. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 915, 193-203.
- Glocker, E.O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N., Grimbacher, B., 2011. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci* 1246, 102-107.
- Gonsalkorale, W.M., Perrey, C., Pravica, V., Whorwell, P.J., Hutchinson, I.V., 2003. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut* 52, 91-93.
- Halpin, S.J., Ford, A.C., 2012. Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 107, 1474-1482.
- Hepworth, M.R., Monticelli, L.A., Fung, T.C., Ziegler, C.G., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A.R., Ma, H.L., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Wherry, E.J., Koni, P.A., Bushman, F.D., Elson, C.O., Eberl, G., Artis, D., Sonnenberg, G.F., 2013. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 498, 113-117.
- Hislop, I.G., 1979. Childhood deprivation: an antecedent of the irritable bowel syndrome. *Med J Aust* 1, 372-374.
- Holmen, N., Isaksson, S., Simren, M., Sjovall, H., Ohman, L., 2007. CD4+CD25+ regulatory T cells in irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil* 19, 119-125.
- Kovacs, Z., Kovacs, F., 2007. Depressive and anxiety symptoms, dysfunctional attitudes and social aspects in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Int J Psychiatry Med* 37, 245-255.
- Landers, C.J., Cohavy, O., Misra, R., Yang, H., Lin, Y.C., Braun, J., Targan, S.R., 2002. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 123, 689-699.
- Lodes, M.J., Cong, Y., Elson, C.O., Mohamath, R., Landers, C.J., Targan, S.R., Fort, M., Hershberg, R.M., 2004. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 113, 1296-1306.
- Lowman, B.C., Drossman, D.A., Cramer, E.M., McKee, D.C., 1987. Recollection of childhood events in adults with irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 9, 324-330.

- Mawdsley, J.E., Rampton, D.S., 2005. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 54, 1481-1491.
- Mayer, E.A., Naliboff, B.D., Chang, L., Coutinho, S.V., 2001. V. Stress and irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G519-524.
- Menard, S., Forster, V., Lotz, M., Gutle, D., Duerr, C.U., Gallo, R.L., Henriques-Normark, B., Putsep, K., Andersson, M., Glocker, E.O., Hornef, M.W., 2008. Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *J Exp Med* 205, 183-193.
- Moloney, R.D., O'Leary, O.F., Felice, D., Bettler, B., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2012. Early-life stress induces visceral hypersensitivity in mice. *Neurosci Lett* 512, 99-102.
- Moussaoui, N., Braniste, V., Ait-Belgnaoui, A., Gabanou, M., Sekkal, S., Olier, M., Theodorou, V., Martin, P.G., Houdeau, E., 2014. Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial barrier defect in maternal-deprived rats. *PLoS One* 9, e88382.
- Mshvildadze, M., Neu, J., 2010. The infant intestinal microbiome: friend or foe? *Early Hum Dev* 86 Suppl 1, 67-71.
- O'Mahony, S.M., Hyland, N.P., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 71-88.
- Ohman, L., Isaksson, S., Lindmark, A.C., Posserud, I., Stotzer, P.O., Strid, H., Sjovall, H., Simren, M., 2009a. T-cell activation in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 104, 1205-1212.
- Ohman, L., Lindmark, A.C., Isaksson, S., Posserud, I., Strid, H., Sjovall, H., Simren, M., 2009b. B-cell activation in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Neurogastroenterol Motil* 21, 644-650, e627.
- Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J.L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galimiche, J.P., Neunlist, M., 2009. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 58, 196-201.
- Renz, H., Brandtzaeg, P., Hornef, M., 2012. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 12, 9-23.
- Ringel, Y., Drossman, D.A., 2001. Psychosocial aspects of Crohn's disease. *Surg Clin North Am* 81, 231-252, x.
- Roponen, M., Hyvarinen, A., Hirvonen, M.R., Keski-Nisula, L., Pekkanen, J., 2005. Change in IFN-gamma-producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *J Allergy Clin Immunol* 116, 1048-1052.
- Salzman, N.H., Bevins, C.L., 2013. Dysbiosis--a consequence of Paneth cell dysfunction. *Semin Immunol* 25, 334-341.
- Schoepfer, A.M., Schaffer, T., Seibold-Schmid, B., Muller, S., Seibold, F., 2008. Antibodies to flagellin indicate reactivity to bacterial antigens in IBS patients. *Neurogastroenterol Motil* 20, 1110-1118.
- Selye, H., 1936. Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138.
- Shirtcliff, E.A., Coe, C.L., Pollak, S.D., 2009. Early childhood stress is associated with elevated antibody levels to herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2963-2967.
- Slopen, N., McLaughlin, K.A., Dunn, E.C., Koenen, K.C., 2013. Childhood adversity and cell-mediated immunity in young adulthood: does type and timing matter? *Brain Behav Immun* 28, 63-71.
- Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Alenghat, T., Fung, T.C., Hutnick, N.A., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, A.M., Tardif, M.R., Sathaliyawala, T., Kubota, M., Farber, D.L., Collman, R.G., Shaked, A., Fouser, L.A., Weiner, D.B., Tessier, P.A., Friedman, J.R., Kiyono, H., Bushman, F.D., Chang, K.M., Artis, D., 2012. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 336, 1321-1325.
- Spiller, R., Lam, C., 2011. The shifting interface between IBS and IBD. *Curr Opin Pharmacol* 11, 586-592.
- enaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8, 207-217.
- van de Pavert, S.A., Mebius, R.E., 2010. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 10, 664-674.
- Van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R.E., Grine, L., Lodens, S., Van Wonterghem, E., De Rycke, R., De Geest, N., Hassan, B., Libert, C., 2014. TNFR1-induced lethal inflammation is mediated by goblet and Paneth cell dysfunction. *Mucosal Immunol*.

Varghese, A.K., Verdu, E.F., Bercik, P., Khan, W.I., Blennerhassett, P.A., Szechtman, H., Collins, S.M., 2006. Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. *Gastroenterology* 130, 1743-1753.

Vidlock, E.J., Adeyemo, M., Licudine, A., Hirano, M., Ohning, G., Mayer, M., Mayer, E.A., Chang, L., 2009. Childhood trauma is associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 137, 1954-1962.

Wegman, H.L., Stetler, C., 2009. A meta-analytic review of the effects of childhood abuse on medical outcomes in adulthood. *Psychosom Med* 71, 805-812.

Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R.W., Chu, H., Lima, H., Jr., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E.F., Bevins, C.L., 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18129-18134.

Wyatt, J., Vogelsang, H., Hubl, W., Waldhoer, T., Lochs, H., 1993. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 341, 1437-1439.

Supplemental Methods

Corticosterone measurement

Corticosterone concentrations in plasma were assayed using commercial ELISA kits (AC-14F1, IDS, England). Data were expressed as ng per ml of plasma.

¹H NMR metabolomics and data analysis

Fecal extracts for NMR spectroscopy were prepared by mixing 50 mg of fecal samples with 500 μ L of phosphate buffer (0.2 M, pH = 7.4) containing 90% D₂O, 1% (w/v) of sodium 3-(trimethylsilyl) propionate (TSP), 0.3 mM NaN₃. After vortex mixing, the samples were subjected to a freeze-thaw cycle in liquid nitrogen and subsequently homogenized with a tissue lyser (MP Biomedicals, Illkirch Graffenstaden, France) at 20 Hz during 40 s, followed by centrifugation at 10000g for 10 min at 4 °C. Supernatants were collected, and the remaining pellet was further extracted once as described above. Supernatants obtained from two runs of extraction were combined and centrifuged at 10000g for 10 min at 4 °C. A total

of 600 μ L of supernatant was transferred into NMR tubes with an outer diameter of 5 mm pending NMR analysis.

All ¹H NMR spectra were obtained on a Bruker DRX-600-Avance NMR spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 600.13 MHz for ¹H resonance frequency using an inverse detection 5 mm ¹H-¹³C-¹⁵N cryoprobe attached to a cryoplatfom (the preamplifier cooling unit). The ¹H NMR spectra were acquired at 300K using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo pulse sequence with water presaturation. A total of 128 transients were collected into 64,000 data points using a spectral width of 20 ppm, a relaxation delay of 2 sec, and an acquisition time of 2.72 sec. Metabolites were assigned using previously published data (Zhao et al., 2012) and additional two-dimensional NMR experiments on selected samples.

Data were analyzed by applying an exponential window function with a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. The resultant spectra were phased, baseline corrected and calibrated to TSP (δ 0.00) manually using Mnova (Mestrelab Research S.L.). The spectra were subsequently imported into MatLab (R2014a, The MathsWorks inc.). All data were analyzed on full-resolution spectra (33 600 data points). The region containing the water resonance (δ 4.6-5.2) was removed, spectra were normalized to the probabilistic quotient (Dieterle et al., 2006) and aligned using an alignment function (Veselkov et al., 2009). Data were mean-centered and scaled to unit variance prior to analysis using principal component analysis (PCA).

Gut Low-Density Array (GULDA) analysis of microbiome from C3H/HeN mice fecal samples

Total community DNA was extracted from fecal samples using the ZR Fecal DNA MiniPrep kit (Zymo research, Irvine, USA). The DNA concentration was determined using the DropSense96 Trinean, Gentbrugge, Belgium) and adjusted to 2 ng/ μ L prior to use as a template in qPCR. Change in the abundance of 19 different bacterial 16S rRNA gene targets was obtained using the GULDA platform as previously described (Bergstrom et al., 2012; Bergstrom et al., 2014). According to this method, the universal bacterial primer set U1 was included as the reference gene (four

technical replicas of each amplification). Each 384-well PCR plate (MicroAmp optical reaction plates, Applied Biosystems, Naerum, Denmark) accommodated simultaneous analysis of 4 DNA samples per group (control versus stressed) in duplicate. Quantitative real-time PCR was performed on an ViiA7 from Applied Biosystems in a total volume of 5 μ l containing 2,5 μ l 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems), 0,18 μ l of each primer (10 μ M), 1 μ l template DNA, and 1,14 μ l nuclease-free water. Liquid handling was performed with a Bravo platform (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Following the previously described thermocycling program, the raw fluorescence data recorded by the ViiA7 RUO Software were exported to the LinRegPCR program to perform baseline correction, calculate the mean PCR efficiency per amplicon group and calculate the initial quantities N_0 (arbitrary fluorescence units) for each amplicon. The relative abundance of the 19 specific amplicon groups were obtained by normalization to the N_0 value obtained for the universal bacterial amplicon group determined in the same array (N_0 , specific/ N_0 ,universal), log₁₀ transformed and used as input for PCA using Matlab. A limit of detection of 10^{-6} (N_0 , specific/ N_0 , universal) was set and samples below this limit were set to $5 \cdot 10^{-6}$.

Humoral response in Small Intestinal Lavage Fluids (SILF)

SILF were obtained flushing small intestine with cold PBS. Supernatants were filtered with a cut off of 40 μ m. Immunoglobulins (Ig) concentration was performed on 10kDa cut off tube (Amicon Ultra 15, Millipore, Dutcher, Brumath, France). Fraction >10kDa was filtered in 0,22 μ m and sodium azide was added at a final concentration of 0,1%. SILF were kept at +4°C.

References:

Bergstrom, A., Licht, T.R., Wilcks, A., Andersen, J.B., Schmidt, L.R., Gronlund, H.A., Vigsnaes, L.K., Michaelsen, K.F., Bahl, M.I., 2012. Introducing GUT low-density array (GULDA): a validated approach for qPCR-based intestinal microbial community analysis. *FEMS Microbiol Lett* 337, 38-47.

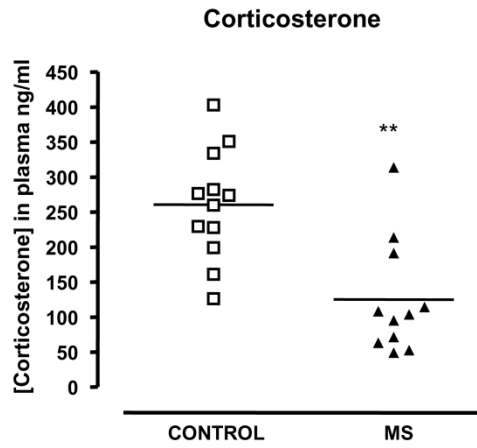
Bergstrom, A., Skov, T.H., Bahl, M.I., Roager, H.M., Christensen, L.B., Ejlerskov, K.T., Molgaard, C., Michaelsen, K.F., Licht, T.R., 2014. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl Environ Microbiol* 80, 2889-2900.

Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., Senn, H., 2006. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal Chem* 78, 4281-4290.

Veselkov, K.A., Lindon, J.C., Ebbels, T.M., Crockford, D., Volynkin, V.V., Holmes, E., Davies, D.B., Nicholson, J.K., 2009. Recursive segment-wise peak alignment of biological (1)h NMR spectra for improved metabolic biomarker recovery. *Anal Chem* 81, 56-66.

Zhao, X.J., Hao, F., Huang, C., Rantalainen, M., Lei, H., Tang, H., Wang, Y., 2012. Systems responses of rats to mequindox revealed by metabolic and transcriptomic profiling. *J Proteome Res* 11, 4712-4721.

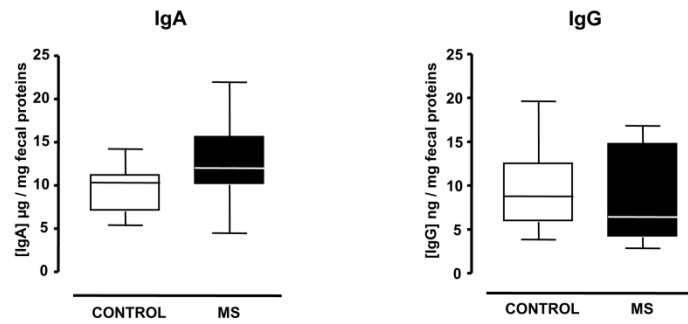
Supplemental figure 1



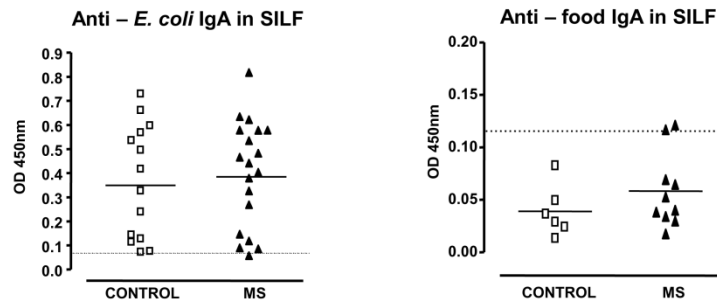
Supplemental Figure 1: Corticosterone concentrations in plasma of young adult mice submitted or not to MS (n= 11 to 12 mice per group).

Supplemental figure 2

A

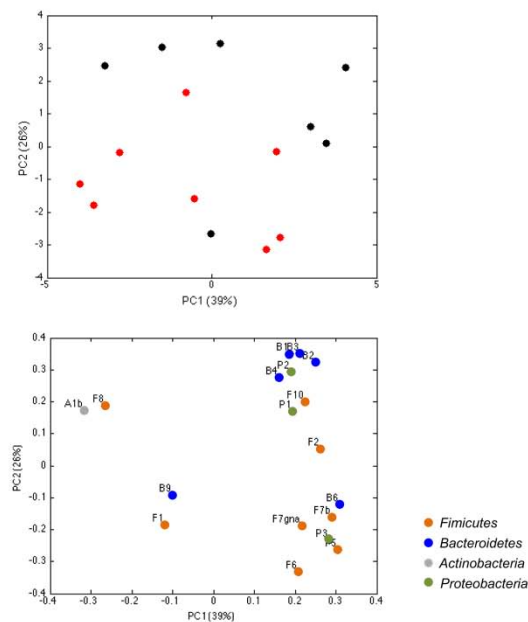


B



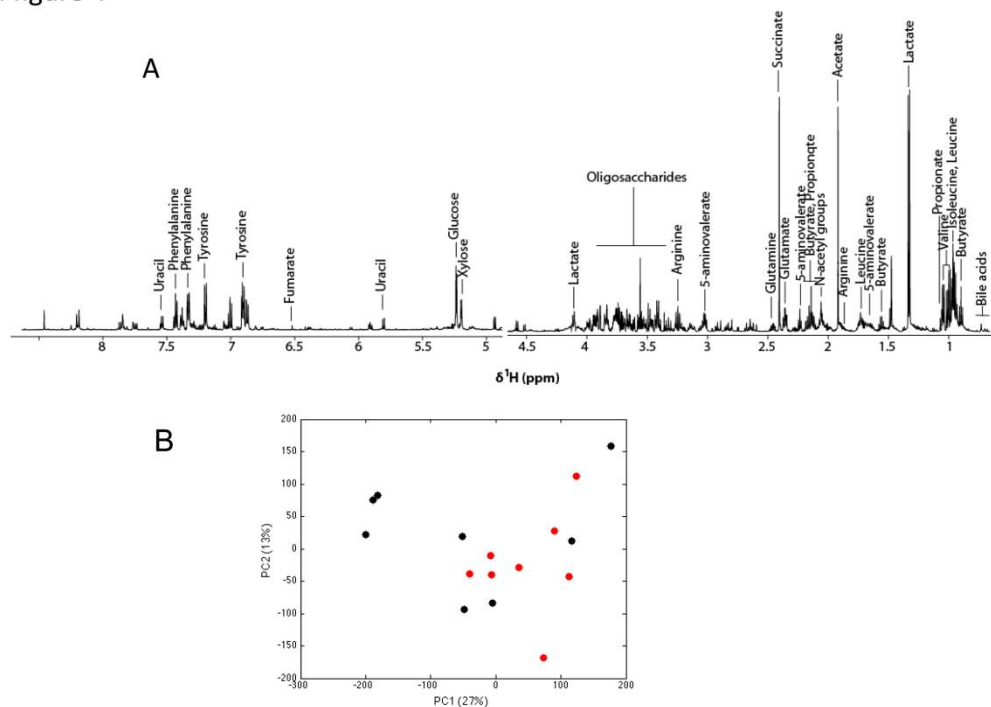
Supplemental Figure 2: Intestinal Ig concentrations and specificity against luminal contents. (A) Fecal IgA and IgG concentrations measured by ELISA (IgA and IgG: n = 8 mice per group). The lower and upper lines of the boxes are the 25th and the 75th percentiles, and the lines in the boxes are the median (the 50th percentile). The whiskers extend to the highest and lowest values. (B) IgA specificity against *E. coli* and food lysate assessed by ELISA after normalizing IgA concentration in Small Intestinal Lavage Fluids (SILF) (n = 14 to 19 mice per group) Horizontal dashed lines indicate the threshold corresponding to 2 blanks.

Supplemental figure 3



Supplemental Figure 3: Principal component analysis (PCA) of the fecal microbiota in stressed (red) and control (black) animals using qPCR (upper plot: scores (individuals), lower plot: loadings (bacterial 16S rRNA gene targets)). Bacterial targets were as follows: Firmicutes (F1), *Lactobacillus* spp. (F2), *Clostridium butyricum* (F5), *Clostridium leptum* group (F6), *C. coccoides-Eubacterium rectale* group (F7), *Ruminococcus gnavus* (F7gna), *Eubacterium hallii* (F8), *Enterococcus* spp. (F10), Bacteroidetes (B1), Bacteroides-Prevotella group (B2), Bacteroides spp. (B3), *B. fragilis* group (B4), Bacteroides thetaiotaomicron (B6), Prevotella spp. (B9), Bifidobacterium spp. (A1b), Enterobacteriaceae (P1), *Escherichia coli* (P2) and *Desulfovibrio* spp. (P3). (n=7-8 mice per group).

Supplemental figure 4



Supplemental Figure 4: (A) Typical 600 MHz ^1H NMR spectra of the fecal extracts from a control animal. (B) PCA of the fecal microbiota in stressed (red) and control (black) animals using ^1H -NMR metabolomics as described in the supplemental methods.

Résultat II:

Le stress de séparation maternelle diminue l'activité antimicrobienne entérique et entraîne une surpopulation bactérienne intestinale responsable de l'hypersensibilité viscérale chez la souris jeune adulte

A. Riba, M. Olier, S. Lacroix-Lamandé, C. Lencina, V. Bacquié, C. Harkat, M. Gillet, M. Baron, C. Sommer, V. Mallet, C. Salvador-Cartier, F. Laurent, V. Théodorou, S. Ménard.

La survenue d'événements traumatisants dans la petite enfance est associée à l'apparition et/ou l'entretien de troubles intestinaux fonctionnels ou organiques à l'âge adulte. La période périnatale est caractérisée par une immaturité de l'épithélium intestinal dont l'absence de cellules de Paneth avant la deuxième semaine de vie chez la souris. Les peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth participent à la protection de l'épithélium intestinal et contribuent à l'homéostasie intestinale. Dans ce travail, nous avons analysé les conséquences d'un stress de séparation maternelle (SSM) sur l'activité antimicrobienne entérique ainsi que ses conséquences sur l'homéostasie intestinale, la sensibilité viscérale et la réponse humorale systémique vis-à-vis du microbiote commensale chez la souris femelle jeune adulte.

Le SSM diminue l'expression du lysozyme au niveau des cellules de Paneth et son activité vis à vis du lysozyme au niveau fécal. De plus, le SSM diminue l'activité antimicrobienne fécale contre une bactérie modèle *Bacillus megaterium* 11. Ce défaut d'activité antimicrobienne entérique est associé à une surpopulation iléale et fécale d'*E. coli* et une réponse IgG et IgA plasmatique dirigée contre un lysat d'*E. coli* commensal. De plus, le SSM induit une augmentation de la concentration iléale en IFN γ et TNF α et une hypersensibilité viscérale. . Afin de mettre en évidence un éventuel lien entre surpopulation bactérienne intestinale et hypersensibilité viscérale, un gavage quotidien avec 10^9 *E. coli* pendant 15 jours a été réalisé. Ce gavage reproduit la surpopulation bactérienne intestinale associée à une réponse humorale plasmatique contre le microbiote et conduit à l'augmentation de la sensibilité viscérale.

Ces résultats indiquent que la survenue d'évènements stressants en période périnatale altère la fonctionnalité des cellules de Paneth, qui pourrait conduire à une surpopulation bactérienne intestinale responsable de l'hypersensibilité viscérale chez la souris femelle jeune adulte.

Bien que ces résultats soient présentés sous forme d'article, ce travail est loin d'être abouti et certaines expérimentations sont en cours de réalisation afin de compléter cette étude. En effet, l'objectif est maintenant de démontrer que le défaut de cellules de Paneth induit par

le SSM est à l'origine de la pullulation bactérienne observée dans ce modèle. Dans cette optique, nous envisageons d'analyser le microbiote, la sensibilité viscérale et la réponse humorale systémique vis-à-vis d'*E. coli* chez des animaux présentant un défaut primaire d'activité antimicrobienne. Deux modèles de souris ont été retenus : les souris invalidées pour le gène SOX9 ou pour le gène Math1 au niveau de l'intestin, tous deux impliqués dans la différenciation des cellules de Paneth. Les modalités et limites de ces modèles sont discutées dans la partie III de la Discussion Générale.

Title: Early life stressful events impaired enteric antimicrobial activity associated with commensal *E. coli* overgrowth responsible for visceral hypersensitivity in adult mice

Article in progress

A. Riba¹, M. Olier¹, S. Lacroix-Lamandé², C. Lencina¹, V. Bacquié¹, C. Harkat¹, M. Gillet¹, M. Baron¹, C. Sommer¹, V. Mallet¹, C. Salvador-Cartier¹, F. Laurent², V. Théodorou¹, S. Ménard¹.

Author affiliation:

¹ Neuro-Gastroenterology and Nutrition, UMR 1331 INRA Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France

² Equipe Apicomplexes et Immunité Mucosale (AIM), UMR 1282 INRA/Université-Infectiologie et Santé Publique (ISP), Centre INRA Val de Loire, Nouzilly, FRANCE

Corresponding author: Sandrine Ménard, Neuro-Gastroenterology & Nutrition, INRA, 180 Chemin de Tournefeuille, BP93173, 31027 Toulouse cedex 3, France. Phone: +33 561 28 57 59; email:sandrine.menard@toulouse.inra.fr

Short title: Maternal separation disrupts antimicrobial activity permitting bacterial overgrowth inducing visceral sensitivity.

Abbreviations: AMA, antimicrobial activity; AMP, antimicrobial peptides; FSS, Fluorescein Sodium Salt; GALT, Gut Associated Lymphoid Tissue; HRP, Horseradish Peroxidase; IBD, Inflammatory Bowel Disease; IBS, Irritable Bowel Syndrome; Ig, Immunoglobulin; MS, Maternal Separation; SIBO, Small Intestinal Bacterial Overgrowth.

