



**HAL**  
open science

# Facteurs de virulence de *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn : caractérisation et régulation de leur expression

Sylvie Miquel

► **To cite this version:**

Sylvie Miquel. Facteurs de virulence de *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn : caractérisation et régulation de leur expression. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I; Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2010. Français. NNT : 2010CLF1MM09 . tel-00719695

**HAL Id: tel-00719695**

**<https://theses.hal.science/tel-00719695>**

Submitted on 20 Jul 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE D'Auvergne  
N° d'ordre

UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
Année 2010

*ECOLE DOCTORALE*  
*DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*  
N° d'ordre :

## *Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne  
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université  
Spécialité : **Microbiologie**

Soutenue le 2 juillet 2010

par

**Sylvie Miquel**

**Facteurs de virulence de *Escherichia coli*  
adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn :  
caractérisation et régulation de leur expression.**

### **JURY**

**Rapporteurs :** LE BOUGUENEC Chantal, Directeur de recherche, Institut Pasteur, Paris, France  
COLONNA Bianca, Professeur, Microbiologie, Université Sapienza, Rome, Italie

**Examineurs :** PEYRET Pierre, Professeur, Clermont-Ferrand I, France  
CASCALES Eric, Chargé de recherche, CNRS-UPR9027, Marseille, France

**Directeurs de thèse :** CLARET Laurent, MCU, JE2526, Clermont-Ferrand I, France  
DARFEUILLE-MICHAUD Arlette, Professeur, JE2526, Clermont-Ferrand I, France

Pathogénie Bactérienne Intestinale, USC INRA-2018  
JE2526, Université d'Auvergne



## Remerciements

Je remercie sincèrement Madame le Pr. Chantal Le Bouguenec et le Pr. Madame Bianca Colonna d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir consacré du temps à sa lecture et son jugement. Je remercie également le Pr. Pierre Peyret ainsi que le Dr. Eric Cascales d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Arlette, je te remercie tout d'abord de m'avoir accueilli dans ton laboratoire pendant plus de quatre années au cours desquelles tu as su me faire partager ton très grand dynamisme, ta persévérance ainsi que la fierté et la passion que tu portes pour ce travail de chercheur. Merci aussi de m'avoir permis de faire de l'enseignement. Tu as su me faire confiance pour cette tâche et c'est avec beaucoup de plaisir et en suivant ton exemple que j'ai essayé de faire aimer la Biologie Moléculaire à mes étudiants comme tu avais su le faire avec moi.

Laurent, merci de toute l'attention que tu as pu me porter au cours de mon Master II. Il est dommage que je n'ai pas pu terminer cette aventure de thèse avec toi.

Nicolas, tu as toujours su prendre de ton temps pour m'écouter, m'aider et me conseiller dans ma réflexion et mes manipulations. Merci aussi pour ton amitié qui, chose rare, et d'aussi bonne qualité que tes connaissances scientifiques.

Anne-Lise, tu es partie trop tôt, j'aurais aimé t'avoir à mes côtés pour la fin de cette thèse. Tes conseils, ton soutien et ton humour décapant me manqueront toujours. Merci pour cette leçon de vie car tes propres mots « profite à fond de tout.... » résumant au mieux ta philosophie.

Elisabeth, tu es la dernière arrivée et je suis très heureuse d'avoir eu la chance de faire ta connaissance. Toujours souriante, objective et de bons conseils ce fut un plaisir de travailler avec toi comme de profiter de quelques petites soirées. Je tiens aussi à te remercier pour les relectures et les conseils lors de la rédaction de mon manuscrit.

Valérie, merci pour ta bonne humeur et tes remarques toujours pertinentes en réunion biblio. Ta présence aura rendu beaucoup plus agréable les pauses déjeuner et les fins de journées tardives.

Richard et Imène, merci pour votre aide lors de la réalisation du papier Fis et/ou du papier génome.

Eric Peyretailade, merci pour toutes tes explications en Bio Info et les bons moments passés dans ton labo, même si parfois il y en avait vraiment ras le bol des Blasts!

Adeline, merci pour tous les moments passés ensemble, soutien, confidences, larmes et fous rires. Dans la vie il est difficile de se faire de véritables amis (surtout dans une ambiance de travail) mais je crois pouvoir me vanter de cette réussite au cours de ma thèse. Merci les Charolais !!!!



Pedro, mon binôme de souris préféré. Même si tu me feras toujours un peu peur dans une animalerie (où en plus la sortie est mal indiquée), tu es vraiment quelqu'un d'adorable ; quoique un peu bruyant. Merci d'avoir été ma station de radio préférée pendant toutes ces années... ;-)

Amélie, merci pour ton sourire quotidien qui nous permet à tous de mettre les petits problèmes trop futiles de côté. Merci aussi pour tes goûts musicaux les plus surprenant, tes barrettes ensoleillées et tes bons gâteaux qui rajoutent une dose de bonne humeur dans le labo.

Marie, Nathalie et Fred merci de m'avoir monter les meilleurs exemples pour le déroulement de ma thèse. Merci pour tous les bons moments passés ensemble dans le labo. Mon petit Fred, merci pour ton humour et j'espère que je resterais pour longtemps ta chouchoute malgré les kilomètres. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite car vous le méritez.

Petit Pierre, Benoît et Jérémy, Lucie et Jenny mes collègues de galère... Merci pour votre gentillesse, votre humour et pour tous les craquages du « bureaux des étudiants ». Je suis certaine que pour chacun(e) d'entre vous les mois à venir pourront parfois être difficiles mais courage ça en vaut la peine.

Je tiens aussi à remercier Marie-Pierre, Carine, Christine et Catherine (à l'IUT) car sans leur aide technique, leur disponibilité mais aussi leur gentillesse les journées auraient été bien plus longues... J'ajoute une pensée pour David qui par son passage aura vraiment su nous surprendre.

Nico D, Emilie, Marga, Fatima, Aurélie, Maud, les voisins, les filles de la microscopie (Claire et Christelle), les stagiaires (en particulier Sophie) merci à tous de votre sympathie.

Caro (ma binôme depuis le début de mes études), Pam, Mathilde et tous les amis de l'IUT (Mich, Micheline, Fab et Jb), merci pour votre soutien et votre humour qui a souvent permis de me remonter le moral.

Jacquette merci tout simplement d'être toi-même car depuis notre rencontre tu es une véritable amie sur laquelle je peux compter, même à des heures tardives de la nuit alors que j'ai perdu mon portable...

Sèv et Francis, merci pour tous les TRES bons moments passés ensemble même si je suis certaine qu'il y en aura beaucoup d'autres... Merci pour les fous rires souvent agrémentés d'un peu de Génépi, pour les vacances, pour nos longues discussions téléphoniques (n'est ce pas Sèv ?), mais surtout pour votre véritable amitié qui me permet de tenir le coup dans les moments les plus difficiles de la vie. Je ne suis pas si douée que Francis pour faire de beaux discours alors je vous dit simplement et sincèrement MERCI les Amis !!!

Pour terminer je souhaite remercier de tout cœur toute ma famille, et surtout mes parents car sans eux rien de tous ça n'aurait été possible. Merci de m'avoir fait confiance au fur et à mesure de toutes ces longues années d'études.