Abstract

Occurrence of early life stressful events induces long lasting alterations of intestinal homeostasis associated with susceptibility to develop functional or organic gastrointestinal disorders at adulthood. Neonatal period is characterized by immature intestinal mucosa. Among others, Paneth cells and significant expression of enteric antimicrobial peptides appear only 2 weeks after birth. Paneth cell-derived antimicrobial peptides are known to ensure antibacterial protection and maintenance of intestinal homeostasis. In this study, we analyzed the consequences of maternal separation (MS) in mice on Paneth cells development and enteric antimicrobial activity and their consequences on intestinal homeostasis, systemic immune response toward microbiota and visceral sensitivity. In 50-days old female mice, MS decreased enteric antimicrobial activity without altering the number of Paneth cells. This decrease of Paneth cells function was associated with an increase of IFN γ in ileum attesting of local inflammation. Moreover, MS induced *E. coli* overgrowth associated with an increase of anti-*E. coli* IgG and IgA and visceral sensitivity in response to colorectal distension. In order to decipher whether or not those alterations were a consequence of *E. coli* overgrowth, adult mice were force fed daily with 10^9 commensal *E. coli* for 15 days. *E. coli* gavage reproduced intestinal *E. coli* overgrowth as well as anti-*E. coli* IgG and IgA increase and visceral hypersensitivity without modification of enteric antimicrobial defense. Altogether our results highlighted that early life stressful events impair the development of antimicrobial defenses and promote commensal bacterial overgrowth leading to abnormal response toward microbiota and visceral hypersensitivity.

Keywords: Maternal separation, antimicrobial activity, *E. coli* overgrowth, humoral response toward microbiota, visceral sensitivity

Introduction

Enteric antimicrobial peptides represent a first line of defense against commensal microbiota. The importance of Paneth cells-derived antimicrobial peptides has been highlighted in several mouse models. Transgenic mice expressing human alpha defensin are protected from enteric infection (Salzman et al., 2003) whereas mice deficient in Matrix Metallo-Proteinase (MMP) 7 which are unable to activate antimicrobial peptides via proteolytic cleavage are more susceptible to Salmonella infection (Wilson et al., 1999). Deficiency in enteric antimicrobial peptides is not only associated with susceptibility to enteric infection but also to microbiota dysbiosis highlighting the critical role of Paneth cells-derived antimicrobial peptides in intestinal homeostasis.

Crohn disease is an inflammatory bowel disease involving genetic and environmental factors that is characterized by a defect of intestinal barrier associated with a rupture of tolerance toward intestinal microbiota. A defect of Paneth cells has been observed in Crohn disease (Wehkamp et al., 2005). Interestingly, various genes associated with CD susceptibility affect Paneth cell functions among them, genes involved in autophagy like *ATG16L1* and *IRGM* (Klionsky, 2009) as well as in bacterial recognition like NOD2 (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Indeed, the role of Paneth cells function deficiency has been suggested to be one of causes of CD (Cadwell et al., 2008; Kaser et al., 2008). Previous research linked the polymorphism of Nod2 observed in CD patients with the decrease of expression of α defensins (Bevins et al., 2009; Wehkamp et al., 2004). Moreover, Nod2 $-/-$ mice had reduced mRNA expression of α defensins (Kobayashi et al., 2005). However, a recent study demonstrated that the antimicrobial function of Paneth cells is independent of Nod2 (Shanahan et al., 2014). Psychological stress is now a well admitted environmental factor contributing to IBD (Bonaz and Bernstein, 2013; Mawdsley and Rampton, 2005) and particularly to Crohn's disease (Ringel and Drossman, 2001). Early life stress events draw particular

attention since they were associated with IBD (Wegman and Stetler, 2009). At birth, intestinal barrier and associated immune system are immature and some bacteria such as *Enterobacteriaceae* including *Escherichia coli* (*E. coli*) (Tenailon et al., 2010), *Lactobacillus spp.* and *Streptococcus spp.* (Mshvildadze and Neu, 2010) colonized the host. Microbiota colonization participate to intestinal maturation and establishment of an appropriate host microbiota relationship (Renz et al., 2012). Neonatal period is a critical and crucial window in the establishment of host-microbiota interactions. In mice Paneth cells appear only 2 weeks after birth accompanying the development of crypts (Bry et al., 1994; Darmoul et al., 1997; van Es et al., 2005).

In this study, we wonder if occurrence of adverse stressful events in neonates could impair enteric antimicrobial response impairing intestinal homeostasis. To answer this question, we used a well-studied model of early stress in rodent, i.e. maternal separation (O'Mahony et al., 2011) and analyzed its consequences on Paneth cell-derived antimicrobial peptides response, intestinal barrier functions and immune response toward luminal content. Indeed, we hypothesized that if early stressful events impair Paneth cell functions it might lead to intestinal barrier dysfunctions and subsequently to loss of immune tolerance toward microbiota as observed in CD patients. In this study, we use *E. coli* lysate to address immune response toward microbial content as representative commensal bacteria of C3H/HeN young adult mice microbiota.

Material and Methods

All experimental protocols described in this study were approved by the local Animal Care Use Committee (Comité d'Ethique de Pharmacologie-Toxicologie de Toulouse - Midi-Pyrénées (Registered as N°86 at the Ministry of Research and Higher Education, France)) (N° 0029/SMVT, Midi Pyrénées, France) and conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE.

Animals

To minimize cannibalism induced by perinatal stress, we used C3H/HeN mice known to be excellent breeder. Nulliparous female C3H/HeN mice (Janvier, Roubaix, France) were mated with male for 5 days and then individually isolated. They were kept at a constant temperature (22±1°C) and maintained on a 12:12h light/dark cycle (light on at 7h30 am). Food (Harlan, Gannat, France) and water were available *ad libitum*. After delivery (day D1), litters were homogenized to 6±1 pups. Maternal separation (MS) was performed daily for three consecutive hours (from 9 am to 12 pm). Pups were separated from their dam and the rest of the litter and kept in controlled temperature thanks to a heat lamp (27±1°C). MS was repeated for 10 working days WE excluded between D2 and D15. Control pups were left with their dam. From D15 to D21, all pups were maintained with their dam. Weaning was performed on D21, siblings were sex matched. All experiments were performed on D45 female. A monitoring of the weight was performed every week between D2 and D45 (Table 1).

Antimicrobial peptides analysis

Lysozyme expression in Paneth cells

Ileal samples were fixed in 4% formol, dehydrated through graded ethanol and embedded in paraffin. Sections (5µm) were rehydrated and submerged in antigen retrieval solution (citrate buffer, 10mM, pH6, 99°C) for 30 minutes. After incubation in blocking solution (PBS 0,01% Tween 20, 1% bovine serum albumin and 2% donkey normal serum) for 15 min, sections were incubated with rabbit anti-mouse lysozyme

antibody (1/100, overnight, +4°C) (Abcam, Paris, France) followed by a Alexa fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (0.75µg/ml, 1h, Room temperature) (Jackson, Suffolk sections were incubated with Alexa fluor 594-conjugated Wheat Germ Agglutinin (WGA) (10µg/ml, 45 min) (Invitrogen, Life Technology, Cergy Pontoise, France). Sections were mounted in Prolong gold antifade mounting medium with DAPI (Invitrogen) and examined under a Nikon 90i fluorescence microscope. Lysozyme fluorescence intensity in Paneth cells were quantified employing the software Nis-Elements Ar (Nikon, Champigny sur Marne, France) and results were expressed in fluorescence intensity per cell. Analyses were done on five crypts per animal and on five animals from each group.

Supernatant preparation

Feces were collected and frozen at -80°C. Fecal proteins were mechanically extracted after rehydration in 500µl of PBS. After 10 minutes of centrifugation at 1600g, supernatants were sterilized with a 0.22 µm filter. Fecal proteins concentration was measured using BCA protein Assay kit, Uptima (Interchim, Montluçon, France). Supernatants were frozen at -80°C.

Lysozyme activity in fecal content

Fecal contents were collected and frozen at -80°C. Activity of lysozyme against the peptidoglycan was determined using the EnzChek® Lysozyme Assay Kit (Molecular probes, life technology, St Aubin, France).

EXPERIMENTAL DESIGN

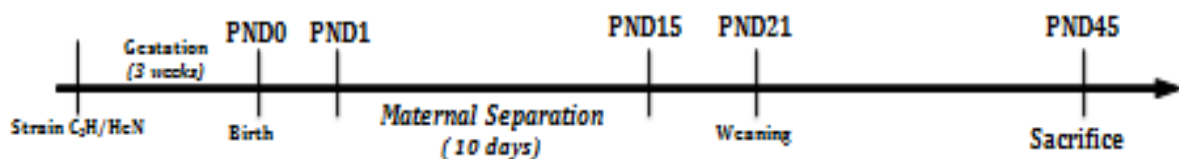


Table 1 – Experimental protocol of Maternal Separation (MS).

Antimicrobial activity of ileal and fecal content against Bm11

Antibacterial activity of fecal supernatant were tested against Bm11 using a microdilution assay in 10 mM sodium phosphate buffer supplemented with 1% of Luria-Bertani broth. 10^5 Bm11 grown to mid-logarithmic phase were coincubated in 50, 100 or 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of fecal proteins. The number of viable bacteria (CFU) was analyzed by serial dilution after 2h of incubation at 37°C.

Monitoring and characterization of commensal E. coli populations i.e. colibiota, aerobic and anaerobic bacteria populations

Feces from male C3H/HeN mice were collected and homogenized in PBS. Colibiota (i.e. *E. coli* populations) was quantified by plating tenfold serial dilutions of feces homogenates on selective ChromID™ Coli media (Biomérieux, Marcy L'Étoile, France) and aerobic and anaerobic bacteria was quantified on selective PCA (Plate Count Agar) plates (Biomérieux, Marcy L'Étoile, France) and selective Schaedler 5% sheep blood plates (Biomérieux, Marcy L'Étoile, France) respectively. Plates were incubated at 37°C and the number of CFU (Colony Forming Units) was enumerated after 24 hours. Colibiota and bacteria quantification was expressed in log (CFU / g of feces). Colibiota was further characterized by determining phylogenetic group of isolates using the Clermont *et al.* method (Clermont *et al.*, 2000) and performing detection of potential virulence genes. To this aim, DNA from five *E. coli* isolates from each mouse was extracted from overnight cultures using NaOH, and subjected to multiplex and uniplex PCR sets. PCR were performed on bacterial lysates (approximately 100 ng of genomic DNA) added with EconoTaq® Plus green 2X master mix (EUROMEDEX, Strasbourg, France) and 20 pmol of each primer. Primer pairs sets used for determination of the phylogenetic group were described by Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2000), PCR was performed using CFX96 (Biorad). PCR products were loaded on 2% agarose gel with TAE and Clear Sight DNA Stain (Invitrogen). Serotyping and analyze of virulence factor (toxins, adhesins, intimins)

was performed to characterized commensal *E. coli* used for assessing humoral and cellular response. Those analyses were realized by the reference laboratory for *E. coli* in the University of Montréal, Canada and identified the *E. coli* as an O18 serotype devoid of any virulence factors.

Commensal E. coli lysate for humoral response

Pellet of an overnight culture of one of the *E. coli* isolates previously characterized was washed in 0,9% NaCl, suspended in 1 ml of distilled water, sonicated for 1 hour, frozen in liquid nitrogen, melt and centrifuged. Supernatant was filtered in 0,22 μm and conserved at -20°C as the *E. coli* lysate used for humoral response. Lysate protein concentration was measured using BC Assay kit, Uptima (Interchim, Montluçon, France).

Humoral response in plasma

Intracardiac blood was recovered with heparined needle and plasma was kept at -80°C.

Immunoglobulin specificity against E. coli lysate

Maxisorp 96-wells plates (NUNC) were coated overnight at +4°C with 50 μl of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *E. coli* lysate. After blocking with PBS 5%-FCS, plates were incubated for 2 hours at 37°C with either a) 50 μl of plasma samples diluted with PBS 5%-FCS to adjust IgG concentration to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or b) 50 μl of plasma samples diluted with PBS 5%-FCS to adjust IgA concentration to 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (SoutherBiotech) or goat anti-mouse IgA (SIGMA) was incubated for 2 hours at 37°C and revealed as above-mentioned. Results were expressed as optical density (OD) at 450 nm and were considered positive if above two blanks (threshold, indicated by a grey dashed line in figures).

Visceral sensitivity

Mice were equipped with 3 NiCr wire electrodes implanted into the abdominal external oblique muscle at D42. The mvoelectrical activity was recorded on an

electromyograph (EMG). EMG recordings began 3 days after surgery. Mice were placed in polypropylene tunnels. A balloon consisting of an arterial embolectomy catheter (Fogarty, Edwards Laboratories, Santa Ana, CA) was introduced into the colorectum at 2.5 cm from the anus and fixed at the base of the tail. The balloon was progressively inflated during 15 seconds by step of 0.02 ml, from 0.02 to 0.1 ml, with 10 minutes wait between each step. Results were expressed as mV.s.

Forced feeding of commensal E. coli streptomycin resistant

Preparation of commensal E. coli streptomycin resistant

Pellet of previously characterized *E. coli* overnight culture was washed with 1 ml of PBS, plated on LB 1% agar supplemented with 50µg/ml streptomycin. Growing colonies were picked in parallel on LB 1% agar plate, LB 1% agar 50µg/ml streptomycin and LB agar 1% 500µg/ml streptomycin. Colony able to growth on three conditions was isolated and frozen at -80°C.

Gavage of adult female mice with streptomycin resistant commensal E. coli

Nulliparous female C3H/HeN mice (Janvier, Roubaix, France) 28 days old were kept five animals per cage at a constant temperature (22±1°C) and maintained on a 12:12h light/dark cycle (light on at 7h30 am). Food (Harlan, Gannat, France) and water were available *ad libitum*. Animals were randomized in two groups: vehicle, which received 100µl of bicarbonate buffer *per os* per day, *E. coli* gavage, which received 10⁹ CFU of streptomycin resistant *E. coli* in 100 µl of bicarbonate buffer *per os* per day. Animals were analyzed after fifteen day of daily gavage (Table 2).

Data analysis and Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Results were expressed as means ± SEM. Multiple groups were compared by Bonferroni posttest after a significant two-way ANOVA. Single comparisons were performed by Mann Whitney posttest after a significant t test. Differences were considered significant for P<0.05.

EXPERIMENTAL DESIGN

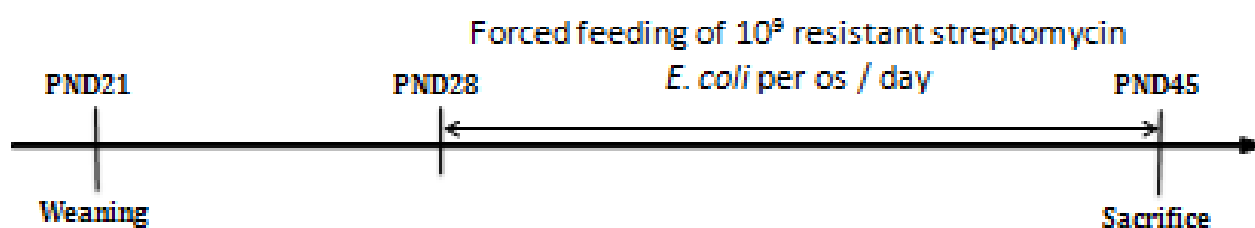


Table 2 – Experimental protocol of forced gavage of *E. coli*.

Results

MS decreased impaired Paneth cells functions.

MS decreased ileal expression of lysozyme by Paneth cells without modification of the number of crypts producing lysozyme (199 ± 29 vs. 354 ± 24 ($\times 10^3$) fluorescence intensity/cell, Figure 1 A, B and C). Moreover, fecal anti-peptidoglycan activity of lysozyme was decreased in MS mice compared to controls (feces: 133 ± 19 vs. 195 ± 23 U/mg of fecal proteins, Figure 1D). MS also decreased antimicrobial activity of fecal supernatant feces against *Bacillus megaterium* 11 for the three tested concentrations of fecal proteins (at $50 \mu\text{g/ml}$: 2.951 ± 0.050 vs. 2.67 ± 0.037 log (CFU of Bm11), at $100 \mu\text{g/ml}$: 2.902 ± 0.73 vs. 2.59 ± 0.070 log (CFU of Bm11), at $250 \mu\text{g/ml}$: 2.83 ± 0.63 vs. 2.58 ± 0.068 log (CFU), Figure 1E)

MS induced ileal inflammation

MS significantly increased interferon γ concentration in the ileum (6.32 ± 0.62 vs. 2.675 ± 0.76 pg/mg of ileal proteins, Figure 2).

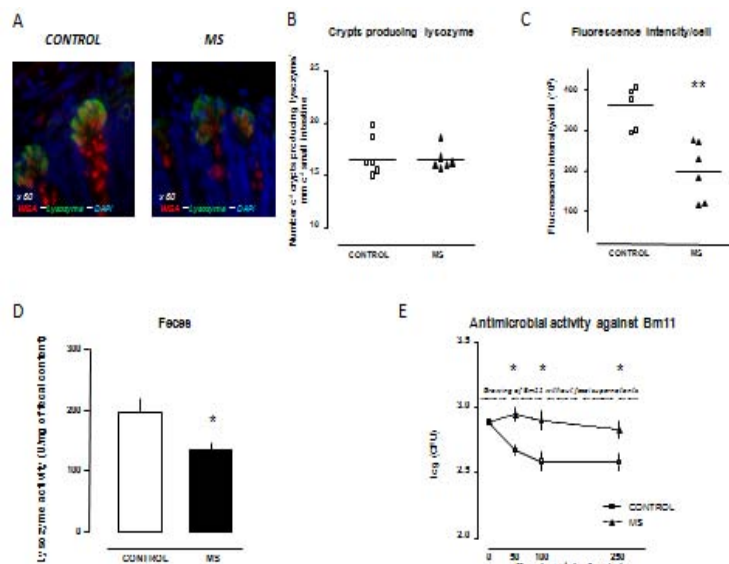


Figure 1 – Antimicrobial activity.

(A) Immunostaining of ileum paraffin section with anti-lysozyme-FITC, Wheat germ agglutinin (WGA)-Texas red and DAPI. (B) Number of crypts producing lysozyme on small intestine in MS (black triangles) compared to control (white square) ($n = 6$ mice per group). (C) Lysozyme fluorescence intensity per crypt cell in MS (black triangles) compared to control (white square) ($n = 5 - 6$ mice per group). (D) Enzymatic activity against peptidoglycan of lysozyme in faeces supernatants ($n = 10$ to 14 mice per group). (E) Total antimicrobial peptides activity by dilution: Enzymatic activity against Bm11 of antimicrobial peptides faeces supernatants (protein concentration assays : 50 , 100 and $250 \mu\text{g/ml}$ of supernatant) ($n = 10$ to 14 mice per group).

*: $p < 0.05$ with control

MS altered fecal and ileal E. coli populations (colibiota) at quantitative.

Impairment of Paneth cell functions was associated with *E. coli* overgrowth in ileum and (Ileum: 6.68 ± 0.15 vs. 6.24 ± 0.09 log (CFU/g of ileal content); Feces: 6.07 ± 0.20 vs. 6.34 ± 0.16 log (CFU/g of fecal content), Figure 3A) as well as aerobic bacteria overgrowth in ileum (6.75 ± 0.18 vs. 6.25 ± 0.11 log (CFU/g of ileal content), Figure 3B). Nevertheless, MS did not alter *E. coli* phylogenetic group since all *E. coli* isolated from fecal contents (five isolates per mice, 5 mice tested) belonged to B1 phylogenetic group regardless of the mice group (data not shown). No bacterial translocation was observed in liver or spleen despite bacterial overgrowth (data not shown).

MS increased systemic humoral response against commensal E. coli.

MS increased plasma anti-*E. coli* IgG (0.111 ± 0.02 vs. 0.03 ± 0.008 at OD450nm, Figure 4A) and anti-*E. coli* IgA (0.303 ± 0.07 vs. 0.104 ± 0.22 at OD450nm, Figure 4B). MS did not induce any modifications of total Ig concentrations in plasma or reactivity against hydrosoluble food antigens (data not shown).

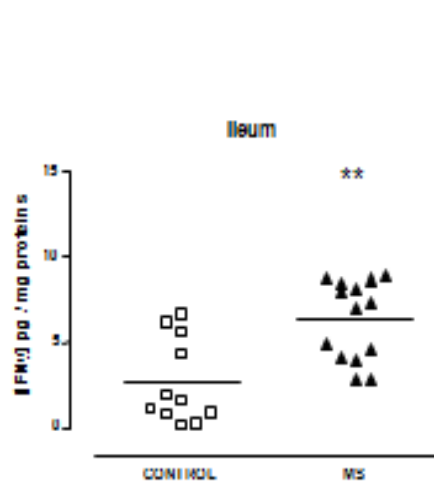


Figure 2 – IFN γ concentration in the ileum and the colon.

Dosage by ELISA of IFN γ concentration in the ileum (A) and in the colon (B) ($n = 10$ to 14 mice per group).

MS increased visceral sensibility to colorectal distention.

MS significantly increased visceral sensitivity to colorectal distention with low volumes (5.1±0.83 vs. 1.27±0.27 mV.s at 0.02 ml; 6.94±1.03 vs. 2.08±0.49 mV.s at 0,04 ml; 8.90±1.13 vs. 3.87±0.85 mV.s at 0,06ml compared to control) (Figure 5). This result demonstrated that MS induced allodynia i.e. pain is felt for non nociceptive stimulation. No differences were observed for higher volumes (0.08 and 0.1 ml). Furthermore, MS didn't alter para or trans-cellular intestinal permeability (supplementary data 1).

***E. coli* gavage reproduced ileal and fecal bacteria overgrowth observed in MS mice**

Forced feeding of young adult mice with 10⁹ streptomycin resistant *E. coli* per os / day during 15 days significantly increased the commensal *E. coli* population in the ileum and in feces (Ileum: 6.95±0.19 vs 6.04±0.2 log (CFU/g of ileal content); Feces: 7.42±0.18 vs. 6.80±0.13 log (CFU/g of fecal content), Figure 6A) and ileal aerobic bacteria (7.05±0.19 vs. 6.48±0.08log (CFU/g of ileal content), Figure 6B), within the range observed after MS. This bacterial gavage had non consequences neither on intestinal permeability nor in bacterial translocation and nor in fecal antimicrobial activity (supplementary data 2).

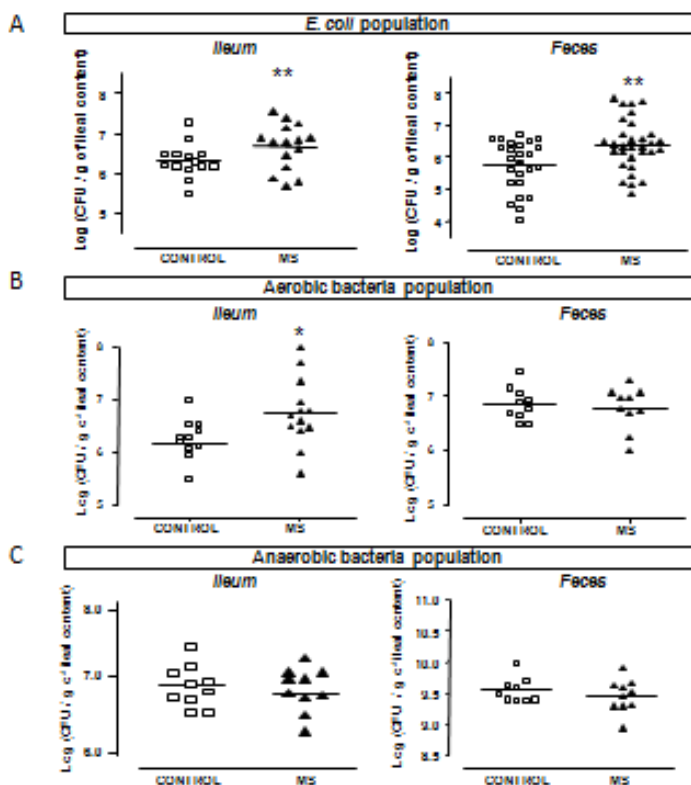


Figure 3 – Monitoring of commensal microbiota.

(A) Counting of *E. coli* colonies from ileum (n = 14 to 15 mice per group) and feces (n = 25 to 30 mice per group).

(B) Counting of aerobic bacteria from ileum (n = 11 to 13 mice per group) and feces (n = 10 to 10 mice per group).

(C) Counting of anaerobic bacteria from ileum (n = 10 mice per group) and feces (n = 9 to 10 mice per group).

*: p<0.05 with control

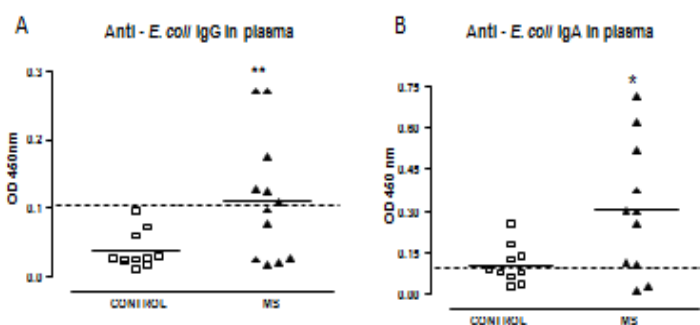


Figure 4 – systemic IgG and IgA specificity.

(A) IgG specificity against *E. coli* lysate by ELISA after normalizing IgG concentration for plasma (n = 11 to 12 mice per group).

(B) IgA specificity against luminal content assessed by ELISA after normalizing IgA concentration for plasma (n = 10 to 11 mice per group).

** : p<0.01 with control.

Horizontal dashed lines indicate the threshold for specificity corresponding to 2 blanks.

***E. coli* gavage increased systemic humoral response toward commensal *E. coli*.**

Forced feeding of young adult mice with 10^9 streptomycin resistant *E. coli* per os / day during 15 days significantly increased the systemic humoral response toward commensal *E. coli* (specific IgG: 0.107 ± 0.02 vs. 0.033 ± 0.007 at OD450nm, Figure 7A; specific IgA: 0.509 ± 0.099 vs. 0.055 ± 0.007 , Figure 7B).

***E. coli* gavage reproduced visceral hypersensitivity observed in MS mice**

Forced feeding of young adult mice with 10^9 streptomycin resistant *E. coli* per os / day during 15 days reproduced allodynia observed in mice submitted to MS (3.33 ± 0.33 vs. 1.83 ± 0.34 mV.s at 0,04 ml; 7.18 ± 0.87 vs. 4.45 ± 0.38 mV.s at 0,06ml compared to control) and no differences were observed for higher volumes (0.08 and 0.1 ml) (Figure 8).

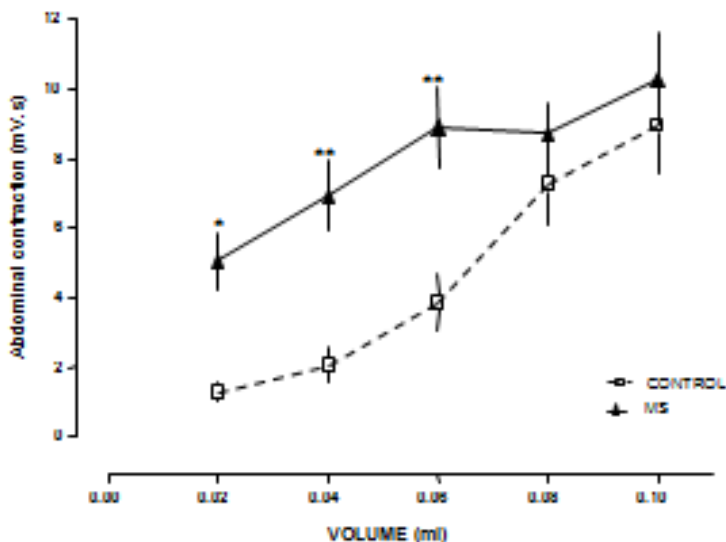


Figure 5 – Visceral sensitivity on adult mice.

Representative curves of abdominal contraction in response to colorectal distension with increasing volumes (0.02 to 0.1ml) in MS (black triangles plain line) compared to control (white square dashed line) (n = 12 to 21 mice per group).

* p<0,05 compared to identical volumes for controls.

** p<0,01 compared to identical volumes for controls.

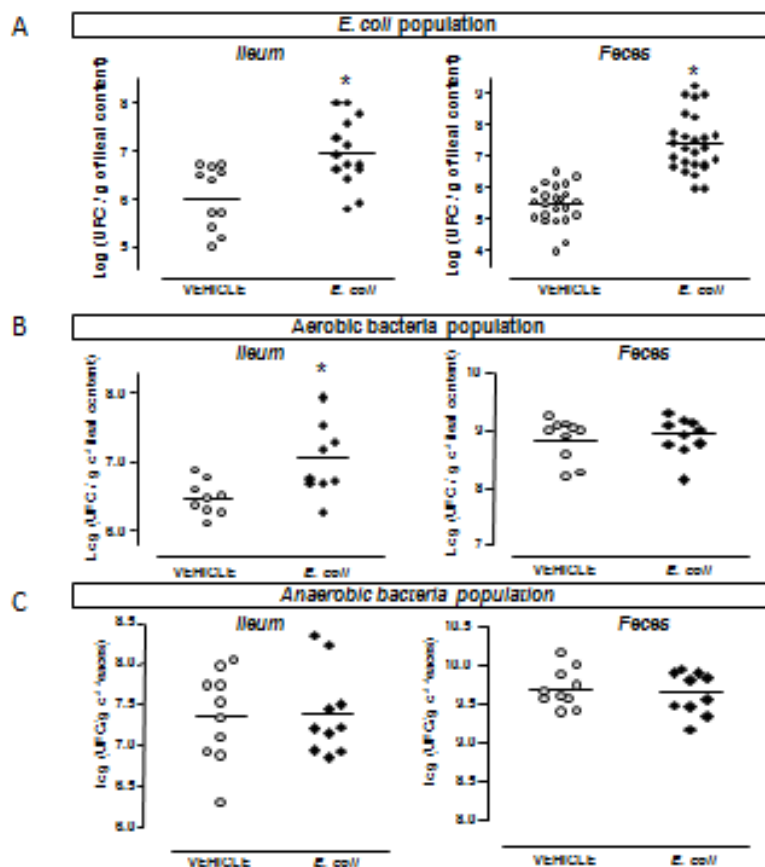


Figure 6 – Monitoring of commensal microbiota.

(A) Counting of *E. coli* colonies from ileum (n = 11 to 14 mice per group) and feces (n = 23 to 25 mice per group).

(B) Counting of aerobic bacteria from ileum (n = 9 mice per group) and feces (n = 10 mice per group).

(C) Counting of anaerobic bacteria from ileum (n = 10 mice per group) and feces (n = 10 mice per group).

*: p<0.05 with control

DISCUSSION

This study shows that early life stress like maternal separation, impaired enteric antimicrobial response that might be responsible for subsequent adverse effects on intestinal homeostasis. Indeed, in young adults MS not only impair Paneth cell functions but also induced *E. coli* intestinal overgrowth, a loss of tolerance towards *E. coli* a representative commensal bacteria in young-adults and hypersensitivity to colorectal distension without an increase in intestinal permeability. In rats (Barreau et al., 2004) but also in mice (Varghese et al., 2006) and unpublished data MS increased intestinal permeability and visceral sensitivity. MS impaired enteric antimicrobial response without modification of Paneth cell number or intestinal permeability. Even though it is under debate (Shanahan et al., 2014) studies in human (Bevins et al., 2009; Wehkamp et al., 2004) and mice (Kobayashi et al., 2005) suggest a strong link between Nod2 polymorphism and decrease α defensins

expression. Furthermore intestinal permeability is increased in Nod2 $-/-$ mice (Barreau et al., 2007) associated with bacterial translocation. In our model we did not observed any bacterial translocation in MLN, liver or spleen in young adults submitted to MS. To our knowledge intestinal permeability has not been addressed in mice deficient for Paneth cells like Sox9 $-/-$ or Math1 $-/-$ or in mice unable to activate alpha-defensin like MMP7 $-/-$ mice. In rats MS was associated with decrease of Paneth cell number in adult but in this study the functionality of Paneth was not assessed (Estienne et al., 2010). Here we demonstrated a defect of Paneth cell-derived antimicrobial activity without modification of Paneth cell number or intestinal permeability.

Paneth cells degranulation is under control of various factors including pro-inflammatory cytokines like TNF α (Van Hauwermeiren et al., 2014) and IFN γ (Farin et al., 2013; Raetz et al., 2013). Interestingly IFN γ is increased in ileum of MS mice and might contribute to the observed decrease of

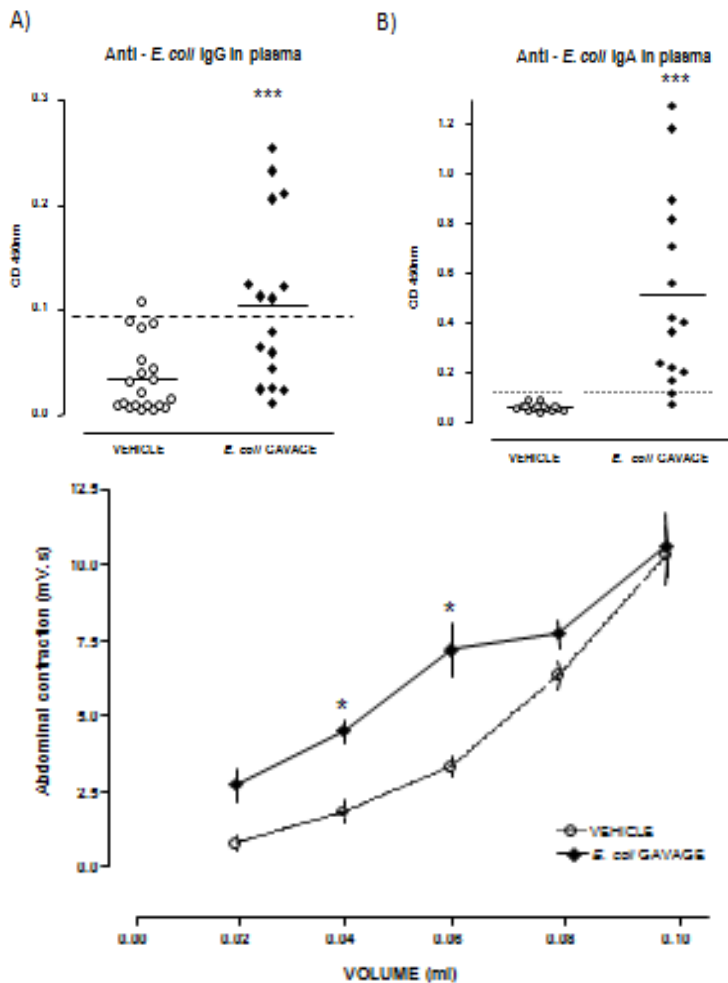


Figure 7 – Effects of *E. coli* gavage on systemic IgG and IgA specificity.

(A) IgG specificity against luminal content assessed by ELISA after normalizing IgG concentration for plasma (n = 20 to 16 mice per group).

(B) IgA specificity against luminal content assessed by ELISA after normalizing IgA concentration for plasma (n = 15 mice per group).

***: p<0.001 with control.

Horizontal dashed lines indicate the threshold for specificity corresponding to 2 blanks.

Figure 8 – Effects of *E. coli* gavage on visceral sensitivity on adult mice.

Representative curves of abdominal contraction in response to colorectal distension with increasing volumes (0.02 to 0.1ml) in *E. coli* (black lozenge plain line) compared to vehicle (white circles dashed line) (n = 8 to 9 mice per group).

* p<0,05 compared to identical volumes for vehicle.

lysozyme staining in Paneth cells. Furthermore IFN γ -induced loss of Paneth cells has been associated with an uncontrolled expansion of the *Enterobacteriaceae* family of Gram negative bacteria (Farin et al., 2013; Raetz et al., 2013) as observed herein in our model of MS. Even though MS induced *E. coli* ileal and fecal overgrowth it was not associated with a switch of phylogenetic group. Commensal *E. coli* isolated from C3H/HeN mice belong to B1 strain and it was not affected by MS. CD pathology are is characterized by a defect of Paneth cells (Wehkamp et al., 2005) and bacterial overgrowth is described in CD patient (Castiglioni et al., 2000; Neut et al., 2002). Furthermore bacterial overgrowth has also been observed in other gastrointestinal disorders like Irritable Bowel Syndrome (IBS) (Nucera et al., 2005; Pimentel et al., 2000) even though to our knowledge Paneth cells were not studied in this pathology. Small Intestinal Bacterial Overgrowth (SIBO) represent a subset of IBS patients characterized by a bacterial overgrowth is in favor of *Enterobacteriaceae* (Dukowicz et al., 2007). An increase of adherent-invasive *E. coli* and has been described in a subgroup of CD patient with Paneth cell defect confirming the implication of defect of Paneth cells in CD pathophysiology (Deuring et al., 2014). IBD patients present more intracellular *E. coli* but not pathogen and were more prevalent in quiescent CD patients (Elliott, IBD, 2013). Although some studies highlighted major colonization by B2 or D phylogroups of *E. coli* in IBD patients (Kotlowski et al., 2007), other works indicated similar distribution of phylogenetic groups in IBD and healthy patients (Schippa et al., 2009; Sepehri et al., 2009).

We demonstrated that *E. coli* intestinal overgrowth drives systemic humoral response against *E. coli* lysate and intestinal hypersensitivity. Surprisingly MS increased systemic humoral response toward microbiota without any modification of intestinal para- or trans-cellular permeability. One can hypothesized that MS impaired immune system at early stage that has long lasting consequences. However *E. coli* oral administration in healthy adults reproduced the observed increase of humoral response toward

microbiota and visceral hypersensitivity suggesting the involvement of other mechanisms. In CD patients it is usual to associate the defect of intestinal barrier to the observed loss of tolerance toward intestinal microbiota. Indeed an increase humoral response toward microbiota (Frehn et al., 2014) has been described in CD patients as well as visceral hypersensitivity (Halpin and Ford, 2012). As *E. coli* oral administration reproduced the inappropriate humoral immune response toward microbiota and hypersensitivity but not the enteric antimicrobial defect (data not shown) we hypothesized that Paneth cell impairment might be the primary defect induced by MS. This hypothesize with be tested within the next 3 to 4 months and is discussed paragraph 2 of the discussion section.

So far we can conclude that early life stressful events impaired the antimicrobial defense development associated with a bacterial overgrowth inducing a specific systemic humoral response toward commensal microbiota and hypersensitivity.

References

- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., Bueno, L., 2004. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53, 501-506.
- Barreau, F., Meinzer, U., Chareyre, F., Berrebi, D., Niwa-Kawakita, M., Dussaillant, M., Foligne, B., Ollendorff, V., Heyman, M., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T., Sterkers, G., Giovannini, M., Hugot, J.P., 2007. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One* 2, e523.
- Bevins, C.L., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2009. Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype. *Gut* 58, 882-883; discussion 883-884.
- Bonaz, B.L., Bernstein, C.N., 2013. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 144, 36-49.
- Bry, L., Falk, P., Huttner, K., Ouellette, A., Midtvedt, T., Gordon, J.I., 1994. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10335-10339.

- Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., Stone, C.D., Brunt, E.M., Xavier, R.J., Sleckman, B.P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T.S., Virgin, H.W.t., 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259-263.
- Castiglioni, B., Comincini, S., Foti, M.G., Ferretti, L., 2000. Assignment of interleukin-1 receptor, type I (IL1R1) to bovine chromosome band 11q12 by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 89, 166-167.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555-4558.
- Darmoul, D., Brown, D., Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 1997. Cryptdin gene expression in developing mouse small intestine. *Am J Physiol* 272, G197-206.
- Deuring, J.J., Fuhler, G.M., Konstantinov, S.R., Peppelenbosch, M.P., Kuipers, E.J., de Haar, C., van der Woude, C.J., 2014. Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease. *Gut* 63, 1081-1091.
- Dukowicz, A.C., Lacy, B.E., Levine, G.M., 2007. Small intestinal bacterial overgrowth: a comprehensive review. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 3, 112-122.
- Estienne, M., Claustre, J., Clain-Gardechaux, G., Paquet, A., Tache, Y., Fioramonti, J., Plaisancie, P., 2010. Maternal deprivation alters epithelial secretory cell lineages in rat duodenum: role of CRF-related peptides. *Gut* 59, 744-751.
- Farin, H.F., Karthaus, W.R., Kujala, P., Rakhshandehroo, M., Schwank, G., Vries, R.G., Kalkhoven, E., Nieuwenhuis, E.E., Clevers, H., 2013. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma. *J Exp Med* 211, 1393-1405.
- Frehn, L., Jansen, A., Bennek, E., Mandic, A.D., Temizel, I., Tischendorf, S., Verdier, J., Tacke, F., Streetz, K., Trautwein, C., Sellge, G., 2014. Distinct patterns of IgG and IgA against food and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases. *PLoS One* 9, e106750.
- Halpin, S.J., Ford, A.C., 2012. Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 107, 1474-1482.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.
- Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S., 2008. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756.
- Klionsky, D.J., 2009. Crohn's disease, autophagy, and the Paneth cell. *N Engl J Med* 360, 1785-1786.
- Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., Flavell, R.A., 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731-734.
- Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sepehri, S., Krause, D.O., 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 56, 669-675.
- Mawdsley, J.E., Rampton, D.S., 2005. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 54, 1481-1491.
- Mshvildadze, M., Neu, J., 2010. The infant intestinal microbiome: friend or foe? *Early Hum Dev* 86 Suppl 1, 67-71.
- Neut, C., Bulois, P., Desreumaux, P., Membre, J.M., Lederman, E., Gambiez, L., Cortot, A., Quandalle, P., van Kruiningen, H., Colombel, J.F., 2002. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 97, 939-946.
- Nucera, G., Gabrielli, M., Lupascu, A., Lauritano, E.C., Santoliquido, A., Cremonini, F., Cammarota, G., Tondi, P., Pola, P., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A., 2005. Abnormal breath tests to lactose, fructose and sorbitol in irritable bowel syndrome may be explained by small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 21, 1391-1395.
- O'Mahony, S.M., Hyland, N.P., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 71-88.

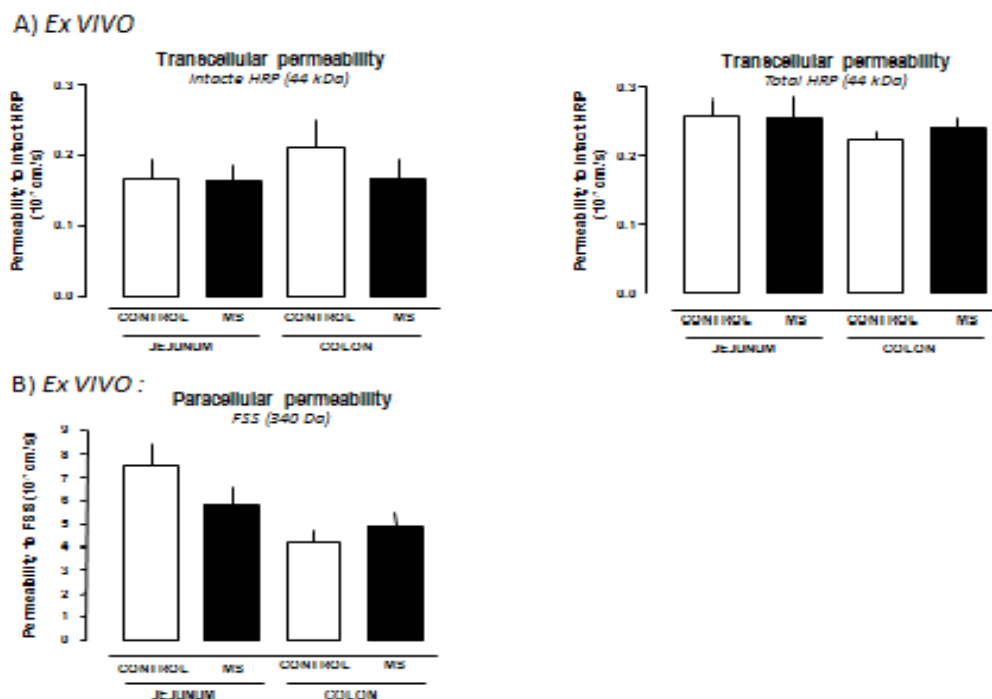
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G., Cho, J.H., 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603-606.
- Pimentel, M., Chow, E.J., Lin, H.C., 2000. Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 95, 3503-3506.
- Raetz, M., Hwang, S.H., Wilhelm, C.L., Kirkland, D., Benson, A., Sturge, C.R., Mirpuri, J., Vaishnav, S., Hou, B., Defranco, A.L., Gilpin, C.J., Hooper, L.V., Yarovinsky, F., 2013. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells. *Nat Immunol* 14, 136-142.
- Renz, H., Brandtzaeg, P., Hornef, M., 2012. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 12, 9-23.
- Ringel, Y., Drossman, D.A., 2001. Psychosocial aspects of Crohn's disease. *Surg Clin North Am* 81, 231-252, x.
- Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., Bevins, C.L., 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422, 522-526.
- Schippa, S., Conte, M.P., Borrelli, O., Iebba, V., Aleandri, M., Seganti, L., Longhi, C., Chiarini, F., Osborn, J., Cucchiara, S., 2009. Dominant genotypes in mucosa-associated *Escherichia coli* strains from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 15, 661-672.
- Sepehri, S., Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Krause, D.O., 2009. Phylogenetic analysis of inflammatory bowel disease associated *Escherichia coli* and the fimH virulence determinant. *Inflamm Bowel Dis* 15, 1737-1745.
- Shanahan, M.T., Carroll, I.M., Grossniklaus, E., White, A., von Furstenberg, R.J., Barner, R., Fodor, A.A., Henning, S.J., Sartor, R.B., Gulati, A.S., 2014. Mouse Paneth cell antimicrobial function is independent of Nod2. *Gut* 63, 903-910.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8, 207-217.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8, 207-217.
- van Es, J.H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., Taketo, M.M., Clevers, H., 2005. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 7, 381-386.
- Van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R.E., Grine, L., Lodens, S., Van Wonterghem, E., De Rycke, R., De Geest, N., Hassan, B., Libert, C., 2014. TNFR1-induced lethal inflammation is mediated by goblet and Paneth cell dysfunction. *Mucosal Immunol*.
- Varghese, A.K., Verdu, E.F., Bercik, P., Khan, W.I., Blennerhassett, P.A., Szechtman, H., Collins, S.M., 2006. Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. *Gastroenterology* 130, 1743-1753.
- Wegman, H.L., Stetler, C., 2009. A meta-analytic review of the effects of childhood abuse on medical outcomes in adulthood. *Psychosom Med* 71, 805-812.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schroder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., Stange, E.F., 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658-1664.
- Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R.W., Chu, H., Lima, H., Jr., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E.F., Bevins, C.L., 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18129-18134.
- 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., 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286, 113-117.

Supplemental methods

Intestinal permeability to Fluorescein Sodium Salt (FSS) and Horse Radish Peroxidase (HRP) in jejunal and colonic fragments

Jejunal and colonic fragments were mounted in Ussing chambers (Easy Mount, Physiologic Instruments) exposing a surface area measuring 0.1 cm². They were bathed on each side with 1 ml of oxygenated thermostated Krebs's solution (Sigma). Electrical parameters, including potential difference, short-circuit current (Isc) and total electrical resistance (R), were recorded at regular intervals during the 2-hour period of experimentation. A change in electrical resistance was considered an index of altered paracellular permeability. Horseradish peroxidase (HRP 44kDa) (Sigma) transport was measured as an index of macromolecular permeability, and FSS (376Da) (Sigma) epithelial passage was measured as a marker of paracellular permeability to small molecules. After equilibration of electrical parameters, HRP

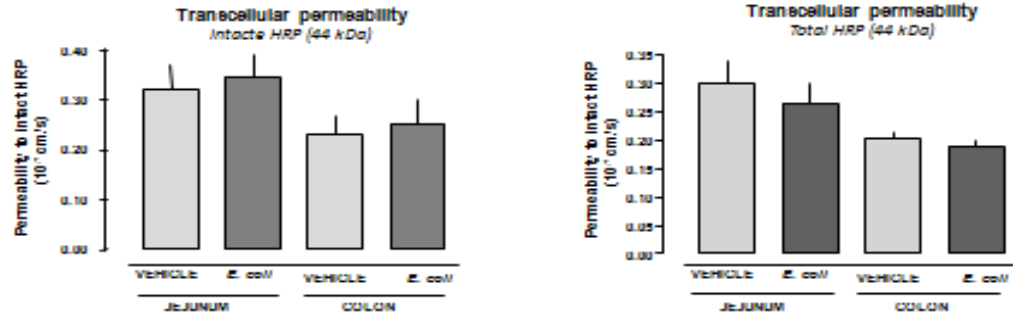
HRP was added to the mucosal compartment at a final concentration of 0.4 mg/ml, and FSS at a final concentration of 40g/ml. The 2 markers were applied simultaneously in the mucosal compartment. Epithelial permeability to total HRP was determined by an ELISA. Briefly, 96-wells flat-bottomed black plates (Greiner, Thermo Scientific, Dutcher, Brumath, France) were coated overnight at +4°C with 50µl of 10µg/ml mouse polyclonal to HRP (Abcam) in PBS. Plates were blocked with PBS-1% bovine serum albumin (BSA) before incubation with serosal compartments of Ussing chamber. FITC-conjugated streptavidin (Becton Dickinson; BD, Le Pont de Claix, France) was added for 20 minutes and fluorescence intensity measured 485nm/525nm using an automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan). Epithelial permeability to FSS was determined by measuring the fluorescence intensity (FI) 485nm/525nm using an automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan). Permeability was calculated as the ratio of flux/concentration, and expressed as cm/second.



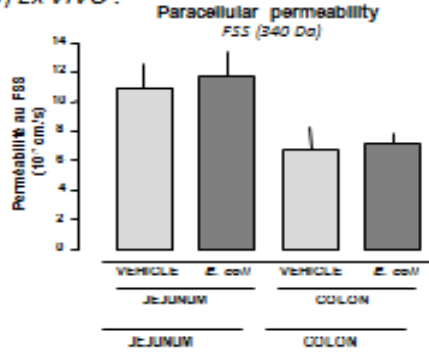
Supplemental figure 1 – Effects of MS on intestinal permeability on adult mice.

Representative histogram of USSING chambers measurements of mucosal to serosal permeability in jejunum and colon to (A) HRP 44 kDa (intact and total) (n = 14 to 17 mice per group), (B) FSS 340 Da (n = 12 to 17 mice per group).