**A Nico, pour m'avoir soutenue, aidée et surtout supportée !**



## SOMMAIRE

Index des illustrations	1
Abréviations	5
Résumé	7
Introduction	8

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. La maladie de Crohn</b>	10
I.1. Généralités	10
1.1. Epidémiologie : prévalence et incidence	10
1.2. Manifestations cliniques et diagnostic	11
1.3. Les marqueurs biologiques	13
1.4. Stratégies thérapeutiques	14
I.2. Etiologie de la MC	17
2.1. Facteurs immunitaires	17
2.2. Facteurs environnementaux	18
2.3. Facteurs génétiques	19
2.3.1. <i>NOD2/CARD15</i>	
2.3.2. Autophagie	
2.3.3. <i>Toll-Like receptor</i>	
2.3.4. La voie Th17	
2.3.6. Autres gènes associés	
2.4. Facteurs infectieux	25
2.4.1. Théorie d'une translocation bactérienne excessive	
2.4.2. Théorie de la dysbiose	
2.4.3 Théorie de l'implication d'un agent infectieux	
<b>II. Microorganismes et MC</b>	30
II. 1. Les différents agents de la piste infectieuse	30
1.1. Implication d'un agent viral	30
1.2. Implication de <i>Candida albicans</i>	32
1.3. Implication d'une bactérie pathogène	33
1.3.1. <i>Helicobacter</i>	
1.3.2. Les bactéries psychrotrophes: <i>Yersinia et Listeria</i>	
1.3.3. <i>Mycobacterium avium</i> subspecies paratuberculosis	
1.3.4. <i>Escherichia coli</i>	
II.2. Caractéristiques des souches de <i>E. coli</i> associées à la MC	38
2.1. Propriétés d'adhésion des souches de <i>E. coli</i> associées à la MC	38
2.2. Propriétés d'invasion des souches de <i>E. coli</i> associées à la MC	39
2.3. Survie et multiplication des souches de <i>E. coli</i> associées à la MC	40
2.3.1. Survie et multiplication en cellules macrophagiques	
2.3.2. Survie et multiplication en cellules épithéliales	
2.4. Souches de <i>E. coli</i> adhérentes et invasives associées à la MC et formation de granulomes	41
2.5. Définition du pathovar AIEC et prévalence	42



<b>III. <i>E. coli</i> : organisation du génome et virulence</b>	43
III.1. Evolution de l'espèce <i>E. coli</i>	43
1.1. Le squelette génomique de l'espèce	43
1.2. Les gènes flexibles	43
1.2.1. Les systèmes de transferts génétiques	
1.2.2. Systèmes de défense des bactéries contre les transferts horizontaux de gènes	
III.2. Classification de l'espèce <i>E. coli</i>	48
2.1. Tests moléculaires et phylogénie de l'espèce	48
2.2. Diversité des souches et pathogénicité	50
2.2.1. <i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)	
2.2.2. <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux (IntEC)	
III.3 Propriétés des AIEC	55
3.1. Clonalité des AIEC	55
3.2. Pouvoir d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales	55
3.3. Capacité de survie en macrophages	60
3.4. Induction et amplification de l'inflammation intestinale par les AIEC	61
3.4.1. Déstabilisation de l'épithélium intestinal par les AIEC	
3.4.2. Amplification d'un état inflammatoire induit en modèle murin	
3.4.3. Induction d'inflammation suite à une colonisation de la muqueuse intestinale via le récepteur CEACAM6	
<b>IV. Régulation de l'expression des gènes</b>	64
IV.1. Régulation au niveau transcriptionnel	64
1.1. La transcription chez les procaryotes	64
1.2. La répression catabolique	65
1.3. Les protéines de type-histone	66
1.3.1. Rôles des protéines de type histone chez les Entérobactéries	
1.3.2. Virulence et protéines de type histone	
IV. 2. Les différentes voies de transduction du signal	74
2.1. Les sérine/thréonine kinases	74
2.2. La méthylation de protéines impliquées dans le chimiotactisme	74
2.3. Systèmes à deux composants	75
2.3.1. Généralité sur les systèmes à deux composants	
2.3.2. Le système d'osmorégulation EnvZ/OmpR et activation de la voie $\sigma^E$	
2.3.3. Implication du système d'osmorégulation EnvZ/OmpR et de la voie $\sigma^E$ dans la virulence de la souche AIEC LF82	
2.4. Seconds messagers bactériens	78
2.4.1. Biosynthèse et hydrolyse du di-GMPc	
2.4.2. Mécanismes d'action	
2.4.3. Exemples de régulations géniques dépendantes du di-GMPc chez des bacilles à Gram négatif	



## TRAVAUX PERSONNELS

Présentation des résultats	85
<b>1. Le facteur flagellaire sigma FliA regule les capacités d'adhésion et d'invasion d'<i>Escherichia coli</i> associés à la maladie de Crohn via la voie dépendante du di-GMP cyclique.</b>	
Introduction	87
Publication n°1	89
Commentaires de la publication n°1	98
<b>2. Rôle de la protéine de type Histone Fis dans la régulation de l'expression des pili de type par la souche AIEC LF82.</b>	
Introduction	102
Publication n°2	103
Commentaires de la publication n°2	115
<b>3. Génome complet de la souche de <i>E. coli</i> adhérente et invasive de référence LF82 associée à la maladie de Crohn.</b>	
Introduction	120
Publication n°3	121
Commentaires de la publication n°3	137
Discussion et perspectives	141
Références bibliographiques	152
Annexes	CD



## Index des illustrations

### Liste des figures

**Figure 1 :** Docteur Burrill B. Crohn (1884-1983).

**Figure 2 :** Incidence et répartition géographique de la maladie de Crohn dans le monde.

**Figure 3 :** Principales différences entre la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).

**Figure 4 :** Principales manifestations extra-intestinales et complications de la maladie de Crohn.

**Figure 5 :** Prévalence des anticorps dirigés contre des résidus glycosylés.

**Figure 6 :** Sérologie anti-bactérienne chez les patients atteints de MC.

**Figure 7 :** Impact des facteurs environnementaux sur le développement et/ou le maintien des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

**Figure 8 :** Schéma représentant la différenciation des lymphocytes T naïfs vers le lignage

**Figure 9 :** Structure de NOD2/CARD15.

**Figure 10 :** Activation de la voie NF- $\kappa$ B par NOD2/CARD15.

**Figure 11 :** Régulation négative de la voie TLR2 par la voie NOD2.

**Figure 12 :** Rôle de l'autophagie dans l'immunité innée et adaptative.

**Figure 13 :** Lien entre les protéines codées par les deux gènes de susceptibilité à la MC.

**Figure 14 :** Activation des récepteurs TLR et réponses immunitaires.

**Figure 15 :** Flore intestinale dans les différentes parties du tube digestif.

**Figure 16 :** *Candida albicans* et l'induction de la production d'anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA).

**Figure 17 :** Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules épithéliales HEP-2 infectées par la souche de *E. coli* LF82.

**Figure 18 :** Clichés de microscopie électronique à transmission de macrophages J774-A1 infectés par la souche de *E. coli* LF82.

**Figure 19 :** Autophagie et contrôle de bactéries intracellulaires.

**Figure 20 :** Cliché de microscopie électronique à balayage d'une structure granulomateuse induite *in vitro* par la souche AIEC LF82.

**Figure 21 :** Schéma de l'évolution bactérienne par acquisition ou perte d'information génétique.

**Figure 22 :** Caractéristiques générales d'un îlot génomique.



**Figure 23 :** Localisation des îlots de pathogénicité (PAI) sur le chromosome de la souche UPEC 536. Représentation basée sur la comparaison des génomes des souches de *E. coli* UPEC 536 et K-12 MG1655.

**Figure 24 :** Mécanisme d'action du système CRISPR/Cas.

**Figure 25 :** Arbre phylogénétique du groupe *E. coli*.

**Figure 26 :** Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches de *E. coli* par amplification génique (PCR)

**Figure 27 :** Différents groupes de *Escherichia coli* pathogènes.

**Figure 28 :** Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* uropathogènes.

**Figure 29 :** Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC).

**Figure 30 :** Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC).

**Figure 31 :** Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC).

**Figure 32 :** Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) et *Shigella*.

**Figure 33 :** Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC).

**Figure 34 :** Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC).

**Figure 35 :** Modèle d'assemblage des pili de type 1 à la surface des bactéries à Gram négatif et organisation de l'opéron *fim*.

**Figure 36 :** Structure de la sous-unité FimH, adhésine des pili de type 1.

**Figure 37 :** Modèle d'assemblage des flagelles à la surface des bactéries à Gram négatif et régulation de la voie flagellaire.

**Figure 38 :** Vésicules de membrane externe.

**Figure 39 :** Déstabilisation des jonctions serrées de cellules Caco-2 par la souche AIEC LF82.

**Figure 40 :** Représentation schématique montrant l'implication des bactéries AIEC dans la MC.

**Figure 41:** Régulation positive ou négative de la transcription des gènes procaryotes.

**Figure 42 :** Régulation de l'opéron lactose par l'inhibiteur transcriptionnel LacI et par l'adénylate cyclase *via* le complexe activateur CAP-AMPC.