A) Ex VIVO:



B) Ex VIVO :



Supplemental figure 2 – Effects of *E. coli* gavage on intestinal permeability on adult mice.

Representative histogram of USSING chambers measurements of mucosal to serosal permeability in jejunum and colon to (A) HRP 44 kDa (intact and total) (n = 15 to 17 mice per group), (B) FFS 340 Da (n = 15 to 17 mice per group).

DISCUSSION GENERALE

I. Le SSM altère la barrière intestinale et conduit à une inflammation de bas grade, au niveau systémique, chez les individus mâles jeunes adultes :

Nous avons confirmé que le SSM chez la souris conduit à une augmentation de la perméabilité intestinale (Varghese, Verdu et al. 2006), et de la sensibilité viscérale comme cela avait démontré chez le rat mâle (Barreau, Ferrier et al. 2004). Le SSM induit également une diminution de l'expression du lysozyme dans les cellules de Paneth et de son l'activité fécale mais aussi des ILC3 de la *lamina propria*. Le SSM induit une augmentation de TNF α au niveau de l'iléon qui pourrait contribuer d'une part à l'hyperperméabilité intestinale (Gitter, Boggs et al. 2000) et aussi au défaut des cellules de Paneth (Van Hauwermeiren, Vandenbroucke et al. 2014). Une diminution des ILC3 dans la *lamina propria* est associée à une rupture de tolérance vis-à-vis du microbiote qui se caractérise par une exacerbation de la réponse plasmatique IgG anti-microbiote et la mise en place d'une inflammation systémique de bas grade (Hepworth, Monticelli et al. 2013) (Sonnenberg, Monticelli et al. 2012). Le SSM provoque une réponse humorale anormale spécifique, par augmentation des IgG anti-*E. coli* commensaux, sans modification de la réactivité vis-à-vis des antigènes alimentaires, autre source importante d'antigènes dans la lumière intestinale. Le SSM altère donc la barrière intestinale et induit une réponse immunitaire anormale contre un *E. coli* issu du microbiote commensal. Un suivi des *E. coli* iléales et fécales ne montre aucune modification quantitative ou qualitative, tous appartenant au groupe B1. De plus, une analyse par qPCR du microbiote fécal et des métabolites par RNM ne montre pas de différence majeure entre les deux groupes.

Chez le rat âgé de 12 semaines, le SSM provoque une augmentation de la perméabilité intestinale associée à une translocation bactérienne au niveau des ganglions mésentériques, du foie et de la rate (Barreau, Ferrier et al. 2004). L'augmentation de perméabilité induite par le stress peut favoriser l'internalisation de bactéries au travers de l'épithélium et provoquer une infiltration des cellules immunitaires au niveau de la *lamina propria* (Yang, Jury et al. 2006). Bien qu'aucune translocation bactérienne au niveau du foie ou de la rate ne soit observée à l'âge adulte, après le SSM, dans notre modèle, une hyperperméabilité intestinale pourrait augmenter le passage d'antigènes luminaux. De plus, le SSM induit une translocation bactérienne au niveau des ganglions mésentériques chez les animaux âgés de 5 jours, soit pendant la période de stress. Une translocation bactérienne au niveau des ganglions mésentériques, de la rate et du foie avait déjà été observée chez le rat âgé de 10 jours après un stress unique de 4h (Moussaoui, Braniste et al. 2014). Cette même étude montre que la production de glucocorticoïdes en réponse à ce stress unique impacte les chaînes légères de

myosines et donc les jonctions serrées, entraînant l'augmentation de la perméabilité intestinale. De même, une augmentation de l'adhérence et de la pénétrabilité des bactéries au niveau de la *lamina propria* ont été observées chez des rats âgés de 19 jours et soumis à une séparation maternelle, associée à une augmentation de la myéloperoxydase, marqueur de l'inflammation au niveau du côlon (Gareau, Jury et al. 2006). La réponse anormale au microbiote commensal chez l'animal adulte pourrait être une conséquence directe de la translocation bactérienne survenant pendant le MS et/ou d'un contact anormal entre l'épithélium intestinale et le microbiote. Un suivi durant le SSM de l'implantation d'*E. coli* et de l'évolution de la translocation bactérienne chez le nouveau-né permettrait de mieux comprendre l'établissement de cette réponse immunitaire anormale à l'âge adulte.

Dans notre modèle de SSM, les souris stressées présentent une diminution de la corticostéronémie illustrant un défaut de l'axe HPA déjà démontré dans le SSM (Pinheiro, Ferraz-de-Paula et al. 2011).

Notre étude a montré pour la première fois que le SSM chez la souris induit une hypersensibilité viscérale chez le jeune adulte. Une seule autre étude montre une augmentation de la sensibilité viscérale chez la souris âgée de 8 semaines ayant subi le SSM mais celui-ci était associé à un stress supplémentaire appliqué chez la mère (Moloney, O'Leary et al. 2012).

De plus, le SSM altère la réponse cellulaire systémique (augmentation des T activés et diminution des Treg) et sa fonctionnalité au niveau de la rate. En condition basale, les animaux stressés sécrètent moins d'IL10 que les animaux témoins. Une stimulation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 induit une augmentation de la sécrétion d'IFN γ et d'IL10 par les splénocytes chez les animaux stressés suggérant un profil pro-inflammatoire. Toutefois, une stimulation par un lysat d'*E. coli* induit une diminution d'IL10 et de TGF β chez les animaux stressés comparés aux animaux témoins sans modifier la sécrétion d'IFN γ suggérant un défaut de présentation antigénique. Cette hypothèse est confortée par une diminution, chez les animaux ayant subi le SSM, de l'expression du cofacteur CD40 sur les cellules CD11b⁺ et CD11c⁺ de la rate après une stimulation poly:IC/LPS ce qui pourrait expliquer l'inflammation de bas grade, malgré un profil proinflammatoire des T.

Barreau et al., ont montré que le SSM augmente le temps de clairance du parasite intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* associé à une augmentation de l'activité de la myéloperoxydase (Barreau, de Lahitte et al. 2006). Le défaut d'activité antimicrobienne associé à un profil pro-inflammatoire local et systémique observé dans notre modèle de SSM

nous ont conduit à étudier une éventuelle susceptibilité aux infections entériques par *Salmonelle* ou *Listeria*. *Listeria monocytogenese* est particulièrement sensible aux AMP (Finch 1996). Nous avons donc réalisé une infection par voie orale de souris jeunes adultes ayant subi ou non le SSM par *Listeria monocytogenese* – InIA^m, dont l'internaline reconnaît la E-cadhérine murine (Wollert et al., Cell, 2007). Aucune modification du poids des animaux ou des charges bactériennes dans la rate ou le foie n'a été observée entre les souris stressées et les souris témoins (figure 17). Nous avons testé une autre souche bactérienne pathogène *Salmonella typhimurium* 14028s (Schikora, Virlogeux-Payant et al. 2011). De la même façon nous n'avons pas pu mettre en évidence de susceptibilité aux infections entériques chez les animaux ayant subi le SSM. Il semblerait donc que malgré une diminution de la barrière intestinale et une réponse immunitaire anormale au microbiote commensal, les animaux stressés soient capables de reconnaître, contenir et maîtriser les infections entériques par des bactéries pathogènes.

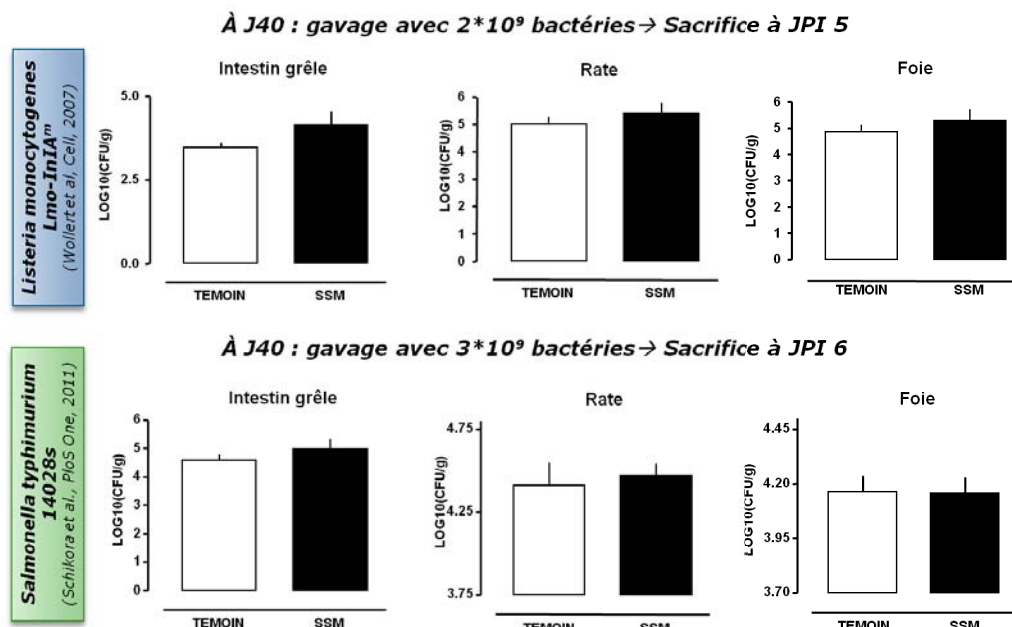


Figure 17 : Résultats du protocole d'infection par *Listeria* et *Salmonella*

Bien que les animaux ayant subis le SSM présentent une diminution de la barrière intestinale et l'établissement d'un profil pro-inflammatoire de type Th1, ils restent capables de contenir l'infection et ne sont pas plus susceptibles que les animaux témoins à des infections bactériennes intestinales. (JPI : Jour Post Infectieux)

Il serait intéressant de compléter ces résultats d'infection en utilisant des pathogènes plus virulents chez la souris comme c'est le cas pour *Toxoplasma gondii* et *Citrobacter rodentium*.

Il semble donc que le stress en période périnatale induise des altérations à long terme dans la tolérance vis-à-vis du microbiote commensal chez les animaux mâles sans pour autant induire de susceptibilités aux infections entériques bactériennes. Une question qu'il serait

intéressant d'étudier serait le rôle du SSM dans le développement de troubles gastro-intestinaux chez les individus prédisposés. En effet, les pathologies intestinales sont des maladies multifactorielles impliquant des facteurs génétiques particulièrement vrai pour la MC et environnementaux comme le stress.

La maladie de Crohn est associée à un polymorphisme de l'IL10 ou de son récepteur (Glocker, Kotlarz et al. 2011). Dans notre modèle, une diminution de la production d'IL10 basale avait été observée dans la rate des animaux stressés. De plus, l'exposition au SSM chez le rat se traduit à l'âge adulte par une exacerbation de la réponse inflammatoire suite à une colite expérimentale induite par le TNBS (2, 4, 6 – TriNitroBenzene Sulfonic acid) (Barreau, Ferrier et al. 2004). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du stress de séparation maternelle dans un modèle de souris invalidées pour l'IL10, résistantes au développement de la colite (Kuhn, Lohler et al. 1993). Les souris C57/BL6 IL10^{-/-} seraient un bon modèle d'étude car elles ne développent pas de colite spontanée (Kennedy, Hoper et al. 2000). Chez cette souche de souris, la colite doit être induite par une infection entérique à *Helicobacter hepaticus*. Il serait intéressant de savoir si le SSM peut, comme l'infection à *Helicobacter hepaticus*, être un facteur déclenchant de la colite, dans cette souche de souris. Des scores macro- et microscopique de colite, un suivi de poids, une mesure de la longueur du côlon ainsi qu'un suivi des populations cellulaires au niveau local (*lamina propria* et ganglions mésentériques) et systémique (rate) ainsi que de leur fonctionnalité permettrait de mieux comprendre le rôle du SSM dans les pathologies intestinales d'origines multifactorielles.

II. Le SSM altère l'activité antimicrobienne et le microbiote commensal conduisant à une réponse humorale systémique vis-à-vis du microbiote et à une hypersensibilité viscérale chez la femelle jeune adulte:

Le SSM chez la femelle comme chez le mâle diminue l'activité antimicrobienne fécale du lysozyme vis-à-vis du peptidoglycane et, de façon plus générale, l'AMA des surnageants fécaux contre *Bacillus megaterium* 11. Contrairement à ce que nous avons observé chez les mâles, ce défaut d'activité antimicrobienne est associé à une augmentation de la population d'*E. coli* iléale et fécale, sans modification de son groupe phylogénétique. Une analyse plus précise par qPCR du microbiote fécal et iléal est en cours de réalisation, afin de voir si seuls les *E. coli* sont modifiés ou si d'autres groupes bactériens sont eux aussi être modifiés par le SSM. Toutefois, une analyse des métabolites fécaux par RNM n'a montré aucune différence

entre les animaux témoins et stressés. Le SSM induit une diminution des Lactobacilles associée à une susceptibilité aux infections chez les singes rhésus, au moment du sevrage (Bailey and Coe 1999). Une autre étude montre des modifications uniquement à l'âge adulte, avec une augmentation en faveur des Entérobactéries et des Bactéroïdes, que ce soit au niveau de l'intestin grêle ou du côlon (Garcia-Rodenas, Bergonzelli et al. 2006). Observé chez les patients atteints de SII ou de Crohn (Pimentel, Chow et al. 2000) (Nucera, Gabrielli et al. 2005), le « *Small Intestinal Bacterial Overgrowth* » ou SIBO est caractérisé par une augmentation de la population bactérienne au niveau de l'iléon, principalement en faveur des Entérobactéries ou des bactéries Gram négatives. De plus, une dysbiose en faveur des entérobactéries est largement décrite dans le SII (Carroll, Ringel-Kulka et al. 2012). Une amélioration de la sensibilité viscérale et des diarrhées chez des patients atteints de SIBO après une antibiothérapie chez les patients SII a été décrite (Pimentel, Chow et al. 2000). De plus, un effet bénéfique d'une supplémentation en probiotiques sur les patients SII atteints ou non de SIBO a été montré. Toutefois, leur efficacité dépendait d'un traitement antibiotique réalisé en amont, permettant de réduire considérablement les niches bactériennes existantes avant l'introduction de bactéries « bénéfiques » (Dupont 2014). Néanmoins, ces résultats restaient préliminaires et demandent à être approfondis. En effet, l'efficacité du traitement était souche dépendante et semblait dépendre du type de patient, constipé ou diarrhéique.

A l'heure actuelle, les cellules de Paneth ou l'activité antimicrobienne n'ont été étudiées que dans la maladie de Crohn où elles sont diminuées mais leur expression dans le SII ou le SIBO ne sont pas connues.

Une analyse en période périnatale permettrait également de mieux comprendre les effets du SSM sur le développement des cellules de Paneth et le lien avec la mise en place de la pullulation bactérienne. Une étude chez le rat montre un retard dans le développement des cellules de Paneth chez des rats âgés de 13 à 18 jours (Estienne, Claustre et al. 2010), c'est-à-dire durant la période de SSM, conduisant à une modification dans le développement du microbiote commensal. Cette étude indique que Klf4 serait un médiateur clé de l'épithélium intestinal en réponse au SSM. Connu pour interagir avec la β caténine, Klf4 est un antagoniste de la voie de signalisation de Wnt, voie de différenciation des cellules de Paneth. Klf4 est augmenté chez les rats ayant subi le SSM du 8^{ème} au 14^{ème} jour de vie, période à laquelle les cellules de Paneth apparaissent (Menard, Forster et al. 2008). Il serait intéressant de suivre le développement des cellules de Paneth et les niveaux d'expression de CRAMP, principal acteur de l'activité antimicrobienne en période périnatale ainsi que de la mise en place des *E. coli* et plus généralement du microbiote durant le SSM. Une surexpression de CRAMP en

périnatal pourrait conduire à un retard de l'implantation d'*E. coli* durant le SSM. En effet, une diminution significative des *E. coli* fécales est visible au moment du sevrage suivie d'une augmentation à l'âge adulte. Nous pouvons ainsi suggérer que la pullulation de *E. coli* observée dans notre étude pourrait être dû à un retard de développement des cellules de Paneth. Par ailleurs, une modification qualitative du microbiote commensal, en période périnatale, conduit à une altération de la prolifération et à des dommages à l'ADN des cellules de l'épithélium (Payros, Secher et al. 2014). Une hypothèse serait que le SSM soit capable d'altérer la prolifération et/ou la différenciation cellulaire, au niveau de l'épithélium intestinal, modifiant ainsi le répertoire de PAM et la composition du microbiote intestinal. Il serait donc intéressant d'étudier non seulement le développement des cellules de Paneth mais aussi le renouvellement cellulaire pendant le SSM et ce, jusqu'au sevrage et à la mise en place des cellules de Paneth et d'un épithélium mature.

Nous nous sommes ensuite demandé si cette surpopulation de bactéries commensales avait des conséquences sur les fonctions intestinales et sur la réponse immunitaire vis-à-vis des antigènes luminaux. Le SSM augmente significativement les IgG et IgA anti-*E. coli* commensal sans modification de la réactivité vis-à-vis des antigènes alimentaires. De façon intéressante, le défaut de barrière intestinale observée chez les MICI est associé à une réponse humorale systémique contre les antigènes luminaux d'origine bactérienne et non pas alimentaire excluant une rupture de tolérance contre l'ensemble des antigènes luminaux (Frehn, Jansen et al. 2014). L'étude des populations spléniques par cytométrie en flux n'avait pas montré de différence chez les animaux stressés comparés aux témoins. Les animaux ayant subi le SSM présentaient une allodynie en réponse à une distension colorectale mais aucune modification de la perméabilité intestinale *in vivo* au Dextran-FITC 4 kDa ou *ex vivo* au FSS ou à la HRP n'avait été observée.

Nous nous sommes demandé si l'augmentation de la charge bactérienne en *E. coli* au niveau intestinal était responsable de la mise en place d'une réponse immunitaire humorale anti-*E. coli* et de l'hypersensibilité viscérale. Pour répondre à cette question, des souris adultes ont été gavées par un *E. coli* commensal afin de reproduire une surcharge bactérienne.

Pour ces expériences, un *E. coli* isolé de fèces de souris C3H/HeN rendu résistant à la streptomycine a été utilisé. Après 15 jours de gavage à 10^9 bactéries par jour, l'augmentation de la charge en *E. coli* commensales fécale et iléales était de 1.5 log, semblable à celle observée chez les animaux ayant subi le SSM. Un dénombrement des bactéries aérobies indiquait une augmentation de 1.5 log chez les animaux gavés, correspondant à l'augmentation globale des *E. coli*. Cette surpopulation bactérienne induite par gavage était

capable de reproduire l'augmentation de sensibilité viscérale et la réponse IgG plasmatique anti-*E. coli*.

Comme l'augmentation de la charge en *E. coli* ne modifiait pas l'activité antimicrobienne du lysozyme dans les fèces, chez les animaux gavés, nous avons supposé que la diminution de l'activité antimicrobienne provoquée par le SSM était un défaut primaire qui serait en partie responsable de la surpopulation bactérienne intestinale observée et de l'hypersensibilité viscérale résultante. Afin de vérifier cette hypothèse, plusieurs approches sont possibles. Un protocole de type préventif consisterait à compenser le défaut d'activité antimicrobienne chez les animaux stressés. Un suivi de la population fécale d'*E. coli* dès la fin du SSM permettrait de savoir à quel moment la surpopulation bactérienne se met en place. A partir de ce moment, un gavage quotidien par du lysozyme pourrait être alors réalisé jusqu'à l'âge de 45 jours. Bien que *E. coli* soit une bactérie Gram négative, nous avons pu montrer que le lysozyme avait une activité antimicrobienne contre l'*E. coli* commensal isolé de notre souche de souris (figure 18). Un suivi quotidien de la population d'*E. coli* permettrait de savoir si un gavage par le lysozyme pourrait prévenir la surpopulation bactérienne ainsi que la viscérosensibilité et la réponse humorale contre *E. coli*.

Activité antimicrobienne du lysozyme sur *Bacillus megaterium* 11 et sur *E. coli* commensal

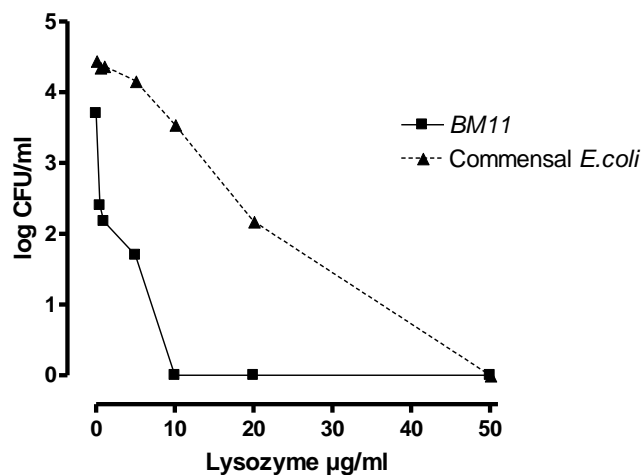


Figure 18 : Activité antimicrobienne du lysozyme

*Bien que *E. coli* soit une souche Gram négative et que le lysozyme soit plus efficace sur les bactéries Gram positive, il semble que la souche d'*E. coli* isolée de notre souche de souris soit sensible au lysozyme. (Bm11 : *Bacillus megaterium* 11)*

Une autre approche consisterait à utiliser des animaux présentant un défaut d'activité antimicrobienne de manière constitutive et à mesurer leur charge bactérienne fécale et leur sensibilité viscérale. La « matrix metalloproteinase-7 » ou MMP7 est une enzyme qui permet

le clivage de certains peptides antimicrobiens dans les cellules de Paneth, les rendant fonctionnels. Les souris MMP7^{-/-} présentent un défaut d'activité antimicrobienne et des modifications de son microbiote commensal sans modification de quantité bactérienne (Salzman, Hung et al. 2010). En effet, le défaut de MMP7 ne touche qu'un nombre réduit de PAM contenu dans les cellules de Paneth. Bien que l'activité antimicrobienne soit diminuée, elle ne semble pas permettre la pullulation bactérienne dans ce modèle, limitant son intérêt pour étudier le SIBO. Le gène Sox9 est nécessaire dans la différenciation cellulaire et en particulier des cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle (Bastide, Darido et al. 2007). Les souris Sox9^{-/-} au niveau de l'intestin (système Cre-Lox) ne présentent pas de cellules de Paneth (Fernandez, Regnault et al. 2008). Il serait alors intéressant d'analyser leur microbiote ainsi que leur sensibilité viscérale et la réponse humorale vis-à-vis de ce dernier. Toutefois, ces souris sont dépourvues de certaines cellules souches Irg5 au fond des cryptes pouvant altérer l'épithélium intestinal (Bastide, Darido et al. 2007). Math1 est un facteur de transcription important dans la différenciation des cellules sécrétrices de l'intestin. Les souris Math1^{-/-} au niveau de l'intestin (système Cre-Lox) ne développent aucune cellule de Paneth, confirmé par une absence d'expression du lysozyme (Durand, Donahue et al. 2012). Néanmoins, Math1 contrôle également la différenciation des cellules à mucus et la perte de ce facteur de transcription conduit également à la perte de ces cellules (Yang, Bermingham et al. 2001). Une altération du mucus semble donc évidente chez ces animaux. Or le mucus joue un rôle important dans la concentration des peptides antimicrobiens à la surface de l'épithélium ainsi que dans la limitation du contact avec le microbiote commensal. Ces modèles semblent néanmoins pertinents et complémentaires dans la compréhension du rôle des cellules de Paneth et de l'activité antimicrobienne dans l'établissement de défauts observés par un stress de séparation maternelle.

L'utilisation des modèles SOX9 et Math1 semblent les plus adaptés pour montrer le rôle des cellules de Paneth dans le développement du SIBO. Nous avons commencé une collaboration autour des souris SOX9 avec le Dr Lacroix-Lamandé, Equipe Apicomplexes et Immunité Mucosale (AIM), UMR 1282 INRA/Université-Infectiologie et Santé Publique (ISP), Centre INRA Val de Loire, Nouzilly, FRANCE

Les expérimentations sont prévues dans les prochains mois et nous permettrons de compléter les résultats obtenus pour le second papier.

III. Le rôle de la mère dans les conséquences du SSM sur l'homéostasie intestinale chez la descendance adulte.

Comme le fond génétique et la période de réalisation du SSM, le comportement maternel est important dans la perception du SSM. Tout d'abord, le SSM sur l'intégralité de la portée induit un niveau de réponse au stress supérieur chez la mère à celui observé lors de la séparation partielle de la portée (Rosztochy, Fioramonti et al. 2003). A la fin du SSM, lorsque la portée est remise dans le nid, les mères ayant été séparées de la portée passent plus de temps dans le nid (Millstein and Holmes 2007). Malgré tout, le déficit du temps de léchage et de toilettage conduit à un comportement plus anxieux et dépressif, chez la descendance adulte (Weaver, Cervoni et al. 2004). Il a même été démontré une corrélation positive entre les effets chez l'animal adulte et la quantité de léchage selon que le nouveau-né est avec sa mère d'origine ou avec une mère adoptive (Francis, Diorio et al. 1999). Les conséquences du SSM sur la descendance font l'objet de nombreuses études et sont de mieux en mieux décrites et caractérisées. Cependant, le rôle du stress sur la physiologie de la mère dans ce modèle n'est pas décrit. L'incidence des changements physiologiques de la mère liés au stress perçu lors de la séparation de sa portée sur la fonction de barrière de l'intestin reste peu connue.

Afin de décrire et comprendre le rôle de la mère dans les altérations de la barrière intestinale chez la descendance adulte, dans le modèle de SSM, nous avons réalisé des expérimentations préliminaires en suivant un protocole d'adoption de portées. Le SSM a été réalisé entre le 2^{ème} et le 15^{ème} jour de vie. Nous avons choisi, pour ces résultats préliminaires, de suivre la perméabilité intestinale au FD4 chez la descendance âgée de 45 jours. A la fin du dernier jour de stress, les souriceaux sont alors âgés de 15 jours. Les portées ont été mélangées selon le schéma suivant (figure 19).

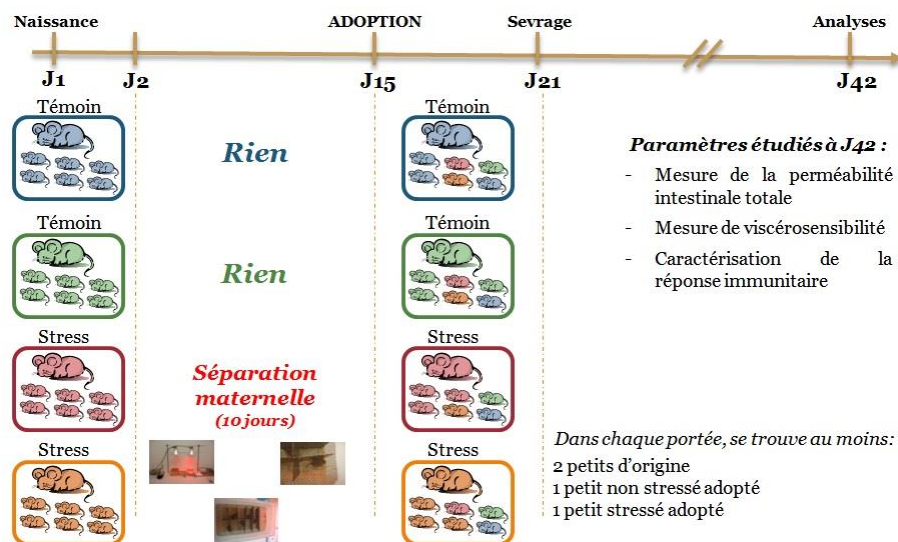
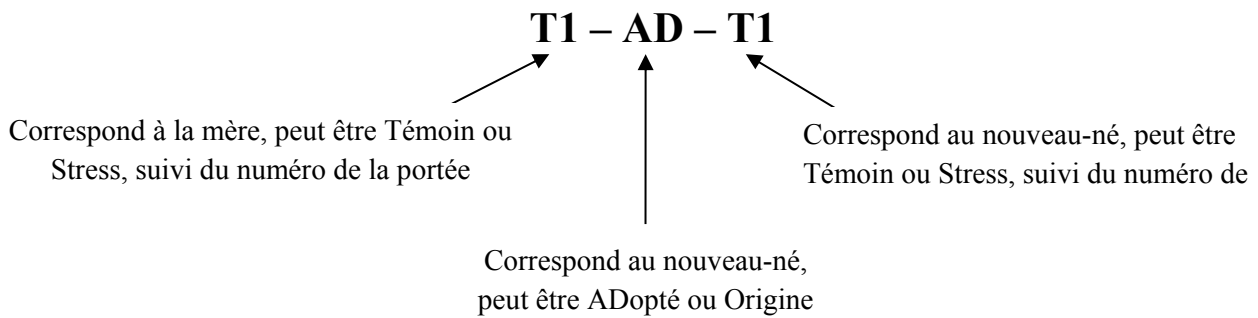


Figure 19 : Protocole d'adoption suite à une SSM chez la souris C3H/HeN

La nomenclature correspond à :



L'objectif est d'avoir dans chaque portée Témoin :

- ✓ Un nouveau-né T1-O-T1 (mère **Témoin 1**, **O**rigine, **Témoin 1**) de la portée d'origine correspondant à un individu témoin n'ayant subi ni le SSM ni l'adoption.
- ✓ Un nouveau-né adopté T1-AD-T1 (mère **Témoin 1**, **AD**opté, nouveau-né **Témoin 1**) d'une portée « Témoin » correspondant à un individu n'ayant pas subi le SSM mais adopté.
- ✓ Un nouveau-né adopté T1-AD-S1 (mère **Témoin 1**, **AD**opté, nouveau-né ayant subi le **Stress 1**) d'une portée « Stressé » correspondant à un individu ayant subi le SSM et l'adoption.

L'objectif est d'avoir dans chaque portée stressée :

- ✓ Un nouveau-né S1-O-S1 (mère **Stress 1**, **O**rigine, **Stress 1**) de la portée d'origine correspondant à un individu stressé ayant subi le SSM.
- ✓ Un nouveau-né adopté S1-AD-S1 (mère **Stress 1**, **AD**opté, nouveau-né **Stress 1**) d'une portée « Stressé » correspondant à un individu ayant subi le SSM et l'adoption.
- ✓ Un nouveau-né adopté S1-AD-T1 (mère **Stress 1**, **AD**opté, nouveau-né **Témoin 1**) d'une portée « Témoin » correspondant à un individu n'ayant pas subi le SSM.

Les portées restent dans ce schéma jusqu'au moment du sevrage (environ 8 jours) et sont analysés après 45 jours de vie. Comme la modification de perméabilité n'a été observée que chez les mâles, seuls les animaux mâles ont été analysés dans cette étude préliminaire.

Les adoptions de souriceaux âgés de 15 jours ont été tolérées par les mères. La mesure de la perméabilité intestinale totale *in vivo* au FD4 chez les jeunes adultes a montré (figure 20):

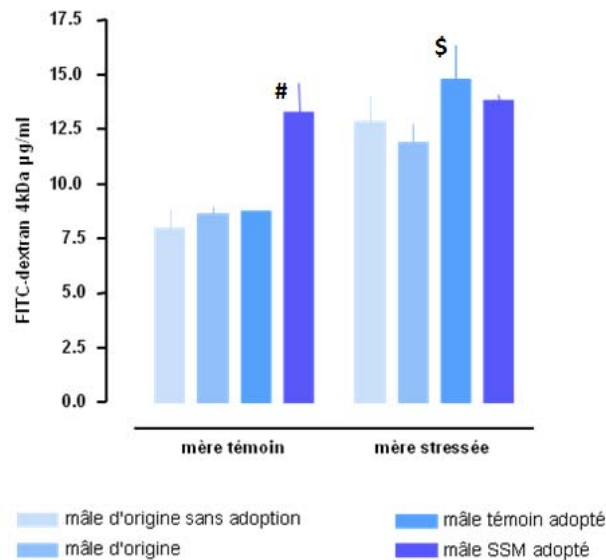


Figure 20 : Mesure de la perméabilité intestinale totale au FITC Dextran 4kDa

- ✓ L'adoption n'entraîne pas de modification de la perméabilité intestinale au FD4 chez les animaux témoins
- ✓ Les animaux témoins adoptés par une mère ayant subi le SSM présentent une augmentation de la perméabilité intestinale totale, d'un niveau semblable à celui des animaux stressés (représentation #, $p < 0.05$)
- ✓ Les animaux ayant subi le SSM et adoptés par une mère témoin ont une perméabilité intestinale semblable à celle des animaux stressés sans adoption (représentation \$, $p < 0.05$)

L'augmentation de perméabilité chez le jeune adulte ayant subi le SSM peut être transmise par une mère stressée à un nouveau-né témoin âgé de 15 jours et ce, après seulement 8 jours de contact après l'arrêt du SSM. Néanmoins, les épisodes successifs de SSM conduisent à un défaut de la perméabilité intestinale qui ne semble pas pouvoir être corrigé par une adoption par une mère non stressée. Il semblerait donc que, lors du SSM, la physiologie de la mère soit altérée et conduise à une augmentation de la perméabilité intestinale chez les nouveau-nés dont elle s'occupe. Une hypothèse pour expliquer cette transmission mère-nouveau-né serait via la lactation. A la naissance, le système immunitaire du nouveau-né est immature et son éducation passe aussi par l'apport d'anticorps, comme les IgA, et de PAM par le lait maternel. Mais de nombreuses autres molécules passent également

de la mère au nouveau-né par cette voie comme des ligands bactériens, des modèles antimicrobiennes comme le lysozyme et la lactoférine, des hormones, en particulier les hormones du stress comme la corticostérone. L'administration de corticostérone via l'eau de boisson à des souris durant la lactation induit une diminution des niveaux de corticostérone circulant chez la descendance et ce, même après l'induction d'un stress à l'âge adulte mettant en lumière un défaut de l'axe HPA (Catalani, Marinelli et al. 1993). Des travaux réalisés chez le rat montrent que les niveaux circulants de corticostérone chez la mère sont augmentés après un SSM et qu'ils seraient transmis à la descendance via la lactation (Catalani, Alema et al. 2013). Les souris mâles ayant subi le SSM présentent une diminution de niveaux circulants de corticostérone. Peut-être cela est-il induit par un apport plus important en corticostérone via le lait maternel durant le SSM. Il serait donc intéressant d'analyser ce lait avant, pendant et après le SSM et jusqu'à sevrage de l'animal. Une mesure de la corticostérone circulante, pendant et après le SSM, chez la mère, permettrait de voir si le SSM induit une augmentation de la corticostérone. De plus, une analyse du lait maternel permettrait de voir si cette augmentation se retrouve dans le lait, ce qui pourrait se transmettre à la descendance.

Ce modèle d'adoption permettrait de mieux comprendre le rôle de la mère dans l'établissement des perturbations à long terme induit par le SSM sur l'homéostasie intestinale. Les résultats présentés ici restent néanmoins préliminaires. Seule la perméabilité intestinale a pu être mesurée. Une mesure de sensibilité viscérale, de la réponse immunitaire et des dosages de la corticostérone seront nécessaires.

IV. Le SSM induit des conséquences différentes chez le jeune adulte en fonction de son sexe

Le SSM chez la souris conduit donc à des altérations de la barrière intestinale. En effet, quel que soit le sexe des animaux, le SSM augmente la sensibilité viscérale, conduit à un défaut des cellules de Paneth associé à une diminution de l'activité antimicrobienne. Cette altération de la barrière est associée à une rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes bactériens de la lumière intestinale (augmentation de la réponse humorale systémique vis-à-vis d'un *E. coli* commensal) (Figure 21).

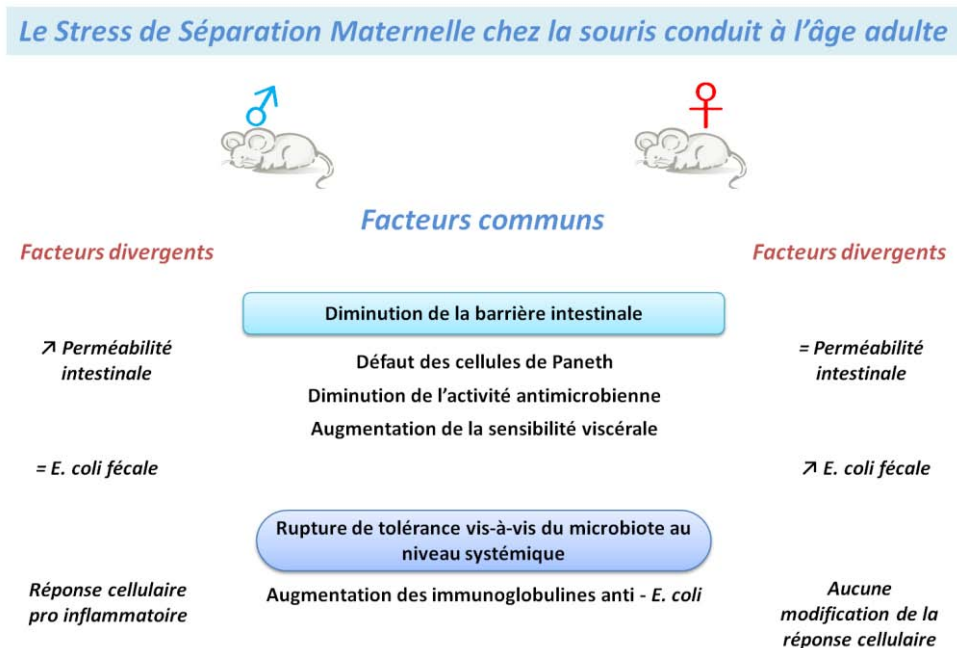


Figure 21 : Résumé des résultats obtenus dans le modèle de SSM chez la souris

Le SSM chez la souris conduit à une altération de la barrière intestinale associée à une rupture de la tolérance vis-à-vis du microbiote au niveau systémique. Toutefois, un dimorphisme sexuel a été mis en évidence dans ce modèle, que ce soit au vis-à-vis de paramètres au niveau local ou systémique

Dans notre modèle de SSM chez la souris, nous avons pu également mettre en évidence un dimorphisme sexuel. Les conséquences du SSM chez la souris C3H/HeN sur la réponse immunitaire, le microbiote et la perméabilité intestinale sont différentes en fonction du sexe de l'animal. Il existe une littérature abondante et parfois confuse sur les différences entre mâles et femelles observées sur différents paramètres physiologiques et dans différents modèles expérimentaux. Nous avons essayé ici de donner quelques pistes de réflexion permettant de comprendre le dimorphisme sexuel, observé dans ce travail de thèse, sur le SSM. Il est également décrit dans la littérature qu'il existe des différences sur la susceptibilité à certaines pathologies selon le sexe de l'individu. En effet, les individus mâles présentent des profils cellulaires de types Th1 (production d'IFN γ) et sont plus sensibles aux infections,

qu'elles soient bactériennes, virales ou fongiques (Yamamoto, Tomioka et al. 1990) (Klein 2000). Cela est en concordance avec les résultats obtenus dans ce travail de thèse. Le modèle de SSM chez les animaux mâle met en évidence un profil pro inflammatoire de type Th1. Dans les deux modèles, on observe une réponse anormale vis-à-vis du microbiote commensale.

De nombreux travaux mettent en évidence des conséquences comportementales différentes du SSM entre les animaux mâles et femelles à l'âge adulte. En effet, des souris femelles soumises au SSM présentent un comportement plus anxieux durant un test d'investigation sociale et une diminution de leur intérêt vis-à-vis des animaux mâles à l'âge adulte (Tsuda and Ogawa 2012). En parallèle, les souris mâles néostressés ont un comportement moins agressif que les animaux témoins durant la période péripubère (Tsuda, Yamaguchi et al. 2011). Des facteurs biologiques, psychologiques et socioculturels contribuent également aux différences dans la perception de la douleur entre les deux sexes (Fillingim 2000). En particulier, les femmes ont un risque plus important de développer des troubles liés au stress comme les fibromyalgies (Wolfe, Ross et al. 1995) et de la douleur chronique (Verhaak, Kerssens et al. 1998). De plus, les animaux femelles sont plus sensibles à la distension colorectale que les animaux mâles (Rosztoczy, Fioramonti et al. 2003). Différentes études montrent les effets de l'âge et du sexe sur la réponse de l'axe HPA à des événements stressants (Otte, Hart et al. 2005). De même, il existe une grande variation de la réponse de l'axe HPA durant le cycle ovarien, avec une réactivité accrue durant la phase lutéale (Tersman, Collins et al. 1991) (Kirschbaum, Kudielka et al. 1999). De plus, cette réponse est plus faible entre la puberté et la ménopause (Kudielka, Hellhammer et al. 1998). Ces effets seraient en lien avec les récepteurs aux œstrogènes chez les animaux femelles (Tsuda, Yamaguchi et al. 2014). Les rates ovariectomisées montrent des taux de corticostérone plasmatique plus faibles que les animaux contrôles et ces effets peuvent être reversés par les œstrogènes (Atkinson and Waddell 1997). L'œstradiol inhibe les réponses de l'axe HPA au stress via les récepteurs « *estrogen receptor* » (ER) α (Young, Carlson et al. 2001) (Weiser and Handa 2009).

Les récepteurs aux œstrogènes ER α et β , sont exprimés au niveau de l'intestin chez les 2 sexes (Kawano, Koji et al. 2004). ER α est exprimé au niveau de la muqueuse et des neurones des plexus nerveux. ER β a été identifié sur les cellules épithéliales ou les neurones du plexus sous muqueux et myentériques (Konstantinopoulos, Kominea et al. 2003). Récepteur dominant dans l'épithélium colique, ER β est deux fois plus exprimé chez la femme comparée à l'homme (Thomas, Xu et al. 1993) (Campbell-Thompson, Reyher et al. 2001). Les récepteurs ER sont également retrouvés sur les cellules immunitaires et participent à leur

fonctionnalité. ER α est exprimé dans les lymphocytes T et B, dans les cellules dendritiques, les mastocytes, les macrophages ou monocytes et les NK (Grimaldi, Cleary et al. 2002) (Phiel, Henderson et al. 2005). ER β est principalement retrouvé sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et les lymphocytes B (Phiel, Henderson et al. 2005). Les œstrogènes diminuent l'infiltration neutrophilaire et l'activité de myéloperoxydase (Verdu, Deng et al. 2002) (Houdeau, Moriez et al. 2007). Ils possèdent également des effets anti inflammatoires en limitant la dégranulation mastocytaire et la libération de cytokines pro inflammatoires (Harnish, Albert et al. 2004).

Les hormones et leurs récepteurs sont respectivement sécrétés et exprimés différemment en fonction du sexe. Comme ces hormones et leurs récepteurs jouent un rôle important dans la réponse au stress, ils contribuent surement au dimorphisme sexuel observé dans le modèle de SSM présenté ici.

CONCLUSION GENERALE

Ces travaux de thèse nous ont permis de mettre en évidence une empreinte du stress de séparation maternelle à l'âge adulte, capable d'induire des modifications profondes qui perturbent l'homéostasie intestinale et qui se retrouvent jusqu'au niveau systémique. Ce travail a permis une meilleure compréhension du rôle du stress dans le déclenchement et/ou l'entretien de pathologies intestinales multifactorielles, offrant ainsi de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

Le SSM chez la souris male diminue les fonctions de barrière intestinale conduisant à une réponse immunitaire humorale et cellulaire au niveau systémique dirigée contre les antigènes microbiennes. Tous ces résultats montrent que la survenue d'évènements traumatiques durant la période périnatale reproduit les grandes caractéristiques des pathologies digestives à savoir une rupture de la barrière intestinale associée à une réponse immunitaire dirigée contre le microbiote intestinal chez des individus sains sans symptômes apparents et pourrait conduire au déclenchement de pathologies chez des individus génétiquement prédisposés.

Le SSM chez la souris femelle altère la fonctionnalité des cellules de Paneth, qui serait à l'origine d'une surpopulation bactérienne responsable d'une hypersensibilité viscérale. Un défaut des cellules de Paneth a été observé dans la maladie de Crohn mais leur rôle dans l'IBS et le SIBO ne sont pas connus. Les résultats de cette étude devront être complétés pour établir un lien entre défaut de fonctionnalité des cellules de Paneth, surpopulation bactérienne et hypersensibilité viscérale.

Références bibliographiques

- (2012). "Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research." PLoS One **7**(6): e39315.
- Adams, R. J., S. P. Heazlewood, et al. (2008). "IgG antibodies against common gut bacteria are more diagnostic for Crohn's disease than IgG against mannan or flagellin." Am J Gastroenterol **103**(2): 386-96.
- Adkins, B. (2013). "Neonatal immunology: responses to pathogenic microorganisms and epigenetics reveal an "immunodiverse" developmental state." Immunol Res **57**(1-3): 246-57.
- Agerberth, B., J. Charo, et al. (2000). "The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations." Blood **96**(9): 3086-93.
- Ait-Belgnaoui, A., S. Bradesi, et al. (2005). "Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase." Pain **113**(1-2): 141-7.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Alexander, J. W., L. Gianotti, et al. (1991). "Distribution and survival of Escherichia coli translocating from the intestine after thermal injury." Ann Surg **213**(6): 558-66; discussion 566-7.
- Allen, A., G. Flemstrom, et al. (1993). "Gastrointestinal mucosal protection." Physiol Rev **73**(4): 823-57.
- Alleva, E., A. Caprioli, et al. (1989). "Litter gender composition affects maternal behavior of the primiparous mouse dam (Mus musculus)." J Comp Psychol **103**(1): 83-7.
- Altmann, G. G. (1983). "Morphological observations on mucus-secreting nongoblet cells in the deep crypts of the rat ascending colon." Am J Anat **167**(1): 95-117.
- Arboleya, S., N. Salazar, et al. (2012). "Assessment of intestinal microbiota modulation ability of Bifidobacterium strains in in vitro fecal batch cultures from preterm neonates." Anaerobe **19**: 9-16.
- Arias, C., A. C. Solari, et al. (2010). "Social isolation and stress related hormones modulate the stimulating effect of ethanol in preweanling rats." Behav Brain Res **211**(1): 64-70.
- Arpaia, N., C. Campbell, et al. (2013). "Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation." Nature **504**(7480): 451-5.
- Arranz, A., Y. Juarranz, et al. (2008). "VIP balances innate and adaptive immune responses induced by specific stimulation of TLR2 and TLR4." Peptides **29**(6): 948-56.
- Arrieta, M. C. and B. B. Finlay (2012). "The commensal microbiota drives immune homeostasis." Front Immunol **3**: 33.
- Arroyo, A. G., J. T. Yang, et al. (1996). "Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis." Cell **85**(7): 997-1008.
- Arumugam, M., J. Raes, et al. (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." Nature **473**(7346): 174-80.
- Atarashi, K., T. Tanoue, et al. (2011). "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species." Science **331**(6015): 337-41.
- Atkinson, H. C. and B. J. Waddell (1997). "Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle." Endocrinology **138**(9): 3842-8.
- Attar, A., B. Flourie, et al. (1999). "Antibiotic efficacy in small intestinal bacterial overgrowth-related chronic diarrhea: a crossover, randomized trial." Gastroenterology **117**(4): 794-7.
- Atuma, C., V. Strugala, et al. (2001). "The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(5): G922-9.
- Ayabe, T., H. Wulff, et al. (2002). "Modulation of mouse Paneth cell alpha-defensin secretion by mIKCa1, a Ca²⁺-activated, intermediate conductance potassium channel." J Biol Chem **277**(5): 3793-800.
- Azad, M. B., T. Konya, et al. (2013). "Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months." CMAJ **185**(5): 385-94.

- Bailey, M. T. and C. L. Coe (1999). "Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys." *Dev Psychobiol* **35**(2): 146-55.
- Bals, R. and J. M. Wilson (2003). "Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides." *Cell Mol Life Sci* **60**(4): 711-20.
- Balzan, S., C. de Almeida Quadros, et al. (2007). "Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact." *J Gastroenterol Hepatol* **22**(4): 464-71.
- Bamias, G., C. Martin, 3rd, et al. (2003). "Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease." *J Immunol* **171**(9): 4868-74.
- Barbara, G., V. Stanghellini, et al. (2004). "Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome." *Gastroenterology* **126**(3): 693-702.
- Bargatzte, R. F., M. A. Jutila, et al. (1995). "Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined." *Immunity* **3**(1): 99-108.
- Barkla, D. H. and P. J. Tutton (1974). "Proceedings: Experimentally induced accumulation and depletion of Paneth cell granules." *J Anat* **118**(Pt 2): 389.
- Barreau, F., C. Cartier, et al. (2007). "Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay." *J Physiol* **580**(Pt 1): 347-56.
- Barreau, F., J. D. de Lahitte, et al. (2006). "Neonatal maternal deprivation promotes *Nippostrongylus brasiliensis* infection in adult rats." *Brain Behav Immun* **20**(3): 254-60.
- Barreau, F., L. Ferrier, et al. (2004). "Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats." *Gut* **53**(4): 501-6.
- Bastide, P., C. Darido, et al. (2007). "Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium." *J Cell Biol* **178**(4): 635-48.
- Bates, K. E. and P. M. Whittington (2007). "Semaphorin 2a secreted by oenocytes signals through plexin B and plexin A to guide sensory axons in the *Drosophila* embryo." *Dev Biol* **302**(2): 522-35.
- Bechinger, B. and K. Lohner (2006). "Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides." *Biochim Biophys Acta* **1758**(9): 1529-39.
- Beer, H. D., C. Munding, et al. (2002). "The estrogen-responsive B box protein: a novel regulator of keratinocyte differentiation." *J Biol Chem* **277**(23): 20740-9.
- Bernet, M. F., D. Brassart, et al. (1993). "Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions." *Appl Environ Microbiol* **59**(12): 4121-8.
- Bernink, J. H., C. P. Peters, et al. (2013). "Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues." *Nat Immunol* **14**(3): 221-9.
- Bettelheim, K. A., C. H. Teoh-Chan, et al. (1974). "Spread of *Escherichia coli* colonizing newborn babies and their mothers." *J Hyg (Lond)* **73**(3): 383-7.
- Bevins, C. L. and N. H. Salzman (2011). "Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis." *Nat Rev Microbiol* **9**(5): 356-68.
- Biragyn, A., P. A. Ruffini, et al. (2002). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." *Science* **298**(5595): 1025-9.
- Bleich, A., P. Kirsch, et al. (2008). "*Klebsiella oxytoca*: opportunistic infections in laboratory rodents." *Lab Anim* **42**(3): 369-75.
- Boirivant, M., A. Amendola, et al. (2008). "A transient breach in the epithelial barrier leads to regulatory T-cell generation and resistance to experimental colitis." *Gastroenterology* **135**(5): 1612-1623 e5.
- Bonneau, R. H., J. F. Sheridan, et al. (1993). "Stress-induced modulation of the primary cellular immune response to herpes simplex virus infection is mediated by both adrenal-dependent and independent mechanisms." *J Neuroimmunol* **42**(2): 167-76.
- Borsutzky, S., B. B. Cazac, et al. (2004). "TGF-beta receptor signaling is critical for mucosal IgA responses." *J Immunol* **173**(5): 3305-9.