**Figure 43 :** Molécule d'ADN de *E. coli* observée en microscopie électronique

**Figure 44 :** Effet de la fixation des protéines de type-histone Fis, H-NS et HU sur la superhélicité de l'ADN.

**Figure 45 :** Régulation de la transcription par la protéine Fis.



**Figure 46 :** Action globale de la protéine Fis sur le surenroulement de l'ADN.

**Figure 47 :** Profil d'expression de la protéine Fis au cours de la croissance cellulaire chez *E. coli* en milieu LB à 37°C.

**Figure 48 :** Effets opposés de H-NS et HU sur la structure de l'ADN.

**Figure 49 :** Répression de la transcription par H-NS.

**Figure 50 :** Mécanismes permettant de contrer la répression médiée par H-NS.

**Figure 51 :** Superposition des structures cristallographiques d'IHF et HU liées à l'ADN.

**Figure 52 :** Mode d'action du répresseur H-NS et de l'activateur Fis en fonction de la température sur l'expression du gène *virF* chez *Shigella flexneri* et *E. coli* entéroinvasif.

**Figure 53 :** Implication de la protéine Lrp dans la variation de phase de l'opéron codant les pili Pap de *E. coli* responsables d'infections urinaires.

**Figure 54 :** Organisation du promoteur de l'opéron *fim* dans la position ON.

**Figure 55 :** Modèle schématique du mécanisme de variation de phase des pili de type 1 chez *E. coli*.

**Figure 56 :** Modèle de signalisation du di-GMPc *via* les protéines à domaines GGDEF et EAL dans le réseau  $\sigma$ S chez *E. coli*.

**Figure 57 :** Transfert des groupements phosphate à partir de l'ATP vers les groupements hydroxyles des sérines et thréonines par les sérine/thréonine kinases

**Figure 58 :** Voie d'activation du chimiotactisme.

**Figure 59 :** Schéma général du fonctionnement des systèmes de régulation à deux composants.

**Figure 60 :** Régulation transcriptionnelle des gènes *ompF* et *ompC* par le régulateur transcriptionnel OmpR.

**Figure 61 :** Activation de la voie  $\sigma$ E par des stress périplasmiques.

**Figure 62 :** Modèle d'implication d'OmpC dans la virulence de la souche AIEC LF82.

**Figure 63 :** Voie de signalisation des seconds messagers : exemple du di-GMPc.

**Figure 64 :** Biosynthèse et dégradation du di-GMPc.

**Figure 65 :** Effecteurs putatifs du di-GMPc.

**Figure 66 :** Modèle d'autorégulation de la synthèse en di-GMPc: exemple de PleD chez *Caulobacter*.

**Figure 67 :** Fractionnement spatio-temporel de la concentration en di-GMPc.

**Figure 68 :** Voie de signalisation du di-GMPc chez *E. coli*.

**Figure 69 :** Modèle montrant le rôle de YcgR dans le contrôle de la mobilité.



**Figure 70 :** Modèle d'implication du di-GMPc dans l'adaptation de *V. cholerae* à son environnement.

**Figure 71 :** Modèle d'implication du di-GMPc dans la régulation des facteurs de virulence de *V. cholerae*.

**Figure 72 :** Modèle d'implication du di-GMPc dans la régulation des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.

**Figure 73 :** Courbes de croissance des mutants invalidés dans les gènes codant les protéines de type-histone *fis*, *hns*, *hupB*, *ihfA* et *lrp* et de la souche sauvage LF82.

**Figure 74 :** Analyse de la mobilité des mutants de délétion ou d'insertion dans les gènes codant des protéines de type-histone de la souche AIEC LF82.

**Figure 75 :** Synthèse des pili de type 1 par les mutants LF82 *fis::Km*, LF82- $\Delta$ *hns*, LF82 *hupB::Km*, LF82- $\Delta$ *ihfA* et LF82 *lrp::Tn10*.

**Figure 76 :** Propriétés d'adhésion de la souche sauvage AIEC LF82 et des mutants LF82 *fis::Km*, LF82- $\Delta$ *hns*, LF82 *hupB::Km*, LF82- $\Delta$ *ihfA* et LF82 *lrp::Tn10*.

**Figure 77 :** Interaction bactérienne avec des explants coliques de souris exprimant le récepteur CEACAM6 humain.

## **Liste des tableaux**

**Tableau 1 :** Principaux critères endoscopiques et anatomo-pathologiques Distinguants RCH et MC.

**Tableau 2 :** Caractéristiques cliniques en fonction de la sérologie.

**Tableau 3 :** Stratégies et cibles pour le traitement des MICI.

**Tableau 4 :** Micro-organismes recherchés dans les tissus de patients atteints de MC.

**Tableau 5 :** Micro-organismes recherchés dans les tissus de patients atteints de MC.

**Tableau 6 :** Arguments pour ou contre l'implication de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) dans la MC.

**Tableau 7 :** Arguments en faveur d'une implication de *E. coli* dans la MC.

**Tableau 8 :** Récapitulatif des différents facteurs  $\sigma$ , des gènes les codant, de leur masse ainsi que de leur spécificité de liaison à l'ADN.

**Tableau 9 :** Protéines à domaines EAL et/ou GGDEF retrouvées chez *E. coli* K-12 et comparaison avec la souche AIEC LF82.



## Liste des abréviations

AAF	Aggregative adherence fimbriae
ADN	Acide désoxyribonucléique
ACCA	Anti-chitobioside
Afa	Afimbrial adhesin
AIEC	Adherent-Invasive <i>E. coli</i>
ALCA	Anti-laminaribioside
AMCA	Anti-mannobioside
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANCA	Deoxyribonuclease (DNase I)-sensitive perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody
Anti-C	Anti-chitin
Anti-L	Anti-laminarin
APEC	Avian pathogen <i>E. coli</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ASCA	Anticorps anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATG16L1	ATG16 autophagy-related 16-like 1
BFP	Bundle-Forming Pili
CEACAM	CarcinoEmbryonic Antigen related Cell Adhesion Molecule
CARD	Caspase Activating Recruitment Domain
CAP	Catabolite Activator Protein
Cas	CRISPR associated sequences
CDS	Coding sequence
CFA	Colonization Factor Antigen
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	Concanavaline A
CRISPR	Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
DAF	Decay Accelerating Factor
DGC	Di-guanylate cyclase
di-GMPc	Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate
DLG5	Disc large homolog 5
DSS	Sulfate de dextran sodique
EAEC	<i>E. coli</i> entéroaggrégatifs
EAF	EPEC adherence factor
EBV	Epstein Barr virus
ECOR	<i>E. coli</i> Reference Collection
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragiques
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasifs
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogènes
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogènes
ExPEC	<i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux
FAD	Flavin adenine dinucléotide
Fis	Factor for Inversion Stimulation
GTP	Guanonise-triphosphate
GWA	Genome-Wide Association
H-NS	<u>H</u> istone-like <u>N</u> ucleoid <u>S</u> tructuring
HTH	<u>H</u> élice- <u>T</u> our- <u>H</u> élice
HU	<u>H</u> istone <u>U</u>
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN	Interféron