- Bot, I., S. C. de Jager, et al. (2010). "The neuropeptide substance P mediates adventitial mast cell activation and induces intraplaque hemorrhage in advanced atherosclerosis." Circ Res **106**(1): 89-92.
- Bouhnik, Y., S. Alain, et al. (1999). "Bacterial populations contaminating the upper gut in patients with small intestinal bacterial overgrowth syndrome." Am J Gastroenterol **94**(5): 1327-31.
- Boullier, S., M. Tanguy, et al. (2009). "Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits." J Immunol **183**(9): 5879-85.
- Bradesi, S., H. Eutamene, et al. (2002). "Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats." Neurogastroenterol Motil **14**(1): 75-82.
- Bradette, M., M. Delvaux, et al. (1994). "Evaluation of colonic sensory thresholds in IBS patients using a barostat. Definition of optimal conditions and comparison with healthy subjects." Dig Dis Sci **39**(3): 449-57.
- Brandt, L. J., D. Bjorkman, et al. (2002). "Systematic review on the management of irritable bowel syndrome in North America." Am J Gastroenterol **97**(11 Suppl): S7-26.
- Brandtzaeg, P. (2010). "Food allergy: separating the science from the mythology." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(7): 380-400.
- Brandtzaeg, P., K. Bjerke, et al. (1987). "Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract." Ann Allergy **59**(5 Pt 2): 21-39.
- Brenchley, J. M. and D. C. Douek (2012). "Microbial translocation across the GI tract." Annu Rev Immunol **30**: 149-73.
- Brenchley, J. M., M. Paiardini, et al. (2008). "Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections." Blood **112**(7): 2826-35.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol **3**(3): 238-50.
- Broquet, A. H., Y. Hirata, et al. (2011). "RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium." J Immunol **186**(3): 1618-26.
- Bucki, R., K. Leszczynska, et al. (2010). "Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **58**(1): 15-25.
- Burger-van Paassen, N., M. van der Sluis, et al. (2011). "Colitis development during the suckling-weaning transition in mucin Muc2-deficient mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **301**(4): G667-78.
- Cadwell, K., J. Y. Liu, et al. (2008). "A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells." Nature **456**(7219): 259-63.
- Calcagni, E. and I. Elenkov (2006). "Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases." Ann N Y Acad Sci **1069**: 62-76.
- Campbell-Thompson, M., K. K. Reyher, et al. (2001). "Immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in gastric epithelium and enteric neurons." J Endocrinol **171**(1): 65-73.
- Cardinale, F., V. Friman, et al. (1992). "Aberrations in titre and avidity of serum IgM and IgG antibodies to microbial and food antigens in IgA deficiency." Scand J Immunol **36**(2): 279-83.
- Carroll, I. M., T. Ringel-Kulka, et al. (2012). "Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome." Neurogastroenterol Motil **24**(6): 521-30, e248.
- Cash, H. L., C. V. Whitham, et al. (2006). "Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin." Science **313**(5790): 1126-30.
- Castagliuolo, I., J. T. Lamont, et al. (1996). "Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): G884-92.
- Castiglione, F., A. Rispo, et al. (2003). "Antibiotic treatment of small bowel bacterial overgrowth in patients with Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther **18**(11-12): 1107-12.
- Catalani, A., G. S. Alema, et al. (2013). "Maternal corticosterone effects on hypothalamus-pituitary-adrenal axis regulation and behavior of the offspring in rodents." Neurosci Biobehav Rev **35**(7): 1502-17.

- Catalani, A., M. Marinelli, et al. (1993). "Progeny of mothers drinking corticosterone during lactation has lower stress-induced corticosterone secretion and better cognitive performance." Brain Res **624**(1-2): 209-15.
- Cebra, J. J., S. B. Periwal, et al. (1998). "Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses." Dev Immunol **6**(1-2): 13-8.
- Cella, M., A. Fuchs, et al. (2009). "A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity." Nature **457**(7230): 722-5.
- Cepek, K. L., S. K. Shaw, et al. (1994). "Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin." Nature **372**(6502): 190-3.
- Chamaillard, M., S. E. Girardin, et al. (2003). "Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation." Cell Microbiol **5**(9): 581-92.
- Chamouard, P., F. Monneaux, et al. (2009). "Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naive Crohn's disease." Dig Dis Sci **54**(10): 2084-93.
- Champagne, F. A., D. D. Francis, et al. (2003). "Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development." Physiol Behav **79**(3): 359-71.
- Chang, D. E., D. J. Smalley, et al. (2004). "Carbon nutrition of Escherichia coli in the mouse intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7427-32.
- Chang, L., M. Adeyemo, et al. (2012). "Serum and colonic mucosal immune markers in irritable bowel syndrome." Am J Gastroenterol **107**(2): 262-72.
- Chao, K., S. Zhang, et al. (2014). "Imbalances of CD4(+) T-cell subgroups in Crohn's disease and their relationship with disease activity and prognosis." J Gastroenterol Hepatol **29**(10): 1808-14.
- Chassin, C., M. Kocur, et al. (2010). "miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine." Cell Host Microbe **8**(4): 358-68.
- Cheng, D. Q., Y. Li, et al. (2014). "Molecular evolution of the primate alpha-/theta-defensin multigene family." PLoS One **9**(5): e97425.
- Cheng, H. and C. P. Leblond (1974). "Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types." Am J Anat **141**(4): 537-61.
- Chiba, H., T. Kojima, et al. (2006). "The significance of interferon-gamma-triggered internalization of tight-junction proteins in inflammatory bowel disease." Sci STKE **2006**(316): pe1.
- Chirido, F. G., O. R. Millington, et al. (2005). "Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria." Eur J Immunol **35**(6): 1831-40.
- Chowdhury, S. R., D. E. King, et al. (2007). "Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets." BMC Genomics **8**: 215.
- Christa, L., F. Carnot, et al. (1996). "HIP/PAP is an adhesive protein expressed in hepatocarcinoma, normal Paneth, and pancreatic cells." Am J Physiol **271**(6 Pt 1): G993-1002.
- Clarke, T. B., K. M. Davis, et al. (2010). "Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity." Nat Med **16**(2): 228-31.
- Claud, E. C., L. Lu, et al. (2004). "Developmentally regulated IkappaB expression in intestinal epithelium and susceptibility to flagellin-induced inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7404-8.
- Clermont, O., S. Bonacorsi, et al. (2000). "Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group." Appl Environ Microbiol **66**(10): 4555-8.
- Collins, S. M., K. McHugh, et al. (1996). "Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress." Gastroenterology **111**(6): 1509-15.
- Comalada, M., E. Bailon, et al. (2006). "The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype." J Cancer Res Clin Oncol **132**(8): 487-97.
- Cone, R. A. (2009). "Barrier properties of mucus." Adv Drug Deliv Rev **61**(2): 75-85.
- Cong, Y., T. Feng, et al. (2009). "A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(46): 19256-61.
- Conibear, A. C. and D. J. Craik (2014). "The chemistry and biology of theta defensins." Angew Chem Int Ed Engl **53**(40): 10612-23.

- Cooney, R., J. Baker, et al. (2010). "NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation." *Nat Med* **16**(1): 90-7.
- Crabbe, P. A., D. R. Nash, et al. (1970). "Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice." *Lab Invest* **22**(5): 448-57.
- Cremon, C., F. Pallotti, et al. (2008). "Antiflagellin antibodies suggest infective participation in irritable bowel syndrome pathogenesis." *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **2**(6): 735-40.
- Cross, L. J., A. G. Beck-Sickinger, et al. (1996). "Structure activity studies of mast cell activation and hypotension induced by neuropeptide Y (NPY), centrally truncated and C-terminal NPY analogues." *Br J Pharmacol* **117**(2): 325-32.
- Crouzet, L., E. Gaultier, et al. (2013). "The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota." *Neurogastroenterol Motil* **25**(4): e272-82.
- Cupedo, T., N. K. Crellin, et al. (2009). "Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells." *Nat Immunol* **10**(1): 66-74.
- Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, et al. (1998). "Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease." *Gastroenterology* **115**(6): 1405-13.
- Das, P., A. K. Singh, et al. (2013). "Composition of Escherichia coli population in the neonatal gut: phylogroups and virulence determinants." *J Med Microbiol* **62**(Pt 11): 1680-7.
- Davidson, D. J., A. J. Currie, et al. (2004). "The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization." *J Immunol* **172**(2): 1146-56.
- Davis, C. W. and B. F. Dickey (2008). "Regulated airway goblet cell mucin secretion." *Annu Rev Physiol* **70**: 487-512.
- de Muinck, E. J., T. Oien, et al. (2011). "Diversity, transmission and persistence of Escherichia coli in a cohort of mothers and their infants." *Environ Microbiol Rep* **3**(3): 352-9.
- Dekel, R., D. A. Drossman, et al. (2013). "The use of psychotropic drugs in irritable bowel syndrome." *Expert Opin Investig Drugs* **22**(3): 329-39.
- Deuring, J. J., C. de Haar, et al. (2012). "Absence of ABCG2-mediated mucosal detoxification in patients with active inflammatory bowel disease is due to impeded protein folding." *Biochem J* **441**(1): 87-93.
- Di Nardo, G., G. Barbara, et al. (2014). "Neuroimmune interactions at different intestinal sites are related to abdominal pain symptoms in children with IBS." *Neurogastroenterol Motil* **26**(2): 196-204.
- Di Sabatino, A., M. M. Rosado, et al. (2006). "Splenic hypofunction and the spectrum of autoimmune and malignant complications in celiac disease." *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**(2): 179-86.
- Di Stefano, M., S. Malservisi, et al. (2000). "Rifaximin versus chlortetracycline in the short-term treatment of small intestinal bacterial overgrowth." *Aliment Pharmacol Ther* **14**(5): 551-6.
- Drasar, B. S. (1974). "Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora." *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **3**(0): 187-96.
- Ducrotte, P. (2010). "[Microbiota and irritable bowel syndrome]." *Gastroenterol Clin Biol* **34 Suppl 1**: S52-6.
- Duits, L. A., B. Ravensbergen, et al. (2002). "Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells." *Immunology* **106**(4): 517-25.
- Dupont, H. L. (2014). "Review article: evidence for the role of gut microbiota in irritable bowel syndrome and its potential influence on therapeutic targets." *Aliment Pharmacol Ther* **39**(10): 1033-42.
- Durand, A., B. Donahue, et al. (2012). "Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(23): 8965-70.
- Duriez, P., O. Clermont, et al. (2001). "Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations." *Microbiology* **147**(Pt 6): 1671-6.
- Edwards, E., S. Razvi, et al. (2004). "IgA deficiency: clinical correlates and responses to pneumococcal vaccine." *Clin Immunol* **111**(1): 93-7.

- Ehehalt, R., J. Wagenblast, et al. (2004). "Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in intestinal mucus of ulcerative colitis patients. A quantitative approach by nanoElectrospray-tandem mass spectrometry." *Scand J Gastroenterol* **39**(8): 737-42.
- Elenkov, I. J., D. A. Papanicolaou, et al. (1996). "Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications." *Proc Assoc Am Physicians* **108**(5): 374-81.
- Ellenbroek, B. A. and A. R. Cools (2000). "The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background." *Neuropsychopharmacology* **23**(1): 99-106.
- Escobar-Paramo, P., K. Grenet, et al. (2004). "Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates." *Appl Environ Microbiol* **70**(9): 5698-700.
- Estienne, M., J. Claustre, et al. (2010). "Maternal deprivation alters epithelial secretory cell lineages in rat duodenum: role of CRF-related peptides." *Gut* **59**(6): 744-51.
- Fagarasan, S. and T. Honjo (2003). "Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences." *Nat Rev Immunol* **3**(1): 63-72.
- Falk, P. G., L. V. Hooper, et al. (1998). "Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1157-70.
- Fallani, M., D. Young, et al. (2010). "Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **51**(1): 77-84.
- Fallon, P. G., S. J. Ballantyne, et al. (2006). "Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion." *J Exp Med* **203**(4): 1105-16.
- Farache, J., I. Koren, et al. (2013). "Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation." *Immunity* **38**(3): 581-95.
- Farache, J., E. Zigmond, et al. (2013). "Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense." *Immunol Cell Biol* **91**(3): 232-9.
- Farin, H. F., W. R. Karthaus, et al. (2014). "Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma." *J Exp Med* **211**(7): 1393-405.
- Favier, C. F., E. E. Vaughan, et al. (2002). "Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates." *Appl Environ Microbiol* **68**(1): 219-26.
- Fernandez, M. I., T. Pedron, et al. (2003). "Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells." *Immunity* **18**(6): 739-49.
- Fernandez, M. I., B. Regnault, et al. (2008). "Maturation of paneth cells induces the refractory state of newborn mice to *Shigella* infection." *J Immunol* **180**(7): 4924-30.
- Ferrier, L., L. Mazelin, et al. (2003). "Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice." *Gastroenterology* **125**(3): 795-804.
- Fihn, B. M., A. Sjoqvist, et al. (2000). "Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport." *Gastroenterology* **119**(4): 1029-36.
- Fillingim, R. B. (2000). "Sex, gender, and pain: women and men really are different." *Curr Rev Pain* **4**(1): 24-30.
- Finch, R. G. (1996). "Antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin. Rationale for clinical use." *Drugs* **51 Suppl 1**: 31-7.
- Fonken, L. K. and R. J. Nelson (2014). "The effects of light at night on circadian clocks and metabolism." *Endocr Rev* **35**(4): 648-70.
- Ford, A. C., B. M. Spiegel, et al. (2009). "Small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis." *Clin Gastroenterol Hepatol* **7**(12): 1279-86.
- Forstner, G. (1995). "Signal transduction, packaging and secretion of mucins." *Annu Rev Physiol* **57**: 585-605.
- Fortes, C., S. Farchi, et al. (2003). "Depressive symptoms lead to impaired cellular immune response." *Psychother Psychosom* **72**(5): 253-60.
- Fouhy, F., R. P. Ross, et al. (2012). "Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps." *Gut Microbes* **3**(3): 203-20.

- Francis, D., J. Diorio, et al. (1999). "Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat." *Science* **286**(5442): 1155-8.
- Francis, D. D., C. Caldji, et al. (1999). "The role of corticotropin-releasing factor--norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress." *Biol Psychiatry* **46**(9): 1153-66.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, et al. (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(34): 13780-5.
- Frehn, L., A. Jansen, et al. (2014). "Distinct patterns of IgG and IgA against food and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases." *PLoS One* **9**(9): e106750.
- Frey, A., K. T. Giannasca, et al. (1996). "Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting." *J Exp Med* **184**(3): 1045-59.
- Fritz, J. H., R. L. Ferrero, et al. (2006). "Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease." *Nat Immunol* **7**(12): 1250-7.
- Furusawa, Y., Y. Obata, et al. (2013). "Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells." *Nature* **504**(7480): 446-50.
- Gaboriau-Routhiau, V., S. Rakotobe, et al. (2009). "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses." *Immunity* **31**(4): 677-89.
- Gallo, R. L. and L. V. Hooper (2012). "Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine." *Nat Rev Immunol* **12**(7): 503-16.
- Gallo, R. L., K. J. Kim, et al. (1997). "Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse." *J Biol Chem* **272**(20): 13088-93.
- Ganz, T. (2004). "Antimicrobial polypeptides." *J Leukoc Biol* **75**(1): 34-8.
- Ganz, T. and R. I. Lehrer (1998). "Antimicrobial peptides of vertebrates." *Curr Opin Immunol* **10**(1): 41-4.
- Garcia-Rodenas, C. L., G. E. Bergonzelli, et al. (2006). "Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **43**(1): 16-24.
- Gareau, M. G., J. Jury, et al. (2006). "Neonatal maternal separation causes colonic dysfunction in rat pups including impaired host resistance." *Pediatr Res* **59**(1): 83-8.
- Gasbarrini, A., E. C. Lauritano, et al. (2007). "Small intestinal bacterial overgrowth: diagnosis and treatment." *Dig Dis* **25**(3): 237-40.
- Gaudier, E., M. Rival, et al. (2009). "Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon." *Physiol Res* **58**(1): 111-9.
- Gebhart, G. F. (1999). "Peripheral contributions to visceral hyperalgesia." *Can J Gastroenterol* **13 Suppl A**: 37A-41A.
- Gendler, S. J. and A. P. Spicer (1995). "Epithelial mucin genes." *Annu Rev Physiol* **57**: 607-34.
- Gerbe, F., J. H. van Es, et al. (2011). "Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium." *J Cell Biol* **192**(5): 767-80.
- Ghaleb, A. M., B. B. McConnell, et al. (2011). "Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Kruppel-like factor 4 gene." *Dev Biol* **349**(2): 310-20.
- Ghosh, D., E. Porter, et al. (2002). "Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5." *Nat Immunol* **3**(6): 583-90.
- Gilbert, P., S. Allan, et al. (2002). "Relationship of anhedonia and anxiety to social rank, defeat and entrapment." *J Affect Disord* **71**(1-3): 141-51.
- Gilliland, M. G., 3rd, J. R. Erb-Downward, et al. (2012). "Ecological succession of bacterial communities during conventionalization of germ-free mice." *Appl Environ Microbiol* **78**(7): 2359-66.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, et al. (2003). "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan." *Science* **300**(5625): 1584-7.
- Gitter, B. D., L. N. Boggs, et al. (2000). "Regulation of cytokine secretion and amyloid precursor protein processing by proinflammatory amyloid beta (A beta)." *Ann N Y Acad Sci* **917**: 154-64.

- Glaser, R., R. C. MacCallum, et al. (2001). "Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(8): M477-82.
- Glaser, R., T. F. Robles, et al. (2003). "Mild depressive symptoms are associated with amplified and prolonged inflammatory responses after influenza virus vaccination in older adults." Arch Gen Psychiatry **60**(10): 1009-14.
- Glocker, E. O., D. Kotlarz, et al. (2011). "IL-10 and IL-10 receptor defects in humans." Ann N Y Acad Sci **1246**: 102-7.
- Gonsalkorale, W. M., C. Perrey, et al. (2003). "Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component?" Gut **52**(1): 91-3.
- Gonzalez-Mariscal, L., S. Hernandez, et al. (2008). "Inventions designed to enhance drug delivery across epithelial and endothelial cells through the paracellular pathway." Recent Pat Drug Deliv Formul **2**(2): 145-76.
- Goodman, T. and L. Lefrancois (1988). "Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes." Nature **333**(6176): 855-8.
- Goral, V., M. Kucukoner, et al. (2010). "Mast cells count and serum cytokine levels in patients with irritable bowel syndrome." Hepatogastroenterology **57**(101): 751-4.
- Gordon, H. A. (1967). "A substance acting on smooth muscle in intestinal contents of germfree animals." Ann N Y Acad Sci **147**(2): 85-106.
- Gordon, S. M., J. Chaix, et al. (2012). "The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation." Immunity **36**(1): 55-67.
- Gribar, S. C., C. P. Sodhi, et al. (2009). "Reciprocal expression and signaling of TLR4 and TLR9 in the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis." J Immunol **182**(1): 636-46.
- Grimaldi, C. M., J. Cleary, et al. (2002). "Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation." J Clin Invest **109**(12): 1625-33.
- Gue, M., C. Del Rio-Lacheze, et al. (1997). "Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells." Neurogastroenterol Motil **9**(4): 271-9.
- Guslandi, M., G. Mezzi, et al. (2000). "Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease." Dig Dis Sci **45**(7): 1462-4.
- Guy-Grand, D., M. Malassis-Seris, et al. (1991). "Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules." J Exp Med **173**(6): 1549-52.
- Hadis, U., B. Wahl, et al. (2011). "Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria." Immunity **34**(2): 237-46.
- Hafstrom, I., B. Ringertz, et al. (1993). "The effect of endothelin, neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide and substance P on neutrophil functions." Acta Physiol Scand **148**(3): 341-6.
- Halim, T. Y., A. MacLaren, et al. (2012). "Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor alpha is required for natural helper cell development and allergic inflammation." Immunity **37**(3): 463-74.
- Hansson, G. C. (2012). "Role of mucus layers in gut infection and inflammation." Curr Opin Microbiol **15**(1): 57-62.
- Harnish, D. C., L. M. Albert, et al. (2004). "Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **286**(1): G118-25.
- Harper, K. C. and M. S. Sigman (2011). "Predicting and optimizing asymmetric catalyst performance using the principles of experimental design and steric parameters." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(6): 2179-83.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-32.
- Harwig, S. S., L. Tan, et al. (1995). "Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2." J Clin Invest **95**(2): 603-10.
- Hattrup, C. L. and S. J. Gendler (2008). "Structure and function of the cell surface (tethered) mucins." Annu Rev Physiol **70**: 431-57.

- Heaton, K. W., L. J. O'Donnell, et al. (1992). "Symptoms of irritable bowel syndrome in a British urban community: consulters and nonconsulters." *Gastroenterology* **102**(6): 1962-7.
- Helgeland, L., J. T. Vaage, et al. (1996). "Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine." *Immunology* **89**(4): 494-501.
- Hepworth, M. R., L. A. Monticelli, et al. (2013). "Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria." *Nature* **498**(7452): 113-7.
- Herias, M. V., T. Midtvedt, et al. (1995). "Role of Escherichia coli P fimbriae in intestinal colonization in gnotobiotic rats." *Infect Immun* **63**(12): 4781-9.
- Hernandes, L., L. C. Pereira, et al. (2003). "Goblet cell number in the ileum of rats denervated during suckling and weaning." *Biocell* **27**(3): 347-51.
- Herzer, P. J., S. Inouye, et al. (1990). "Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of Escherichia coli." *J Bacteriol* **172**(11): 6175-81.
- Heyman, M. and J. F. Desjeux (2000). "Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease." *Ann N Y Acad Sci* **915**: 304-11.
- Heyman, M., R. Ducroc, et al. (1982). "Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro." *Am J Physiol* **242**(6): G558-64.
- Hiller-Sturmhofel, S. and A. Bartke (1998). "The endocrine system: an overview." *Alcohol Health Res World* **22**(3): 153-64.
- Hislop, I. G. (1979). "Childhood deprivation: an antecedent of the irritable bowel syndrome." *Med J Aust* **1**(9): 372-4.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, et al. (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." *Science* **284**(5418): 1313-8.
- Holmen, N., S. Isaksson, et al. (2007). "CD4+CD25+ regulatory T cells in irritable bowel syndrome patients." *Neurogastroenterol Motil* **19**(2): 119-25.
- Holmes, J. L., C. M. Van Itallie, et al. (2006). "Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns." *Gene Expr Patterns* **6**(6): 581-8.
- Hooper, L. V. and J. I. Gordon (2001). "Commensal host-bacterial relationships in the gut." *Science* **292**(5519): 1115-8.
- Hooper, L. V. and A. J. Macpherson (2010). "Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota." *Nat Rev Immunol* **10**(3): 159-69.
- Hooper, L. V., T. S. Stappenbeck, et al. (2003). "Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity." *Nat Immunol* **4**(3): 269-73.
- Hopkins, A. M., S. V. Walsh, et al. (2003). "Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function." *J Cell Sci* **116**(Pt 4): 725-42.
- Hopkins, M. J., G. T. Macfarlane, et al. (2005). "Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses." *FEMS Microbiol Ecol* **54**(1): 77-85.
- Hornef, M. W., K. Putsep, et al. (2004). "Increased diversity of intestinal antimicrobial peptides by covalent dimer formation." *Nat Immunol* **5**(8): 836-43.
- Houdeau, E., R. Moriez, et al. (2007). "Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat." *Gastroenterology* **132**(3): 982-93.
- Hoyler, T., C. S. Klose, et al. (2012). "The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells." *Immunity* **37**(4): 634-48.
- Huang, Y., Y. Park, et al. (2011). "Mucosal memory CD8(+) T cells are selected in the periphery by an MHC class I molecule." *Nat Immunol* **12**(11): 1086-95.
- Hudault, S., J. Guignot, et al. (2001). "Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection." *Gut* **49**(1): 47-55.
- Hue, S., J. J. Mention, et al. (2004). "A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease." *Immunity* **21**(3): 367-77.
- Hurst, S. D., T. Muchamuel, et al. (2002). "New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25." *J Immunol* **169**(1): 443-53.

- Inagaki-Ohara, K., H. Nishimura, et al. (1997). "Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice." Eur J Immunol **27**(11): 2885-91.
- Inoue, R., T. Tsuruta, et al. (2008). "Postnatal changes in the expression of genes for cryptdins 1-6 and the role of luminal bacteria in cryptdin gene expression in mouse small intestine." FEMS Immunol Med Microbiol **52**(3): 407-16.
- Insoft, R. M., I. R. Sanderson, et al. (1996). "Development of immune function in the intestine and its role in neonatal diseases." Pediatr Clin North Am **43**(2): 551-71.
- Ishikawa, Y. and R. Minami (1996). "Quantitative estimation of dystrophin protein: a sensitive and convenient "two-antibody sandwich" ELISA." Tohoku J Exp Med **180**(1): 57-63.
- Ito, S. (1969). "Structure and function of the glycocalyx." Fed Proc **28**(1): 12-25.
- Ivanov, II, K. Atarashi, et al. (2009). "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria." Cell **139**(3): 485-98.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Izcue, A., J. L. Coombes, et al. (2006). "Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation." Immunol Rev **212**: 256-71.
- Izcue, A. and F. Powrie (2008). "Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier." Immunology **123**(1): 6-10.
- Jager, A. and V. K. Kuchroo (2010). "Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation." Scand J Immunol **72**(3): 173-84.
- Jakobsen, C., A. Paerregaard, et al. (2013). "Environmental factors and risk of developing paediatric inflammatory bowel disease -- a population based study 2007-2009." J Crohns Colitis **7**(1): 79-88.
- Janeway, C. A., Jr., U. Diantzani, et al. (1989). "Cross-linking and conformational change in T-cell receptors: role in activation and in repertoire selection." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 2**: 657-66.
- Johansen, F. E., M. Pekna, et al. (1999). "Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice." J Exp Med **190**(7): 915-22.
- Johansson, M. E., D. Ambort, et al. (2011). "Composition and functional role of the mucus layers in the intestine." Cell Mol Life Sci **68**(22): 3635-41.
- Johansson, M. E., J. K. Gustafsson, et al. (2014). "Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis." Gut **63**(2): 281-91.
- Johansson, M. E. and G. C. Hansson (2011). "Microbiology. Keeping bacteria at a distance." Science **334**(6053): 182-3.
- Johansson, M. E., J. M. Larsson, et al. (2011). "The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **108 Suppl 1**: 4659-65.
- Johansson, M. E., M. Phillipson, et al. (2008). "The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15064-9.
- Jones, E. A. and T. A. Waldmann (1972). "The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat." J Clin Invest **51**(11): 2916-27.
- Joossens, M., G. Huys, et al. (2011). "Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives." Gut **60**(5): 631-7.
- Jost, T., C. Lacroix, et al. (2012). "New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates." PLoS One **7**(8): e44595.
- Jostins, L., S. Ripke, et al. (2012). "Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease." Nature **491**(7422): 119-24.
- Kadaoui, K. A. and B. Corthesy (2007). "Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment." J Immunol **179**(11): 7751-7.

- Kagan, B. L., M. E. Selsted, et al. (1990). "Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 210-4.
- Kai-Larsen, Y., G. Bergsson, et al. (2007). "Antimicrobial components of the neonatal gut affected upon colonization." Pediatr Res **61**(5 Pt 1): 530-6.
- Kajino-Sakamoto, R., M. Inagaki, et al. (2008). "Enterocyte-derived TAK1 signaling prevents epithelium apoptosis and the development of ileitis and colitis." J Immunol **181**(2): 1143-52.
- Kaneko, M., T. Mizunuma, et al. (2004). "Development of TCR alpha beta CD8 alpha alpha intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by interleukin-15-producing epithelial cells constitutively stimulated by gram-negative bacteria via TLR4." Biol Pharm Bull **27**(6): 883-9.
- Kanzler, H., F. J. Barrat, et al. (2007). "Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists." Nat Med **13**(5): 552-9.
- Karam, S. M. (1999). "Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut." Front Biosci **4**: D286-98.
- Karlsson, J., K. Putsep, et al. (2008). "Regional variations in Paneth cell antimicrobial peptide expression along the mouse intestinal tract." BMC Immunol **9**: 37.
- Karlsson, M. R., F. E. Johansen, et al. (2010). "Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system." Allergy **65**(5): 561-70.
- Kaser, A., A. H. Lee, et al. (2008). "XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease." Cell **134**(5): 743-56.
- Kassinen, A., L. Krogius-Kurikka, et al. (2007). "The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects." Gastroenterology **133**(1): 24-33.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." Cell Death Differ **13**(5): 816-25.
- Kawano, N., T. Koji, et al. (2004). "Identification and localization of estrogen receptor alpha- and beta-positive cells in adult male and female mouse intestine at various estrogen levels." Histochem Cell Biol **121**(5): 399-405.
- Keita, A. V., E. Gullberg, et al. (2006). "Characterization of antigen and bacterial transport in the follicle-associated epithelium of human ileum." Lab Invest **86**(5): 504-16.
- Kelly, D., J. I. Campbell, et al. (2004). "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA." Nat Immunol **5**(1): 104-12.
- Kelly, P., M. Bajaj-Elliott, et al. (2006). "Reduced gene expression of intestinal alpha-defensins predicts diarrhea in a cohort of African adults." J Infect Dis **193**(10): 1464-70.
- Kendler, K. S., J. Myers, et al. (2001). "The genetic epidemiology of irrational fears and phobias in men." Arch Gen Psychiatry **58**(3): 257-65.
- Kennedy, R. J., M. Hoper, et al. (2000). "Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease." Br J Surg **87**(10): 1346-51.
- Kerman, D. H. and A. R. Deshpande (2014). "Gut microbiota and inflammatory bowel disease: the role of antibiotics in disease management." Postgrad Med **126**(4): 7-19.
- Khoo, U. Y., I. E. Proctor, et al. (1997). "CD4+ T cell down-regulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens." J Immunol **158**(8): 3626-34.
- Kidd, P. (2003). "Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease." Altern Med Rev **8**(3): 223-46.
- Kiecolt-Glaser, J. K., R. Glaser, et al. (1986). "Modulation of cellular immunity in medical students." J Behav Med **9**(1): 5-21.
- Kiecolt-Glaser, J. K., T. J. Loving, et al. (2005). "Hostile marital interactions, proinflammatory cytokine production, and wound healing." Arch Gen Psychiatry **62**(12): 1377-84.
- Kiliaan, A. J., P. R. Saunders, et al. (1998). "Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum." Am J Physiol **275**(5 Pt 1): G1037-44.
- Kilshaw, P. J. and S. J. Murrant (1990). "A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine." Eur J Immunol **20**(10): 2201-7.
- Kirschbaum, C., B. M. Kudielka, et al. (1999). "Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis." Psychosom Med **61**(2): 154-62.

- Klein, S. L. (2000). "The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior." *Neurosci Biobehav Rev* **24**(6): 627-38.
- Kobayashi, K. S., M. Chamailard, et al. (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." *Science* **307**(5710): 731-4.
- Kober, O. I., D. Ahl, et al. (2014). "gammadelta T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **306**(7): G582-93.
- Koczulla, R., G. von Degenfeld, et al. (2003). "An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18." *J Clin Invest* **111**(11): 1665-72.
- Konstantinopoulos, P. A., A. Kominea, et al. (2003). "Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation." *Eur J Cancer* **39**(9): 1251-8.
- Koprivnjak, T., A. Peschel, et al. (2002). "Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*." *J Biol Chem* **277**(49): 47636-44.
- Kotlowski, R., C. N. Bernstein, et al. (2007). "High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease." *Gut* **56**(5): 669-75.
- Krisanaprakornkit, S., J. R. Kimball, et al. (2000). "Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier." *Infect Immun* **68**(5): 2907-15.
- Kruis, W. (2004). "Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease." *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 4**: 75-8.
- Kudielka, B. M., J. Hellhammer, et al. (1998). "Sex differences in endocrine and psychological responses to psychosocial stress in healthy elderly subjects and the impact of a 2-week dehydroepiandrosterone treatment." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(5): 1756-61.
- Kuhn, R., J. Lohler, et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." *Cell* **75**(2): 263-74.
- Kurosaka, K., Q. Chen, et al. (2005). "Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant." *J Immunol* **174**(10): 6257-65.
- Ladd, C. O., M. J. Owens, et al. (1996). "Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation." *Endocrinology* **137**(4): 1212-8.
- Lai, J. C., M. J. Minski, et al. (1999). "Manganese mineral interactions in brain." *Neurotoxicology* **20**(2-3): 433-44.
- Lai, Y. and R. L. Gallo (2009). "AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense." *Trends Immunol* **30**(3): 131-41.
- Lal-Nag, M. and P. J. Morin (2009). "The claudins." *Genome Biol* **10**(8): 235.
- Lamm, M. E. (1998). "Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense." *Am J Physiol* **274**(4 Pt 1): G614-7.
- Landers, C. J., O. Cohavy, et al. (2002). "Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens." *Gastroenterology* **123**(3): 689-99.
- Larauche, M., C. Kiank, et al. (2009). "Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications." *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 7**: 33-46.
- Larsson, E., V. Tremaroli, et al. (2012). "Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88." *Gut* **61**(8): 1124-31.
- Lassen, K. G., P. Kuballa, et al. (2014). "Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(21): 7741-6.

- Leatham, M. P., S. Banerjee, et al. (2009). "Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine." *Infect Immun* **77**(7): 2876-86.
- Lehmann, J., C. R. Pryce, et al. (2002). "Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats." *Neurobiol Aging* **23**(3): 457-66.
- Levine, S. (2002). "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior." *Neurotox Res* **4**(5-6): 557-564.
- Lichtenberger, L. M. (1995). "The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus." *Annu Rev Physiol* **57**: 565-83.
- Lidell, M. E. and G. C. Hansson (2006). "Cleavage in the GDPH sequence of the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin." *Biochem J* **399**(1): 121-9.
- Linden, S. K., C. Wickstrom, et al. (2008). "Four modes of adhesion are used during *Helicobacter pylori* binding to human mucins in the oral and gastric niches." *Helicobacter* **13**(2): 81-93.
- Lindhout, E., G. Koopman, et al. (1997). "Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions." *Immunol Today* **18**(12): 573-7.
- Lochner, M., C. Ohnmacht, et al. (2010). "Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR γ and LTi cells." *J Exp Med* **208**(1): 125-34.
- Lodes, M. J., Y. Cong, et al. (2004). "Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease." *J Clin Invest* **113**(9): 1296-306.
- Logue, C. M., C. Doetkott, et al. (2012). "Genotypic and phenotypic traits that distinguish neonatal meningitis-associated *Escherichia coli* from fecal *E. coli* isolates of healthy human hosts." *Appl Environ Microbiol* **78**(16): 5824-30.
- Lopez-Siles, M., M. Martinez-Medina, et al. (2014). "Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes." *Int J Med Microbiol* **304**(3-4): 464-75.
- Lotz, M., D. Gutle, et al. (2006). "Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells." *J Exp Med* **203**(4): 973-84.
- Louten, J., K. Boniface, et al. (2009). "Development and function of TH17 cells in health and disease." *J Allergy Clin Immunol* **123**(5): 1004-11.
- Luci, C., A. Reynders, et al. (2009). "Influence of the transcription factor ROR γ on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin." *Nat Immunol* **10**(1): 75-82.
- Lugering, A., T. Kucharzik, et al. (2003). "Lymphoid precursors in intestinal cryptopatches express CCR6 and undergo dysregulated development in the absence of CCR6." *J Immunol* **171**(5): 2208-15.
- Lukewich, M. K. and A. E. Lomax (2013). "Toll-like receptor 4 activation reduces adrenal chromaffin cell excitability through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway." *Endocrinology* **154**(1): 351-62.
- Lundell, A. C., V. Bjornsson, et al. (2012). "Infant B cell memory differentiation and early gut bacterial colonization." *J Immunol* **188**(9): 4315-22.
- MacFie, J., C. O'Boyle, et al. (1999). "Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity." *Gut* **45**(2): 223-8.
- Macpherson, A. J., D. Gatto, et al. (2000). "A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria." *Science* **288**(5474): 2222-6.
- Macpherson, A. J., K. D. McCoy, et al. (2008). "The immune geography of IgA induction and function." *Mucosal Immunol* **1**(1): 11-22.
- Macpherson, A. J. and T. Uhr (2004). "Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria." *Science* **303**(5664): 1662-5.
- Madara, J. L. and J. Stafford (1989). "Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers." *J Clin Invest* **83**(2): 724-7.
- Maes, M., C. Song, et al. (1998). "The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety." *Cytokine* **10**(4): 313-8.

- Malamut, G., R. El Machhour, et al. (2010). "IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis." *J Clin Invest* **120**(6): 2131-43.
- Malchow, H. A. (1997). "Crohn's disease and Escherichia coli. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?" *J Clin Gastroenterol* **25**(4): 653-8.
- Mallegol, J., G. Van Niel, et al. (2007). "T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells." *Gastroenterology* **132**(5): 1866-76.
- Mann, N. S. and M. Limoges-Gonzales (2009). "The prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome." *Hepatogastroenterology* **56**(91-92): 718-21.
- Mantis, N. J., M. C. Cheung, et al. (2002). "Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor." *J Immunol* **169**(4): 1844-51.
- Marcial, M. A., S. L. Carlson, et al. (1984). "Partitioning of paracellular conductance along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based on structural analysis with detailed consideration of tight junction structure-function relationships." *J Membr Biol* **80**(1): 59-70.
- Margolis, K. G., K. Stevanovic, et al. (2011). "Enteric neuronal density contributes to the severity of intestinal inflammation." *Gastroenterology* **141**(2): 588-98, 598 e1-2.
- Martinez-Medina, M., X. Aldeguer, et al. (2009). "Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis* **15**(6): 872-82.
- Mathias, A. and B. Corthesy (2011). "Recognition of gram-positive intestinal bacteria by hybridoma- and colostrum-derived secretory immunoglobulin A is mediated by carbohydrates." *J Biol Chem* **286**(19): 17239-47.
- Matysiak-Budnik, T., I. C. Moura, et al. (2008). "Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease." *J Exp Med* **205**(1): 143-54.
- Mawdsley, J. E. and D. S. Rampton (2005). "Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications." *Gut* **54**(10): 1481-91.
- Mazanec, M. B., C. S. Kaetzel, et al. (1992). "Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(15): 6901-5.
- Mazmanian, S. K., C. H. Liu, et al. (2005). "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system." *Cell* **122**(1): 107-18.
- McDonald, C., F. F. Chen, et al. (2005). "A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling." *J Biol Chem* **280**(48): 40301-9.
- McEwen, B. S. and E. Stellar (1993). "Stress and the individual. Mechanisms leading to disease." *Arch Intern Med* **153**(18): 2093-101.
- McGuckin, M. A., S. K. Linden, et al. (2011). "Mucin dynamics and enteric pathogens." *Nat Rev Microbiol* **9**(4): 265-78.
- Meddings, J. B. and M. G. Swain (2000). "Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat." *Gastroenterology* **119**(4): 1019-28.
- Menard, S., N. Cerf-Bensussan, et al. (2010). "Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens." *Mucosal Immunol* **3**(3): 247-59.
- Menard, S., V. Forster, et al. (2008). "Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression." *J Exp Med* **205**(1): 183-93.
- Mention, J. J., M. Ben Ahmed, et al. (2003). "Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease." *Gastroenterology* **125**(3): 730-45.
- Merskey, H. and G. D. Watson (1979). "The lateralisation of pain." *Pain* **7**(3): 271-80.
- Metcalfe, D. D., D. Baram, et al. (1997). "Mast cells." *Physiol Rev* **77**(4): 1033-79.
- Meyer-Hoffert, U., M. W. Hornef, et al. (2008). "Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer." *Gut* **57**(6): 764-71.
- Milde, A. M., O. Enger, et al. (2004). "The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats." *Physiol Behav* **81**(1): 71-84.

- Millstein, R. A. and A. Holmes (2007). "Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains." Neurosci Biobehav Rev **31**(1): 3-17.
- Mischke, M. and T. Plosch (2013). "More than just a gut instinct-the potential interplay between a baby's nutrition, its gut microbiome, and the epigenome." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **304**(12): R1065-9.
- Mitani, Y., H. Takahashi, et al. (1999). "An ascidian T-box gene As-T2 is related to the Tbx6 subfamily and is associated with embryonic muscle cell differentiation." Dev Dyn **215**(1): 62-8.
- Mixter, P. F., V. Camerini, et al. (1994). "Mouse T lymphocytes that express a gamma delta T-cell antigen receptor contribute to resistance to Salmonella infection in vivo." Infect Immun **62**(10): 4618-21.
- Mjosberg, J., J. Bernink, et al. (2012). "The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells." Immunity **37**(4): 649-59.
- Moloney, R. D., O. F. O'Leary, et al. (2012). "Early-life stress induces visceral hypersensitivity in mice." Neurosci Lett **512**(2): 99-102.
- Monticelli, L. A., G. F. Sonnenberg, et al. (2011). "Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus." Nat Immunol **12**(11): 1045-54.
- Mooseker, M. S. (1985). "Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border." Annu Rev Cell Biol **1**: 209-41.
- Moriez, R., C. Salvador-Cartier, et al. (2005). "Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats." Am J Pathol **167**(4): 1071-9.
- Morita, K., M. Furuse, et al. (1999). "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 511-6.
- Moriwaki, K., K. Fujii, et al. (1997). "Protein exudation induced by manipulation of the intestines and mesentery during laparotomy in rat. A study of the mechanism of 'third space' loss." In Vivo **11**(4): 325-7.
- Moro, K., T. Yamada, et al. (2010). "Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells." Nature **463**(7280): 540-4.
- Moussaoui, N., V. Braniste, et al. (2014). "Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial barrier defect in maternal-deprived rats." PLoS One **9**(2): e88382.
- Moussata, D., M. Goetz, et al. (2014). "Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo." Gut **60**(1): 26-33.
- Mucida, D., M. M. Husain, et al. (2013). "Transcriptional reprogramming of mature CD4(+) helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes." Nat Immunol **14**(3): 281-9.
- Muller, S., M. Buhler-Jungo, et al. (2000). "Intestinal intraepithelial lymphocytes exert potent protective cytotoxic activity during an acute virus infection." J Immunol **164**(4): 1986-94.
- Muniz, L. R., C. Knosp, et al. (2012). "Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease." Front Immunol **3**: 310.
- Mylonaki, M., N. B. Rayment, et al. (2005). "Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **11**(5): 481-7.
- Ness, T. J. and G. F. Gebhart (1990). "Visceral pain: a review of experimental studies." Pain **41**(2): 167-234.
- Neut, C., P. Bulois, et al. (2002). "Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease." Am J Gastroenterol **97**(4): 939-46.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis, et al. (2001). "Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues." Nat Immunol **2**(11): 1004-9.
- Nguyen, N. K., S. B. Sartori, et al. (2009). "Effect of neuropeptide Y Y2 receptor deletion on emotional stress-induced neuronal activation in mice." Synapse **63**(3): 236-46.
- Nicaise, P., A. Gleizes, et al. (1993). "Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages." Eur Cytokine Netw **4**(2): 133-8.

- Nijnik, A. and R. Hancock (2009). "Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections." Emerg Health Threats J **2**: e1.
- Niyonsaba, F., K. Iwabuchi, et al. (2002). "A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis." Immunology **106**(1): 20-6.
- Nowrouzian, F., B. Hesselmar, et al. (2003). "Escherichia coli in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage." Pediatr Res **54**(1): 8-14.
- Nowrouzian, F. L., A. E. Ostblom, et al. (2009). "Phylogenetic group B2 Escherichia coli strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence." Clin Microbiol Infect **15**(5): 466-72.
- Nowrouzian, F. L., A. E. Wold, et al. (2005). "Escherichia coli strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants." J Infect Dis **191**(7): 1078-83.
- Nucera, G., M. Gabrielli, et al. (2005). "Abnormal breath tests to lactose, fructose and sorbitol in irritable bowel syndrome may be explained by small intestinal bacterial overgrowth." Aliment Pharmacol Ther **21**(11): 1391-5.
- Nusrat, A., J. R. Turner, et al. (2000). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(5): G851-7.
- O'Brien, C. L. and D. M. Gordon (2011). "Effect of diet and gut dynamics on the establishment and persistence of Escherichia coli." Microbiology **157**(Pt 5): 1375-84.
- O'Brien, C. L., P. Pavli, et al. (2014). "Detection of bacterial DNA in lymph nodes of Crohn's disease patients using high throughput sequencing." Gut **63**(10): 1596-606.
- O'Brien, L. M., E. Fitzpatrick, et al. (2008). "Eosinophil-nerve interactions and neuronal plasticity in rat gut associated lymphoid tissue (GALT) in response to enteric parasitism." J Neuroimmunol **197**(1): 1-9.
- O'Connor, W., Jr., M. Kamanaka, et al. (2009). "A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation." Nat Immunol **10**(6): 603-9.
- O'Mahony, C., P. Scully, et al. (2008). "Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation." PLoS Pathog **4**(8): e1000112.
- O'Mahony, S. M., N. P. Hyland, et al. (2011). "Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction." Psychopharmacology (Berl) **214**(1): 71-88.
- O'Neil, D. A., E. M. Porter, et al. (1999). "Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium." J Immunol **163**(12): 6718-24.
- O'Neill, L. A. (2006). "How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know." Curr Opin Immunol **18**(1): 3-9.
- Oh, D. J., H. R. Kim, et al. (2013). "Profile of human beta-defensins 1,2 and proinflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-6) in patients with chronic kidney disease." Kidney Blood Press Res **37**(6): 602-10.
- Ohman, L., A. C. Lindmark, et al. (2009). "B-cell activation in patients with irritable bowel syndrome (IBS)." Neurogastroenterol Motil **21**(6): 644-50, e27.
- Ohman, L. and M. Simren (2010). "Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(3): 163-73.
- Ojetti, V., E. C. Lauritano, et al. (2009). "Rifaximin pharmacology and clinical implications." Expert Opin Drug Metab Toxicol **5**(6): 675-82.
- Olier, M., I. Marcq, et al. (2012). "Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity." Gut Microbes **3**(6): 501-9.
- Otte, C., S. Hart, et al. (2005). "A meta-analysis of cortisol response to challenge in human aging: importance of gender." Psychoneuroendocrinology **30**(1): 80-91.
- Ottman, N., H. Smidt, et al. (2012). "The function of our microbiota: who is out there and what do they do?" Front Cell Infect Microbiol **2**: 104.
- Ouellette, A. J., R. M. Greco, et al. (1989). "Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium." J Cell Biol **108**(5): 1687-95.

- Ouwerkerk, J. P., W. M. de Vos, et al. (2013). "Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface." Best Pract Res Clin Gastroenterol **27**(1): 25-38.
- Ouyang, W., J. K. Kolls, et al. (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-67.
- Own, L. S. and P. D. Patel (2012). "Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in C57Bl/6 mice." Horm Behav **63**(3): 411-7.
- Palmer, C., E. M. Bik, et al. (2007). "Development of the human infant intestinal microbiota." PLoS Biol **5**(7): e177.
- Patel, R. M., L. S. Myers, et al. (2012). "Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function." Am J Pathol **180**(2): 626-35.
- Payros, D., T. Secher, et al. (2014). "Maternally acquired genotoxic Escherichia coli alters offspring's intestinal homeostasis." Gut Microbes **5**(3): 313-25.
- Perminow, G., J. Beisner, et al. (2010). "Defective paneth cell-mediated host defense in pediatric ileal Crohn's disease." Am J Gastroenterol **105**(2): 452-9.
- Pestka, S., C. D. Krause, et al. (2004). "Interleukin-10 and related cytokines and receptors." Annu Rev Immunol **22**: 929-79.
- Peterson, M. L. (2007). "Mechanisms controlling production of membrane and secreted immunoglobulin during B cell development." Immunol Res **37**(1): 33-46.
- Phalipon, A., A. Cardona, et al. (2002). "Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo." Immunity **17**(1): 107-15.
- Phalipon, A. and B. Corthesy (2003). "Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins." Trends Immunol **24**(2): 55-8.
- Phiel, K. L., R. A. Henderson, et al. (2005). "Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations." Immunol Lett **97**(1): 107-13.
- Pimentel, M. (2009). "Review of rifaximin as treatment for SIBO and IBS." Expert Opin Investig Drugs **18**(3): 349-58.
- Pimentel, M., E. J. Chow, et al. (2000). "Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome." Am J Gastroenterol **95**(12): 3503-6.
- Pimentel, M., S. Park, et al. (2006). "The effect of a nonabsorbed oral antibiotic (rifaximin) on the symptoms of the irritable bowel syndrome: a randomized trial." Ann Intern Med **145**(8): 557-63.
- Pinheiro da Silva, F., R. L. Gallo, et al. (2009). "Differing effects of exogenous or endogenous cathelicidin on macrophage toll-like receptor signaling." Immunol Cell Biol **87**(6): 496-500.
- Pinheiro, M. L., V. Ferraz-de-Paula, et al. (2011). "Long-term maternal separation differentially alters serum corticosterone levels and blood neutrophil activity in A/J and C57BL/6 mouse offspring." Neuroimmunomodulation **18**(3): 184-90.
- Plaisancie, P., A. Barcelo, et al. (1998). "Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon." Am J Physiol **275**(5 Pt 1): G1073-84.
- Porter, E. A., B. Weisblum, et al. (2002). "Mimicry of host-defense peptides by unnatural oligomers: antimicrobial beta-peptides." J Am Chem Soc **124**(25): 7324-30.
- Potten, C. S., G. Owen, et al. (2002). "Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands." J Cell Sci **115**(Pt 11): 2381-8.
- Powell, D. W. (1981). "Barrier function of epithelia." Am J Physiol **241**(4): G275-88.
- Powell, N., A. W. Walker, et al. (2012). "The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells." Immunity **37**(4): 674-84.
- Pryde, S. E., S. H. Duncan, et al. (2002). "The microbiology of butyrate formation in the human colon." FEMS Microbiol Lett **217**(2): 133-9.
- Putsep, K., L. G. Axelsson, et al. (2000). "Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins." J Biol Chem **275**(51): 40478-82.
- Qiu, B. S., B. A. Vallance, et al. (1999). "The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis." Nat Med **5**(10): 1178-82.