IHF	Integration Host Factor
IL	Interleukine
IntEC	<i>E. coli</i> pathogènes intestinaux
IPAF	IL-1 converting enzyme-protease activating factor
IRGM	Immunity-related GTPase protein type M
IRL	Inverted Repeat Left
IRR	Inverted Repeat Right
IS	Insertion Sequence
LA	Localised Adhesion
LEE	Locus of enterocyte effacement
Lésions A/E	Lésion d'attachement effacement
LPF	Long polar fimbriae
LPS	Lipopolysaccharide
Lrp	Leucine-responsive Regulatory Protein
LRR	Leucine-Repeat
LT	Entérotoxines thermolabile
MAP	<i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i>
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MBL	Mannan binding lectin
MC	Maladie de Crohn
MDP	Muramyl dipeptide
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MLEE	Multi locus enzyme electrophoresis
MLST	Multilocus sequence typing
NBD	Nucleotide-Binding Domain
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NMEC	Neonatal meningitis <i>E. coli</i>
NOD	Nucleotide binding Oligomerization Domain
OMP	Protéines de membrane externe (outer membrane protein)
OMV	Outer Membrane Vesicle
PAI	Îlots de pathogénicité
PAS	Photoactive yellow protein-like sensor domain
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
PMN	Polynucléaires neutrophiles
PPM	Phosphopeptidomannane
RCH	Rectocolite hémorragique
REC	Receveur
RISA	Ribosomal intergenic spacer analysis
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SHU	Syndrome hémolytique et urémique
SNP	Single Nucleotide Polymorphisme
SPI	<i>Salmonella</i> îlots de pathogénicité
ST	Entérotoxines thermostable
STEC	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>
Stx	Shiga-like toxines
Tir	Translocated Intimin Receptor
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- $\alpha$	Facteur nécrosant des tumeurs alpha
TUCAN	Tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropathogènes
UTI	Infections du tractus urinaires
VLP	Virus-Like Particules



## Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une affection inflammatoire chronique du tube digestif dont l'étiologie reste mal connue. Les lésions iléales de patients atteints de MC sont anormalement colonisées par des souches pathogènes de *Escherichia coli* appartenant au pathovar AIEC pour Adherent-Invasive *E. coli*. Ces souches adhèrent et envahissent fortement les cellules épithéliales intestinales. Elles sont également capables de se multiplier fortement en macrophages et d'induire une sécrétion élevée de TNF- $\alpha$ .

L'objectif de ce travail est d'analyser les systèmes de régulation de la souche AIEC de référence LF82 impliqués dans l'expression maximale de virulence au sein la lumière intestinale et/ou en conditions intracellulaires.

Nous avons étudié la co-régulation de l'expression des pili de type 1 et des flagelles en partant de l'observation qu'un mutant n'exprimant plus de flagelles perd de façon concomitante sa capacité à synthétiser des pili de type 1. Nous avons pu montrer que cette co-régulation complexe met en jeu la concentration intracellulaire en di-GMP cyclique et en protéine de type-histone Fis. Ces systèmes de régulation transcriptionnelle permettent une expression maximale des pili de type 1 qui, en conditions intestinales, confèrent aux AIEC un avantage par rapport à la flore commensale.

L'annotation et l'analyse du génome de la souche AIEC LF82 a permis de mettre en évidence l'existence d'îlots de pathogénicité, des gènes spécifiques codants de potentiels facteurs de virulence mais également des mutations ponctuelles, de type pathoadaptatives, dans des gènes de virulence connus permettant vraisemblablement aux souches AIEC de coloniser la muqueuse intestinale de patients génétiquement prédisposés à développer une MC.



# INTRODUCTION



## INTRODUCTION

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique du tube digestif caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire intestinal et évoluant par des poussées chroniques et des périodes de rémissions. L'étiologie de cette maladie est encore mal connue et de ce fait, aucun traitement spécifique n'est disponible. La MC touche avec prédilection l'adulte jeune et représente un problème majeur de santé publique de par ses conséquences invalidantes, sa nature chronique et récidivante et sa prévalence croissante. Les données cliniques et expérimentales ont apporté la preuve d'une étiologie multifactorielle à composante génétique. Une des hypothèses étiologiques la plus communément adoptée est que la MC serait la conséquence d'une réponse immunitaire anormale dirigée contre un agent infectieux survenant chez un malade génétiquement prédisposé. Parmi les agents infectieux incriminés, plusieurs arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux sont en faveur d'un rôle possible de *Escherichia coli* dans l'étiologie de la MC.

Les *E. coli*, bacilles à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* sont des bactéries commensales du tube digestif des mammifères et constituent l'espèce dominante de la flore aéro-anaérobie de l'intestin. Cependant, il existe des souches de *E. coli* pathogènes qui se distinguent des souches commensales par l'acquisition de propriétés de virulence à l'égard de l'hôte. Ces propriétés de virulence leur permettent de s'affranchir des mécanismes de défense de l'hôte afin de s'établir dans de nouvelles niches écologiques et d'exprimer leur pathogénicité. Selon les facteurs de virulence acquis et leur tropisme tissulaire, ces souches de *E. coli* pathogènes ou pathovars peuvent être à l'origine d'infection du tractus digestif, de l'arbre respiratoire et du tractus urinaire, mais également de méningites et de septicémies.

Des études menées au laboratoire de « Pathogénie Bactérienne Intestinale » ont permis de montrer que la muqueuse iléale de patients atteints de MC est anormalement colonisée par des souches de *E. coli* ayant la propriété d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales en culture. Aucun des déterminants génétiques d'invasion connus de *Salmonella*, *Shigella* ou *E. coli* responsables d'infections gastro-intestinales n'a été retrouvé chez les souches de *E. coli* isolées de lésions iléales de patients atteints de MC, indiquant que le processus d'invasion repose sur des déterminants génétiques d'invasion originaux. Ces souches sont également capables de survivre et de se multiplier fortement en macrophages



sans induire de mort cellulaire et les macrophages infectés sécrètent des taux élevés de TNF- $\alpha$ . Un nouveau pathovar de *E. coli*, associé à la MC, a pu ainsi être défini et dénommé AIEC pour « Adherent-Invasive *E. coli* ». Chez un patient prédisposé, suite à une colonisation de l'épithélium intestinal *via* le récepteur CEACAM6, les souches AIEC pourraient être capables, de par leur propriété d'invasion des cellules épithéliales intestinales, de franchir la barrière intestinale et de se disséminer dans la muqueuse et dans les tissus sous-jacents. Les souches AIEC pourraient ensuite survivre et se multiplier fortement dans les macrophages résidents, en induisant une synthèse accrue de cytokines proinflammatoires conduisant à l'entretien de l'état inflammatoire. Certains facteurs de virulence de la souche de référence AIEC LF82 ont été mis en évidence notamment des structures de surface comme les flagelles et les pili de type 1.

Le travail qui m'a été proposé s'inscrit dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression de facteurs de virulence des souches AIEC en modèle cellulaire. En particulier la compréhension de la co-régulation existant entre les flagelles et les pili de type 1. De plus, j'ai pu continuer la caractérisation du pathovar AIEC par l'annotation et l'analyse de son génome complet de la souche de référence AIEC LF82.

Une première partie introductive de ce travail fait le point sur la MC et présente les différents arguments en faveur d'une piste infectieuse de cette pathologie et notamment à *E. coli*. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'organisation du génome et aux mécanismes de virulence de cette espèce. Par la suite seront exposés les connaissances actuelles concernant la régulation génique chez les procaryotes en décrivant notamment les différentes voies de transduction des signaux, en particulier le rôle des systèmes à deux composants et du second messager qu'est le di-GMP cyclique.

Dans une deuxième partie sont exposés et commentés les travaux réalisés. Ils concernent tout d'abord l'étude de la co-régulation entre les flagelles et les pili de type 1 faisant intervenir le di-GMP cyclique mais également la protéine de type-histone Fis au contact des cellules épithéliales intestinales. Enfin, l'analyse du génome complet de la souche AIEC de référence LF82 a permis de mettre en évidence la présence de certains facteurs de virulence mais aussi de mieux comprendre son évolution pathoadaptative par rapport aux autres *E. coli* pathogènes. L'ensemble de ces travaux ont permis de mettre en évidence une capacité adaptative des souches AIEC aux conditions rencontrées dans le tractus intestinal chez des patients génétiquement prédisposés.



# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



**Figure 1 : Docteur Burrill B. Crohn (1884-1983).**

Le Dr Burrill B. Crohn, un médecin New-Yorkais, a décrit le premier un groupe de patients atteints d'iléites dans un article publié en 1932. Depuis, cette maladie porte son nom.



**Figure 2 : Incidence et répartition géographique de la maladie de Crohn dans le monde.**  
L'incidence de la MC est globalement plus élevée en Amérique de Nord et en Europe.

## **I. La maladie de Crohn**

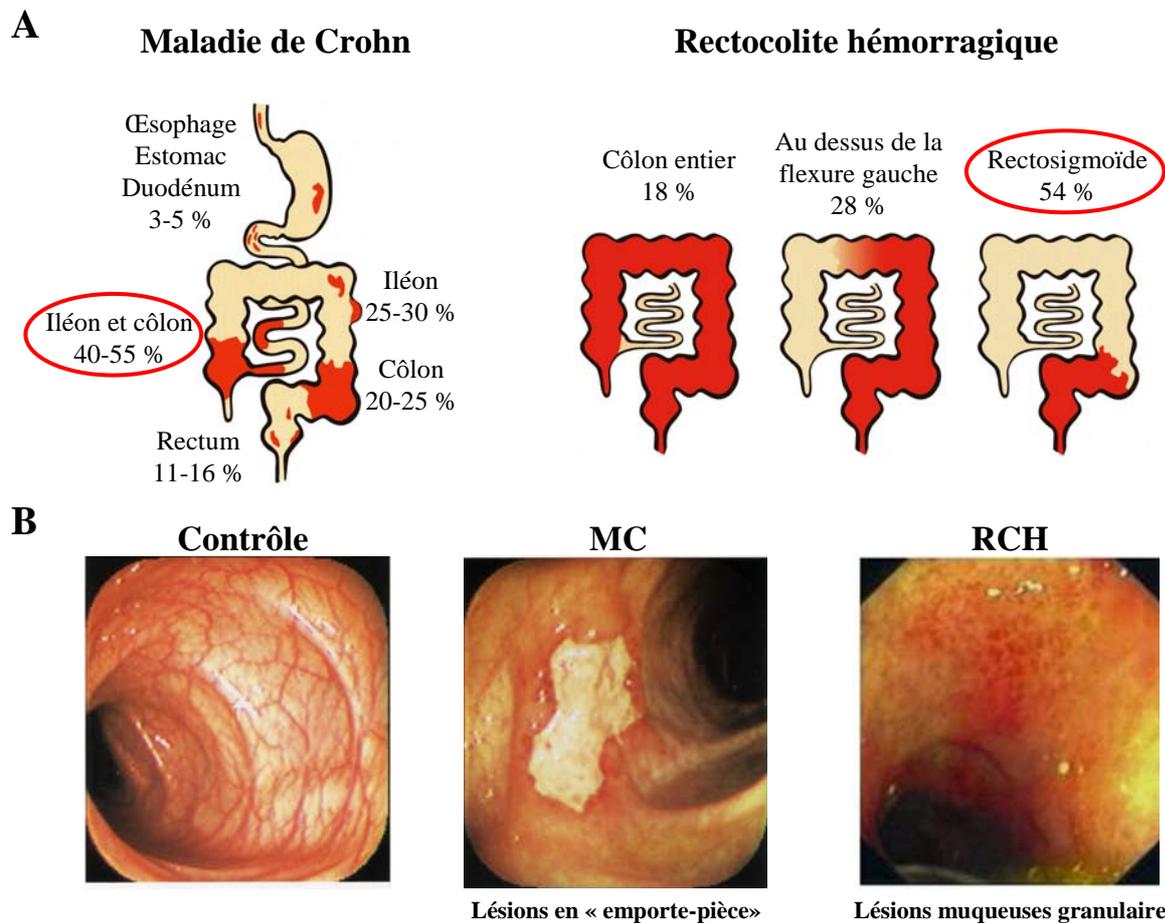
Les maladies inflammatoires chroniques ou cryptogénétiques de l'intestin (MICI), qui incluent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), sont des désordres chroniques du tractus gastro-intestinal. La MC fut décrite pour la première fois en 1932 par Burrus B. Crohn, médecin américain (**Figure 1**), qui donna ainsi son nom à cette pathologie. Il décrivit 14 cas d'une affection appelée alors « Iléite Terminale ou Régionale » et localisée à la moitié terminale de l'iléon. Par la suite, des anomalies tissulaires identiques ont également pu être observées en d'autres sites du tube digestif (Crohn *et al.*, 2000).

La MC est caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire de l'intestin, évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémission clinique de durées variables. Bien que tous les segments du tractus gastro-intestinal, de la bouche jusqu'à l'anus, puissent être affectés, les sièges préférentiels des lésions caractéristiques de la MC sont l'iléon terminal, le côlon et l'anus. Cette pathologie touche avec prédilection l'adulte jeune, présentant un pic d'incidence entre 15 et 30 ans. Elle se caractérise par des douleurs abdominales, de la diarrhée, de la fièvre et une dénutrition. Des manifestations inflammatoires extra-digestives peuvent être également observées au niveau cutané, articulaire ou oculaire (Karlinger *et al.*, 2000). La MC a un fort retentissement sur la vie personnelle et professionnelle des malades en raison de la fréquence des poussées, des complications et du recours parfois itératif à la chirurgie. A ce jour, il n'existe pas de traitement médical spécifique et susceptible de guérir définitivement la MC, mais seulement des traitements suspensifs ayant pour but de contrôler les poussées et de limiter les récurrences. Le diagnostic de la MC peut être difficile et repose sur des observations cliniques, l'endoscopie, les biopsies iléo-coliques et la radiologie de l'intestin grêle. Ses conséquences invalidantes, sa nature chronique et récidivante, et l'absence de traitement étiologique spécifique font de la MC un des problèmes majeurs de l'hépatogastro-entérologie de nos jours.

### **I.1. Généralités**

#### **1.1. Epidémiologie : prévalence et incidence**

La prévalence des MICI a fortement augmenté au cours du siècle dernier et est aujourd'hui estimée à 0,1% dans les pays industrialisés (Shanahan, 2002). Cependant, la répartition des MICI dans le monde est très inégale et la MC et la RCH sont surtout fréquentes en Europe et en Amérique du Nord, alors qu'elles sont rares dans l'hémisphère Sud, à l'exception des populations blanches d'Australie, de Nouvelle-Zélande et d'Afrique du Sud



**Figure 3 : Principales différences entre la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).**

A. La MC peut toucher la totalité du tube digestif, avec une localisation préférentielle au niveau de l'iléon terminal alors que les lésions de RCH se limitent au côlon et au rectum. B. L'endoscopie permet parfois de distinguer les lésions dites en « emporte-pièce » indiquant une MC, des lésions continues et granulaires caractéristiques de la RCH (d'après Inflammatory Bowel Disease, practice manual, 2004).

**(Figure 2).** L'incidence mondiale de la MC est évaluée entre 5 et 7 pour 100 000 habitants et selon les régions du monde, l'incidence annuelle moyenne de la MC varie de 0,7 à 14,6 pour 100 000 habitants (Binder and Orholm, 1996; Farrokhyar *et al.*, 2001). Un gradient Nord-Sud de l'incidence de la MC a notamment été décrit aux Etats-Unis et en Europe (Shivananda *et al.*, 1996; Sonnenberg *et al.*, 1991). En effet, l'incidence de la MC observée dans les pays situés au nord de l'Europe (par exemple, Grande-Bretagne : 6,7 et Suède : 6,1) est plus importante que celle enregistrée dans les pays du Sud de l'Europe (par exemple, Grèce : 0,3 et Espagne : 1,9) (Cortot, 1993). En France, d'après les données du registre EPIMAD, l'incidence de la MC était de 5,1 en 1988 et de 5,9 en 1999 dans la région Nord-Pas-de-Calais. Par ailleurs, selon les données du registre EPI-MICI, l'incidence de la MC dans le département du Puy-de-Dôme était de 6,6 en 1996, ce qui place celui-ci comme département à incidence élevée. Le nombre de patients atteints de MC s'élèverait à 1 million de cas aux Etats-Unis et 1 million en Europe dont 120 000 cas en France.