- Quigley, E. M. and A. G. Khan (2009). "Irritable bowel syndrome: recent progress in pathophysiology, diagnosis and management?" *J Ayub Med Coll Abbottabad* **21**(1): 1-2.
- Raetz, M., S. H. Hwang, et al. (2013). "Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells." *Nat Immunol* **14**(2): 136-42.
- Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." *J Exp Med* **183**(3): 1161-72.
- Rautava, S., R. Luoto, et al. (2012). "Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**(10): 565-76.
- Redan, J. A., B. F. Rush, et al. (1990). "Organ distribution of radiolabeled enteric Escherichia coli during and after hemorrhagic shock." *Ann Surg* **211**(6): 663-6; discussion 666-8.
- Renz, H., P. Brandtzaeg, et al. (2011). "The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation." *Nat Rev Immunol* **12**(1): 9-23.
- Rescigno, M., G. Rotta, et al. (2001). "Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers." *Immunobiology* **204**(5): 572-81.
- Resta, S. C. (2009). "Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling." *J Physiol* **587**(Pt 17): 4169-74.
- Ringel, Y. and D. A. Drossman (2001). "Psychosocial aspects of Crohn's disease." *Surg Clin North Am* **81**(1): 231-52, x.
- Rizzello, V., I. Bonaccorsi, et al. (2011). "Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 473097.
- Roger, L. C., A. Costabile, et al. (2010). "Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life." *Microbiology* **156**(Pt 11): 3329-41.
- Rohrl, J., D. Yang, et al. (2010). "Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2." *J Immunol* **184**(12): 6688-94.
- Romagnani, S. (1997). "The Th1/Th2 paradigm." *Immunol Today* **18**(6): 263-6.
- Rose, S., M. Lichtenheld, et al. (2007). "Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function." *J Immunol* **178**(5): 2667-78.
- Rosenfeld, P., D. Suchecki, et al. (1992). "Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development." *Neurosci Biobehav Rev* **16**(4): 553-68.
- Rosztoczy, A., J. Fioramonti, et al. (2003). "Influence of sex and experimental protocol on the effect of maternal deprivation on rectal sensitivity to distension in the adult rat." *Neurogastroenterol Motil* **15**(6): 679-86.
- Round, A. N., N. M. Rigby, et al. (2012). "Lamellar structures of MUC2-rich mucin: a potential role in governing the barrier and lubricating functions of intestinal mucus." *Biomacromolecules* **13**(10): 3253-61.
- Round, J. L., S. M. Lee, et al. (2011). "The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota." *Science* **332**(6032): 974-7.
- Ruemmele, F. M. (2010). "Pediatric inflammatory bowel diseases: coming of age." *Curr Opin Gastroenterol* **26**(4): 332-6.
- Salzman, N. H., D. Ghosh, et al. (2003). "Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin." *Nature* **422**(6931): 522-6.
- Salzman, N. H., K. Hung, et al. (2010). "Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology." *Nat Immunol* **11**(1): 76-83.
- Sanos, S. L., V. L. Bui, et al. (2009). "RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells." *Nat Immunol* **10**(1): 83-91.
- Sansonetti, P. J. and R. Medzhitov (2009). "Learning tolerance while fighting ignorance." *Cell* **138**(3): 416-20.
- Santaolalla, R. and M. T. Abreu (2012). "Innate immunity in the small intestine." *Curr Opin Gastroenterol* **28**(2): 124-9.
- Santos, J., M. Benjamin, et al. (2000). "Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**(6): G847-54.
- Santos, J., P. R. Saunders, et al. (1999). "Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 1): G391-9.

- Sato, T., J. H. van Es, et al. (2011). "Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts." *Nature* **469**(7330): 415-8.
- Satoh-Takayama, N., C. A. Vosshenrich, et al. (2008). "Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense." *Immunity* **29**(6): 958-70.
- Satoh, M. S., N. Huh, et al. (1988). "Enzymatic removal of O6-ethylguanine from mitochondrial DNA in rat tissues exposed to N-ethyl-N-nitrosourea in vivo." *J Biol Chem* **263**(14): 6854-6.
- Satoh, Y., Y. Habara, et al. (1995). "Carbamylcholine- and catecholamine-induced intracellular calcium dynamics of epithelial cells in mouse ileal crypts." *Gastroenterology* **108**(5): 1345-56.
- Satoh, Y., K. Ishikawa, et al. (1992). "Bethanechol and a G-protein activator, NaF/AlCl₃, induce secretory response in Paneth cells of mouse intestine." *Cell Tissue Res* **269**(2): 213-20.
- Satoh, Y., K. Ishikawa, et al. (1989). "Effects of cholecystokinin and carbamylcholine on Paneth cell secretion in mice: a comparison with pancreatic acinar cells." *Anat Rec* **225**(2): 124-32.
- Saunders, P. R., U. Kosecka, et al. (1994). "Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine." *Am J Physiol* **267**(5 Pt 1): G794-9.
- Saunders, P. R., J. Santos, et al. (2002). "Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH." *Dig Dis Sci* **47**(1): 208-15.
- Savage, D. C. (1977). "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." *Annu Rev Microbiol* **31**: 107-33.
- Sawa, S., M. Cherrier, et al. (2010). "Lineage relationship analysis of RORgammat+ innate lymphoid cells." *Science* **330**(6004): 665-9.
- Sawa, S., M. Lochner, et al. (2011). "RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota." *Nat Immunol* **12**(4): 320-6.
- Schikora, A., I. Virlogeux-Payant, et al. (2011). "Conservation of Salmonella infection mechanisms in plants and animals." *PLoS One* **6**(9): e24112.
- Schipa, S., M. P. Conte, et al. (2009). "Dominant genotypes in mucosa-associated Escherichia coli strains from pediatric patients with inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* **15**(5): 661-72.
- Schoepfer, A. M., T. Schaffer, et al. (2008). "Antibodies to flagellin indicate reactivity to bacterial antigens in IBS patients." *Neurogastroenterol Motil* **20**(10): 1110-8.
- Scholtens, P. A., R. Oozeer, et al. (2012). "The early settlers: intestinal microbiology in early life." *Annu Rev Food Sci Technol* **3**: 425-47.
- Schroeder, B. O., E. F. Stange, et al. (2011). "Waking the wimp: redox-modulation activates human beta-defensin 1." *Gut Microbes* **2**(4): 262-6.
- Schroeder, B. O., Z. Wu, et al. (2011). "Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1." *Nature* **469**(7330): 419-23.
- Schutte, B. C., J. P. Mitros, et al. (2002). "Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2129-33.
- Schwab, M., V. Reynders, et al. (2007). "Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NF kappa B signalling." *Mol Immunol* **44**(15): 3625-32.
- Schwab, M., V. Reynders, et al. (2007). "Role of nuclear hormone receptors in butyrate-mediated up-regulation of the antimicrobial peptide cathelicidin in epithelial colorectal cells." *Mol Immunol* **44**(8): 2107-14.
- Schwartz-Cornil, I., Y. Benureau, et al. (2002). "Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins." *J Virol* **76**(16): 8110-7.
- Scott, C. L., A. M. Aumeunier, et al. (2011). "Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance?" *Trends Immunol* **32**(9): 412-9.
- Sekirov, I., S. L. Russell, et al. (2010). "Gut microbiota in health and disease." *Physiol Rev* **90**(3): 859-904.
- Selsted, M. E. and A. J. Ouellette (2005). "Mammalian defensins in the antimicrobial immune response." *Nat Immunol* **6**(6): 551-7.

- Sepehri, S., R. Kotlowski, et al. (2009). "Phylogenetic analysis of inflammatory bowel disease associated *Escherichia coli* and the fimH virulence determinant." Inflamm Bowel Dis **15**(11): 1737-45.
- Shan, M., M. Gentile, et al. (2013). "Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals." Science **342**(6157): 447-53.
- Shanahan, M. T., I. M. Carroll, et al. (2014). "Mouse Paneth cell antimicrobial function is independent of Nod2." Gut **63**(6): 903-10.
- Shen, W., S. Li, et al. (2011). "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and claudin-5 is associated with TGF-beta1-induced permeability of centrally derived vascular endothelium." Eur J Cell Biol **90**(4): 323-32.
- Sherman, P., A. Wesley, et al. (1985). "Sequential disaccharidase loss in rat intestinal blind loops: impact of malnutrition." Am J Physiol **248**(6 Pt 1): G626-32.
- Shibolet, O. and D. K. Podolsky (2007). "TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(6): G1469-73.
- Shim, J. O., S. Hwang, et al. (2010). "Interleukin-10 receptor mutations in children with neonatal-onset Crohn's disease and intractable ulcerating enterocolitis." Eur J Gastroenterol Hepatol **25**(10): 1235-40.
- Shiotani, A., H. Kusunoki, et al. (2013). "S100A expression and interleukin-10 polymorphisms are associated with ulcerative colitis and diarrhea predominant irritable bowel syndrome." Dig Dis Sci **58**(8): 2314-23.
- Shirafuji, Y., H. Tanabe, et al. (2003). "Structural determinants of procryptdin recognition and cleavage by matrix metalloproteinase-7." J Biol Chem **278**(10): 7910-9.
- Shires, J., E. Theodoridis, et al. (2001). "Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE)." Immunity **15**(3): 419-34.
- Short, M. L., J. Nickel, et al. (1996). "Lysozyme gene expression and regulation." EXS **75**: 243-57.
- Simister, N. E. and K. E. Mostov (1989). "An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens." Nature **337**(6203): 184-7.
- Simister, N. E. and A. R. Rees (1985). "Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine." Eur J Immunol **15**(7): 733-8.
- Simon, G. L. and S. L. Gorbach (1984). "Intestinal flora in health and disease." Gastroenterology **86**(1): 174-93.
- Skurnik, D., D. Bonnet, et al. (2008). "Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments." Environ Microbiol **10**(8): 2132-7.
- Smati, M., O. Clermont, et al. (2013). "Real-time PCR for quantitative analysis of human commensal *Escherichia coli* populations reveals a high frequency of subdominant phylogroups." Appl Environ Microbiol **79**(16): 5005-12.
- Smith, K., K. D. McCoy, et al. (2007). "Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota." Semin Immunol **19**(2): 59-69.
- Sommer, F. and F. Backhed (2013). "The gut microbiota--masters of host development and physiology." Nat Rev Microbiol **11**(4): 227-38.
- Songhet, P., M. Barthel, et al. (2011). "Stromal IFN-gammaR-signaling modulates goblet cell function during *Salmonella Typhimurium* infection." PLoS One **6**(7): e22459.
- Sonnenberg, G. F., L. A. Monticelli, et al. (2012). "Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria." Science **336**(6086): 1321-5.
- Sonnenberg, G. F., L. A. Monticelli, et al. (2011). "CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut." Immunity **34**(1): 122-34.
- Sorensen, O. E., P. Follin, et al. (2001). "Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3." Blood **97**(12): 3951-9.
- Soto, P., J. Zhang, et al. (2006). "Enzymatic cleavage as a processing step in the maturation of Muc4/sialomucin complex." J Cell Biochem **97**(6): 1267-74.

- Spiegel, B. M., W. D. Chey, et al. (2008). "Bacterial overgrowth and irritable bowel syndrome: unifying hypothesis or a spurious consequence of proton pump inhibitors?" Am J Gastroenterol **103**(12): 2972-6.
- Spiller, R. (2008). "Review article: probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome." Aliment Pharmacol Ther **28**(4): 385-96.
- Spits, H., D. Artis, et al. (2013). "Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature." Nat Rev Immunol **13**(2): 145-9.
- Spits, H. and T. Cupedo (2012). "Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function." Annu Rev Immunol **30**: 647-75.
- Stasi, C., M. Rosselli, et al. (2012). "Altered neuro-endocrine-immune pathways in the irritable bowel syndrome: the top-down and the bottom-up model." J Gastroenterol **47**(11): 1177-85.
- Stockinger, S., T. Albers, et al. (2014). "Interleukin-13-mediated paneth cell degranulation and antimicrobial peptide release." J Innate Immun **6**(4): 530-41.
- Straub, R. H., F. S. Dhabhar, et al. (2005). "How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **52**(1): 16-26.
- Sugahara, S., K. Ohara, et al. (1999). "Prognostic significance of the PC10 index for patients with stage II and III oesophageal cancer treated with radiotherapy." Acta Oncol **38**(8): 1057-62.
- Suzuki, K. and S. Fagarasan (2008). "How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut." Trends Immunol **29**(11): 523-31.
- Swidsinski, A., J. Weber, et al. (2005). "Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease." J Clin Microbiol **43**(7): 3380-9.
- Tache, Y. and B. Bonaz (2007). "Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function." J Clin Invest **117**(1): 33-40.
- Tache, Y. and M. H. Perdue (2004). "Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function." Neurogastroenterol Motil **16 Suppl 1**: 137-42.
- Takatori, H., Y. Kanno, et al. (2009). "Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22." J Exp Med **206**(1): 35-41.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- Tang, F., Z. Chen, et al. (2009). "Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15." J Exp Med **206**(3): 707-19.
- Tannock, G. W. (1999). "Analysis of the intestinal microflora: a renaissance." Antonie Van Leeuwenhoek **76**(1-4): 265-78.
- Targan, S. R. and L. C. Karp (2005). "Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis." Immunol Rev **206**: 296-305.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, et al. (2010). "The population genetics of commensal *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **8**(3): 207-17.
- Terpend, K., F. Boisgerault, et al. (1998). "Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: effect of interferon gamma." Gut **42**(4): 538-45.
- Territo, M. C., T. Ganz, et al. (1989). "Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils." J Clin Invest **84**(6): 2017-20.
- Tersman, Z., A. Collins, et al. (1991). "Cardiovascular responses to psychological and physiological stressors during the menstrual cycle." Psychosom Med **53**(2): 185-97.
- Tezuka, H., Y. Abe, et al. (2007). "Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells." Nature **448**(7156): 929-33.
- Thomas, M. L., X. Xu, et al. (1993). "The presence of functional estrogen receptors in intestinal epithelial cells." Endocrinology **132**(1): 426-30.
- Thornton, D. J., K. Rousseau, et al. (2008). "Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus." Annu Rev Physiol **70**: 459-86.
- Tomas, J., J. Reygnier, et al. (2014). "Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state." ISME J **9**(1): 46-58.
- Tomas, J., L. Wrzosek, et al. (2013). "Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization." FASEB J **27**(2): 645-55.

- Touchon, M., C. Hoede, et al. (2009). "Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths." *PLoS Genet* **5**(1): e1000344.
- Trinkley, K. E. and M. C. Nahata (2011). "Treatment of irritable bowel syndrome." *J Clin Pharm Ther* **36**(3): 275-82.
- Tsuda, M. C. and S. Ogawa (2012). "Long-lasting consequences of neonatal maternal separation on social behaviors in ovariectomized female mice." *PLoS One* **7**(3): e33028.
- Tsuda, M. C., N. Yamaguchi, et al. (2014). "Modification of female and male social behaviors in estrogen receptor beta knockout mice by neonatal maternal separation." *Front Neurosci* **8**: 274.
- Tsuda, M. C., N. Yamaguchi, et al. (2011). "Early life stress disrupts peripubertal development of aggression in male mice." *Neuroreport* **22**(6): 259-63.
- Turner, J. R. (2000). "Show me the pathway! Regulation of paracellular permeability by Na(+)-glucose cotransport." *Adv Drug Deliv Rev* **41**(3): 265-81.
- Turner, J. R. (2009). "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." *Nat Rev Immunol* **9**(11): 799-809.
- Uematsu, S., K. Fujimoto, et al. (2008). "Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5." *Nat Immunol* **9**(7): 769-76.
- Ukena, S. N., A. Singh, et al. (2007). "Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity." *PLoS One* **2**(12): e1308.
- Urao, M., J. Moy, et al. (1995). "Determinant of bacterial translocation in the newborn: small bowel versus large bowel colonization." *J Pediatr Surg* **30**(6): 831-6.
- Vadas, P., J. Browning, et al. (1993). "Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: the relationship with associated disease states." *J Lipid Mediat* **8**(1): 1-30.
- van de Pavert, S. A. and R. E. Mebius (2010). "New insights into the development of lymphoid tissues." *Nat Rev Immunol* **10**(9): 664-74.
- van der Flier, L. G., M. E. van Gijn, et al. (2009). "Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate." *Cell* **136**(5): 903-12.
- Van der Sluis, M., B. A. De Koning, et al. (2006). "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection." *Gastroenterology* **131**(1): 117-29.
- van der Waaij, L. A., P. C. Limburg, et al. (1996). "In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces." *Gut* **38**(3): 348-54.
- van Elburg, R. M., W. P. Fetter, et al. (2003). "Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **88**(1): F52-5.
- van Es, J. H., P. Jay, et al. (2005). "Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts." *Nat Cell Biol* **7**(4): 381-6.
- Van Hauwermeiren, F., R. E. Vandenbroucke, et al. (2014). "TNFR1-induced lethal inflammation is mediated by goblet and Paneth cell dysfunction." *Mucosal Immunol*.
- van Niel, G., G. Raposo, et al. (2001). "Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles." *Gastroenterology* **121**(2): 337-49.
- van Oers, H. J., E. R. de Kloet, et al. (1998). "Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress." *Brain Res Dev Brain Res* **111**(2): 245-52.
- Varghese, A. K., E. F. Verdu, et al. (2006). "Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression." *Gastroenterology* **130**(6): 1743-53.
- Velin, A. K., A. C. Ericson, et al. (2004). "Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats." *Gut* **53**(4): 494-500.
- Verdu, E. F., Y. Deng, et al. (2002). "Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(1): G27-36.
- Verhaak, P. F., J. J. Kerssens, et al. (1998). "Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature." *Pain* **77**(3): 231-9.
- Vidlock, E. J., M. Adeyemo, et al. (2009). "Childhood trauma is associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness in irritable bowel syndrome." *Gastroenterology* **137**(6): 1954-62.
- Wagner, N., J. Lohler, et al. (1996). "Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue." *Nature* **382**(6589): 366-70.

- Walker, A. W., J. Ince, et al. (2011). "Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota." *ISME J* **5**(2): 220-30.
- Walker, C. R., I. Hautefort, et al. (2013). "Intestinal intraepithelial lymphocyte-enterocyte crosstalk regulates production of bactericidal angiogenin 4 by Paneth cells upon microbial challenge." *PLoS One* **8**(12): e84553.
- Wallon, C. and J. D. Soderholm (2009). "Corticotropin-releasing hormone and mast cells in the regulation of mucosal barrier function in the human colon." *Ann N Y Acad Sci* **1165**: 206-10.
- Wang, J., T. W. Huizinga, et al. (2009). "De novo generation and enhanced suppression of human CD4+CD25+ regulatory T cells by retinoic acid." *J Immunol* **183**(6): 4119-26.
- Wang, Y., J. D. Hoenig, et al. (2009). "16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis." *ISME J* **3**(8): 944-54.
- Watson, C. J., M. Rowland, et al. (2001). "Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(2): C388-97.
- Weaver, C. T., R. D. Hatton, et al. (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." *Annu Rev Immunol* **25**: 821-52.
- Weaver, I. C., N. Cervoni, et al. (2004). "Epigenetic programming by maternal behavior." *Nat Neurosci* **7**(8): 847-54.
- Wegman, H. L. and C. Stetler (2009). "A meta-analytic review of the effects of childhood abuse on medical outcomes in adulthood." *Psychosom Med* **71**(8): 805-12.
- Wehkamp, J., J. Harder, et al. (2004). "NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression." *Gut* **53**(11): 1658-64.
- Weiser, M. J. and R. J. Handa (2009). "Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus." *Neuroscience* **159**(2): 883-95.
- Weiss, A. A., M. W. Babyatsky, et al. (1996). "Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues." *J Histochem Cytochem* **44**(10): 1161-6.
- Weitkamp, J. H., E. Rudzinski, et al. (2009). "Ontogeny of FOXP3(+) regulatory T cells in the postnatal human small intestinal and large intestinal lamina propria." *Pediatr Dev Pathol* **12**(6): 443-9.
- Welch, R. A., V. Burland, et al. (2002). "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 17020-4.
- White, G. P., E. M. Hollams, et al. (2006). "CpG methylation patterns in the IFN-gamma promoter in naive T cells: variations during Th1 and Th2 differentiation and between atopics and non-atopics." *Pediatr Allergy Immunol* **17**(8): 557-64.
- White, G. P., P. M. Watt, et al. (2002). "Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells." *J Immunol* **168**(6): 2820-7.
- Wilhelm, C., K. Hirota, et al. (2011). "An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation." *Nat Immunol* **12**(11): 1071-7.
- Wilson, C. L., A. J. Ouellette, et al. (1999). "Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense." *Science* **286**(5437): 113-7.
- Wolfe, F., K. Ross, et al. (1995). "Aspects of fibromyalgia in the general population: sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms." *J Rheumatol* **22**(1): 151-6.
- Wolk, K., S. Kunz, et al. (2004). "IL-22 increases the innate immunity of tissues." *Immunity* **21**(2): 241-54.
- Wong, J. M., R. de Souza, et al. (2006). "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids." *J Clin Gastroenterol* **40**(3): 235-43.
- Worbs, T., U. Bode, et al. (2006). "Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells." *J Exp Med* **203**(3): 519-27.
- Wrzosek, L., S. Miquel, et al. (2013). "Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent." *BMC Biol* **11**: 61.
- Wyatt, J., H. Vogelsang, et al. (1993). "Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease." *Lancet* **341**(8858): 1437-9.

- Xu, J., M. K. Bjursell, et al. (2003). "A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis." *Science* **299**(5615): 2074-6.
- Xu, X., P. Xu, et al. (2013). "Gut microbiota, host health, and polysaccharides." *Biotechnol Adv* **31**(2): 318-37.
- Yamamoto, Y., H. Tomioka, et al. (1990). "Sex differences in the susceptibility of mice to infection induced by Mycobacterium intracellulare." *Am Rev Respir Dis* **142**(2): 430-3.
- Yan, K. S., L. A. Chia, et al. (2012). "The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(2): 466-71.
- Yang, D., O. Chertov, et al. (2001). "Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37)." *J Leukoc Biol* **69**(5): 691-7.
- Yang, P. C., J. Jury, et al. (2006). "Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens." *Am J Pathol* **168**(1): 104-14; quiz 363.
- Yang, Q., N. A. Bermingham, et al. (2001). "Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine." *Science* **294**(5549): 2155-8.
- Yatsunencko, T., F. E. Rey, et al. (2012). "Human gut microbiome viewed across age and geography." *Nature* **486**(7402): 222-7.
- Yel, L. (2010). "Selective IgA deficiency." *J Clin Immunol* **30**(1): 10-6.
- Yoshimoto, M., M. C. Yoder, et al. (2013). "The murine Th2 locus undergoes epigenetic modification in the thymus during fetal and postnatal ontogeny." *PLoS One* **8**(1): e51587.
- Young, E. A., N. E. Carlson, et al. (2001). "Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women." *Neuropsychopharmacology* **25**(2): 267-76.
- Yu, T., X. Chen, et al. (2012). "Kruppel-like factor 4 regulates intestinal epithelial cell morphology and polarity." *PLoS One* **7**(2): e32492.
- Zareie, M., J. Riff, et al. (2005). "Novel effects of the prototype translocating Escherichia coli, strain C25 on intestinal epithelial structure and barrier function." *Cell Microbiol* **7**(12): 1782-97.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." *Nature* **415**(6870): 389-95.
- Zhang, J., W. Yan, et al. (2006). "p53 is required for nerve growth factor-mediated differentiation of PC12 cells via regulation of TrkA levels." *Cell Death Differ* **13**(12): 2118-28.
- Zhang, L., J. M. Li, et al. (2011). "Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis." *J Clin Immunol* **31**(4): 606-14.
- Zheng, G., S. P. Wu, et al. (2013). "Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner." *Neurogastroenterol Motil* **25**(2): e127-39.
- Zinneman, H. H. and A. P. Kaplan (1972). "The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A." *Am J Dig Dis* **17**(9): 793-7.
- Zufferey, C., D. Erhart, et al. (2009). "Production of interferon-gamma by activated T-cell receptor-alpha/beta CD8alpha/beta intestinal intraepithelial lymphocytes is required and sufficient for disruption of the intestinal barrier integrity." *Immunology* **128**(3): 351-9.