## **1.2. Manifestations cliniques et diagnostic**

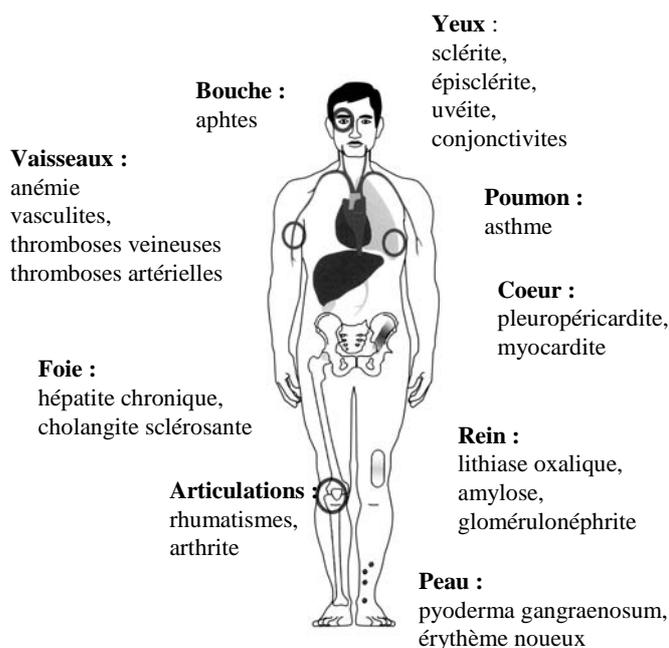
La MC et la RCH présentent des symptômes communs et leur diagnostic différentiel est important, puisqu'il s'agit de maladies distinctes pour lesquelles les stratégies thérapeutiques médicales ou chirurgicales seront différentes. La RCH se caractérise par l'inflammation continue du côlon et évolue par poussées et rémissions successives. Elle débute par le bas du rectum et s'étend d'un seul tenant vers le haut et peut toucher l'intégralité du côlon. En revanche, l'intestin grêle et l'anus ne sont jamais atteints (**Figure 3**). Dans la majorité des cas, le diagnostic différentiel entre la MC et la RCH nécessite la combinaison des examens endoscopiques et anatomo-pathologiques (**Tableau 1**). La distinction entre la MC et la RCH ne pose guère de difficulté, notamment lorsqu'il existe des atteintes ano-périnéales typiques de la MC. En revanche, la distinction entre RCH et MC à localisation limitée au rectum ou au côlon peut être difficile et le diagnostic peut rester, dans ce cas, indéterminé pendant de nombreuses années. Ainsi, les colites indéterminées (CI) regroupent l'ensemble des MICI ne permettant pas de faire la distinction entre MC et RCH. Elles représentent environ 10 à 12% des colites.

Les lésions de la MC sont plurisegmentaires, discontinues, respectant des intervalles de muqueuse saine. Elles touchent toute l'épaisseur de la paroi intestinale. La lésion la plus précoce est l'ulcération aphtoïde, conséquence d'une nécrose des cellules M localisées au niveau des plaques de Peyer. Ultérieurement apparaissent des ulcérations superficielles ou

**Tableau 1 : Principaux critères endoscopiques et anatomo-pathologiques distinguant RCH et MC** (d'après Joossens *et al.*, 2002; Lodes *et al.*, 2004; Morson *et al.*, 1990; Mow *et al.*, 2004b; Quinton *et al.*, 1998; Stange *et al.*, 2006; Targan *et al.*, 2005; Tytgat et Vog, 1983).

Endoscopie	RCH	MC
Nature des lésions muqueuses		
Erythème	+++	+
Effacement des structures vasculaires	++	+/-
Aspect granulaire, friable	++	+/-
Muqueuse boursouflée	-	++
Pseudopolypes	++	++
Ulcérations aphthoïdes	-	++
Ulcérations superficielles	+/-	++
Ulcérations creusantes	-	++
Sténoses	+	++
Topographie des lésions		
Atteinte rectale	+++	+
Atteinte continue et symétrique	+++	+/-
Anomalie de la muqueuse environnante	+	-
Intervalles de muqueuse saine	-	++
Ulcérations iléales	-	++
<b>Anatomo-pathologie</b>	<b>RCH</b>	<b>MC</b>
Fistules	+/-	+
Inflammation séreuse	+/-	++
Lésions anales	+/-	++
Inflammation	muqueuse	transmurale
Epaisseur de la sous-muqueuse	diminuée	augmentée
Altération de la mucosécrétion	+++	+/-
Lymphangiectasie	-	+++
Hyperplasie neuronale	-	+++
Métaplasie des cellules de Paneth	+/-	+++
Granulome épithélioïde	-	++
Hyperplasie lymphoïde	focale	diffuse
<b>Marqueurs sérologiques</b>	<b>RCH</b>	<b>MC</b>
pANCA	45-82 %	2-28 %
ASCA	5-15 %	48-69 %
Anti-OmpC	2 %	55 %
Anti-I2	10 %	50 %
Anti-flagelline	6 %	50 %

- : jamais ; +/- : rare ; + : possible ; ++ : fréquent ; +++ : toujours.



**Figure 4 : Principales manifestations extra-intestinales et complications de la maladie de Crohn.**

(d'après Inflammatory Bowel Disease, practice manual, 2004).

profondes et étendues. Les ulcérations peuvent également atteindre la muqueuse, pouvant conduire à la formation de fistules et d'abcès. Au niveau microscopique, la lésion élémentaire est le granulome épithélioïde et géantocellulaire, présent dans 30 à 60 % des cas. Il s'agit de nodules formés par l'agglomération d'histiocytes associés à quelques cellules géantes. Les granulomes sont le plus souvent localisés dans la sous-muqueuse ou la sous-séreuse (Colombel and Mesnard, 1993).

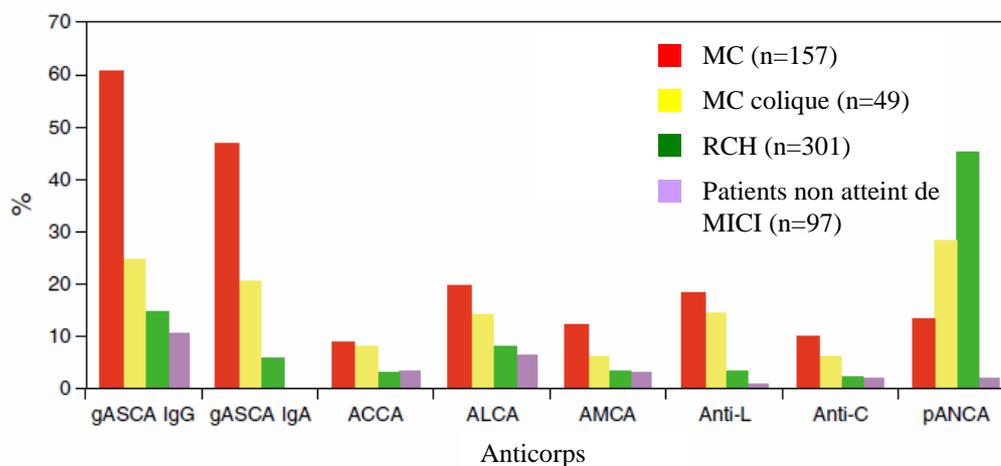
Les manifestations cliniques de la MC sont principalement d'ordre intestinal. La MC se manifeste par des douleurs abdominales très fréquentes au cours des poussées évolutives, et variables dans leur localisation et leur intensité. La diarrhée constitue le second symptôme majeur de la MC. Une atteinte de l'anus ou de la région péri-anale est fréquente, provoquant diverses complications telles que des fistules, des fissures ou des abcès. Les poussées évolutives de la MC s'accompagnent d'une altération de l'état général des patients se traduisant par une asthénie, une anorexie, de la fièvre et une dénutrition. De plus, des manifestations inflammatoires extra-intestinales sont également observées au niveau articulaire, cutanéomuqueux, oculaire, hépato-biliaire et/ou urinaire chez 30 à 40% des patients atteints de MC (**Figure 4**) (Cortot, 1993; Juillerat *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2002). Il existe, de plus, après 10 ans d'évolution de MC, une augmentation du risque de développement d'un cancer colorectal (Dossett *et al.*, 2007).

Le diagnostic de la MC repose d'abord sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, endoscopiques et histologiques. Cependant, il n'existe aucun test permettant d'affirmer à lui seul le diagnostic de la MC. En effet, l'absence d'éléments cliniques, biologiques, radiologiques, endoscopiques ou même histologiques spécifiques de la MC et la variabilité d'expression de la maladie rendent son diagnostic difficile. L'établissement de ce dernier nécessite d'exclure toutes les autres affections curables donnant un tableau clinique analogue (Colombel and Mesnard, 1993; Nikolaus and Schreiber, 2007).

Avant la description de la MC par Crohn en 1932, toute maladie inflammatoire de l'iléon était considérée comme étant d'origine tuberculeuse. De nos jours, la localisation intestinale de l'agent de la tuberculose est devenue exceptionnelle dans les pays occidentaux. Certaines bactéries invasives habituellement responsables d'infections intestinales de courte durée, telles que *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* ou *Campylobacter*, peuvent parfois entraîner des manifestations cliniques similaires. Aussi, une recherche de ces bactéries pathogènes est réalisée lorsqu'une première poussée de MC est suspectée afin d'écarter la possibilité d'une colite infectieuse liée à l'un de ces micro-organismes.

**Tableau 2 : Caractéristiques cliniques en fonction de la sérologie.** (d'après Seow *et al.*, 2009).

Phénotype	Nombre d'anticorps positifs					P value
	1 (n=103)	2 (n=130)	3 (n=77)	4 (n=38)	>5 (n=30)	
Age lors du diagnostic (année)	23,5	19,6	20,2	18,0	19,8	0,0004
MC pénétrante (%)	24,27	25,38	31,17	36,84	46,67	<0,0001
Inflammation périanale (%)	21,36	28,46	24,68	36,84	53,33	0,0005
Inflammation iléocolique (%)	48,54	56,15	41,56	65,79	73,33	0,0002
Chirurgie abdominale (%)	51,64	54,62	63,64	57,89	76,67	<0,0001



**Figure 5 : Prévalence des anticorps dirigés contre des résidus glycosylés.**

Maladie de Crohn (MC) : rouge, MC colique : jaune, Rectocolite hémorragique (RCH) : vert et patients non atteint de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) : violet (d'après Seow *et al.*, 2009).

### 1.3. Les marqueurs biologiques

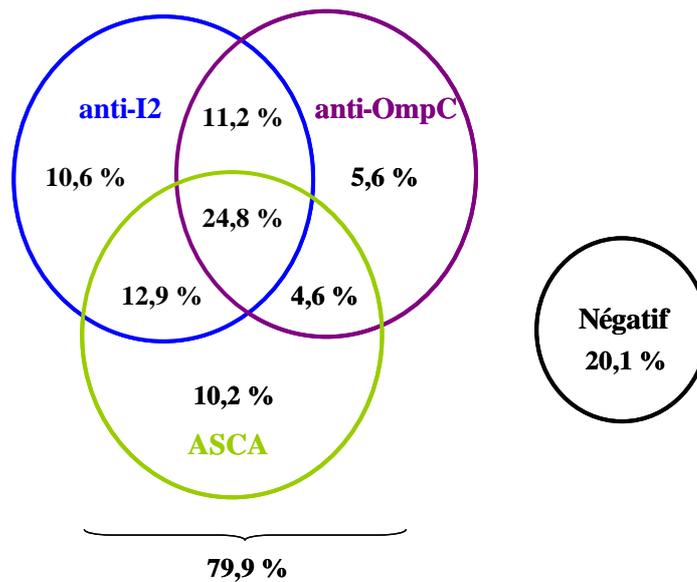
La recherche de marqueurs sériques spécifiques à la MC présente un grand intérêt car ils apportent un bénéfice considérable quant au diagnostic non invasif de la MC (**Tableau 2 et Figure 5**) De plus, ces marqueurs sériques permettent une amélioration des diagnostics précoces ainsi que du suivi de la progression de la maladie et de la réponse d'un patient à une thérapie. Un marqueur idéal doit permettre de suivre l'évolution de la maladie au cours du temps (Meuwis *et al.*, 2007). Ainsi, une grande variété de marqueurs sériques ou sanguins ont été identifiés, cependant aucun n'est spécifique ou assez sensible pour remplacer les diagnostics cliniques. Outre les marqueurs classiques de l'inflammation (CRP, haptoglobine, orosomucoïde, Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  et Interleukine (IL)-6), plusieurs marqueurs sérologiques ont été décrits pour améliorer la fiabilité du diagnostic et la différenciation entre la MC et la RCH (Beaven and Abreu, 2004; Bossuyt, 2006; Joossens *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2003). Ils peuvent être classés en deux groupes : **i.** les anticorps dirigés contre des résidus sucrés et **ii.** les anticorps dirigés contre un épitope bactérien :

#### **i. les anticorps dirigés contre des résidus sucrés**

- **les pANCA** (Deoxyribonuclease (DNase I)-sensitive perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies) qui sont des auto-anticorps qui reconnaissent des antigènes présents dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles tels que la protéinase 3 (Jenne *et al.*, 1990) et la myéloperoxydase (Falk and Jennette, 1988). Suivant les études, la prévalence des pANCA varie entre 50 et 67% chez les patients atteints de RCH et entre 6 et 15% chez ceux atteints de MC, contre moins de 5% dans la population contrôle (Bossuyt, 2006).

- **les ASCA** (Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies) qui sont des anticorps de type IgA ou IgG dirigés contre un résidu mannose de la levure non pathogène *Saccharomyces cerevisiae* (Main *et al.*, 1988; Sendid *et al.*, 1996). La prévalence des ASCA est comprise entre 50 et 60% chez les patients atteints de MC, entre 5 et 15% chez ceux atteints de RCH et entre 0 et 5% chez les sujets témoins (Bossuyt, 2006). Ces anticorps sont associés à un phénotype particulier de la MC, notamment à une maladie se déclarant tôt, à localisation iléale, souvent compliquée par des sténoses ou des fistules (Forcione *et al.*, 2004; Mow *et al.*, 2004b).

La recherche simultanée des pANCA et ASCA dans le sérum des patients permet de différencier les cas de MC avec ceux de RCH ainsi que de prédire la sévérité de la maladie. En effet, les patients atteints de la MC présentent un taux élevé de ASCA et modérer de



**Figure 6 : Sérologie anti-bactérienne chez les patients atteints de MC.**

Pourcentage de patients atteints de MC positifs pour les anticorps dirigés contre les antigènes microbiens suivants : les anticorps anti-I2 dirigés contre la séquence I2 associée à *Pseudomonas fluorescens*, les anticorps anti-OmpC (Outer membrane protein C) dirigés contre une protéine de membrane externe de *Escherichia coli*, et les anticorps ASCA (Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antibodies) dirigés contre *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Mow *et al.*, 2004).

pANCA, et inversement chez les patients atteints de RCH (**Figure 6**) (Ferrante *et al.*, 2007; Reese *et al.*, 2006; Seow *et al.*, 2009).

- **les autres anticorps anti-glycanes**: Ces anticorps sont de la même famille que les ASCA et leur présence est en corrélation avec une forme agressive de la MC. Plusieurs anti-glycanes sont retrouvés chez les patients : ALCA (anti-laminaribioside), ACCA (anti-chitobioside), AMCA (anti-mannobioside), anti-L (anti-laminarine) et anti-C (anti-chitine) et la combinaison ASCA/pANCA/anti-C/anti-L permet un meilleur diagnostic (Seow *et al.*, 2009).

## ii. les anticorps dirigés contre un épitope bactérien

- **les anticorps anti-OmpC** de *E. coli* qui sont dirigés contre la protéine de membrane externe C de *E. coli*. Ces anticorps sont présents chez 37 à 55% des patients atteints de MC (Landers *et al.*, 2002) et sont régulièrement associés à une forme fistulisante et familiale de MC (Mei *et al.*, 2006; Mow *et al.*, 2004a; Mow *et al.*, 2004b).

- **les anticorps anti-séquence I2**. Cette séquence microbienne I2, associée à *Pseudomonas fluorescens*, a été identifiée comme un homologue de la famille des facteurs de transcription TetR et est fréquemment rencontrée dans les lésions coliques des patients atteints de MC (Sutton *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2002). Des anticorps anti-I2 sont retrouvés chez 54% des patients atteints de MC, 10% de RCH, 19% des patients atteints d'autres pathologies inflammatoires de l'intestin et 4% des individus sains.

- **les anticorps anti-flagelline CBir1** qui sont dirigés contre la sous-unité structurale majeure des flagelles bactériens. La flagelline CBir1 a été identifiée comme un antigène déterminant, capable d'induire des colites chez des souris C3H/HeJBir. Chez l'homme, des taux importants d'IgG anti-CBir1 ont été retrouvés chez environ 50% des patients atteints de MC (Lodes *et al.*, 2004).

## 1.4. Stratégies thérapeutiques

✦ Les traitements actuellement utilisés sont en particulier **les anti-inflammatoires non stéroïdiens** que sont les dérivés salicylés tels que la salazosulfasalazine (Salazopyrine®), l'olsalazine (Dipentum®) et la mésalazine (Pentasa®, Rowasa®), les corticoïdes (Cortancyl®, Solupred®) et les immunosuppresseurs tels que l'azathioprine (Imurel®) ou le méthotrexate. Ils ont pour seul objectif de contrôler les poussées et de prévenir les récives de MC. Ces thérapies sont caractérisées par un délai d'action, des taux de réponses incomplets et un risque substantiel d'effets secondaires.

**Tableau 3 : Stratégies et cibles pour le traitement des MICI.**

Les cibles sont indiquées en italique (d'après Kucharzik *et al.*, 2006).

Effet sur l'organisme	Stratégies ou cibles
Anti-inflammatoires et immunosuppresseurs Immunosuppresseurs	aminosalicylés corticoïdes
Immuno-modulation, inhibition des voies de signalisation	aziathioprine anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$ , IL-10 <i>MAP kinase/JNK, Nf-<math>\kappa</math>B/IKK<math>\beta</math></i> <i>T-bet, c-maf, EN-RAGE/RAGE</i> Alpha-MSH/ <i>MC1R</i> , lipoxines
Élimination du processus de présentation de l'antigène	antibiotiques probiotiques ( <i>E. coli</i> , Nissle1917, VSL) helminthes anti-TLR/ <i>TLR</i> TLR9/IFN de type 1
Inhibition de l'activité des lymphocytes T CD4+ et de la reconnaissance de l'antigène	AZA/6MP, CyA, tacrolimus MTX, anti-CD3, CEACAM1
Induction de l'apoptose	thalidomide Anti-TNF- $\alpha$ / <i>TNF-<math>\alpha</math> murin</i> <i>IL-6/sIL-6, Flip, Rac-1</i>
Génération de lymphocytes T régulateurs et activation de lymphocytes T effecteurs	anti-IL-12, anti-TNF- $\alpha$ IL—10 bactérienne
Inhibition du recrutement, de la migration	<i>ICAM-1, Intégrine 4,</i> <i>Intégrine <math>\alpha</math>4<math>\beta</math>, CCR9</i>
Inhibition de l'activation du GALT	<i>LT<math>\beta</math>/récepteur LT<math>\beta</math>, CCR6</i>
Réparation et reconstitution de la fonction de barrière	GM-CSF, KGF-2, EGF facteur tréfoil bactérien hormone humaine de croissance défensines, cathélicidines <i>JAM, CAR, IL-13</i>

✦ **L'acte chirurgical** (résection de tout ou partie de l'intestin ulcéré) est nécessaire en cas d'évolution défavorable de la maladie ou de survenue de complications (sténoses, fistules,...). Quarante-cinq % des patients subissent une opération chirurgicale dans les 2 années suivant le diagnostic de la MC et les résections chirurgicales sont inévitables dans 90% des cas. De plus, l'exérèse des segments atteints ne met pas à l'abri des récurrences.

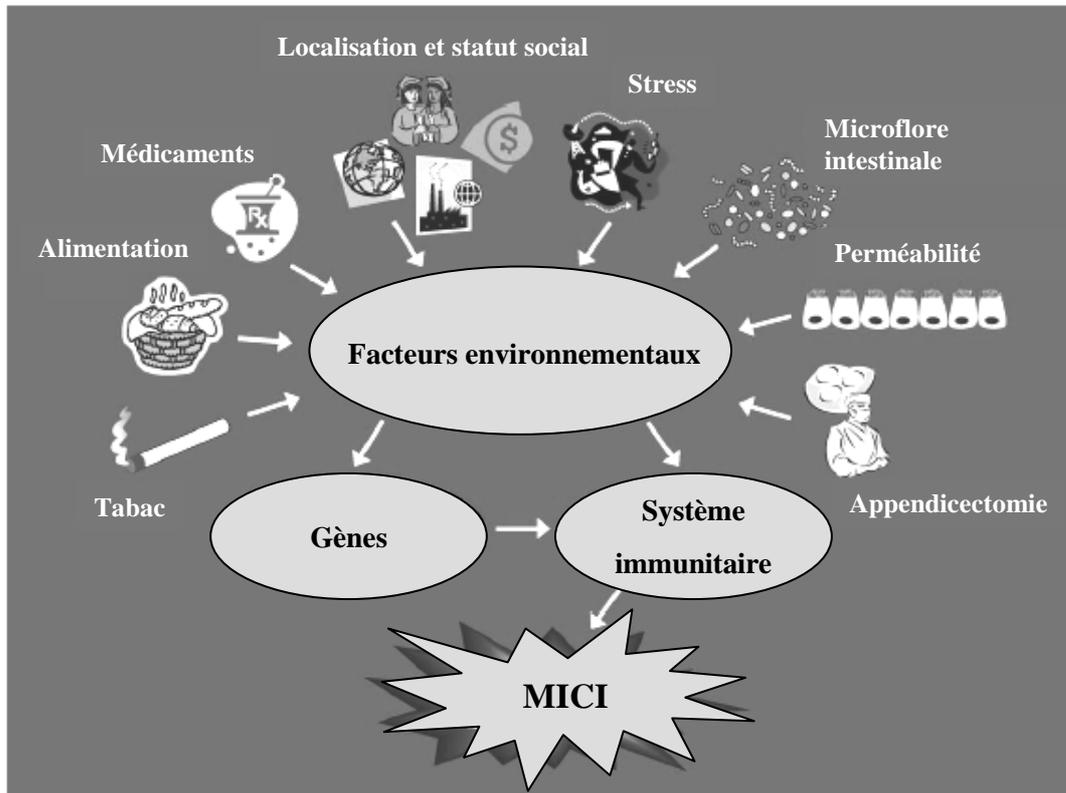
✦ **L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-TNF $\alpha$** , tels que l'Infliximab (Rémicade®) ou l'Adalimumab (Humira®), s'avère une stratégie d'immunomodulation efficace chez les patients ayant une atteinte très sévère de MC et ne répondant pas aux traitements cliniques conventionnels (Sandborn and Hanauer, 2002; Sandborn *et al.*, 2007). Le TNF- $\alpha$  est une cytokine proinflammatoire qui exerce un rôle majeur dans le processus inflammatoire en général et au cours de la MC en particulier (pour revue, (Gross *et al.*, 1991). En effet, les quantités importantes de cette cytokine retrouvées au niveau de la muqueuse intestinale et des selles de patients atteints de MC sont associées à la présence de granulomes et ont un rôle central dans la stimulation et l'expansion clonale des lymphocytes T (Breese *et al.*, 1994 ; Nicholls *et al.*, 1993). L'utilisation des anticorps anti-TNF $\alpha$  s'est révélée efficace, permettant un contrôle des poussées et un maintien des rémissions de MC (Present, 1999; Rutgeerts *et al.*, 1999; Sandborn and Hanauer, 2002). Toutefois, ce traitement présente des limites puisque les patients traités avec l'Infliximab produisent parfois des anticorps anti-Infliximab et sont plus sensibles aux risques d'infections (Arnott *et al.*, 2003; Baert *et al.*, 2003).

L'ensemble des travaux des dix dernières années sur la MC et la RCH laissent supposer que la pathogenèse des MICI repose sur la combinaison d'une susceptibilité génétique, d'une réponse immunitaire anormale, d'un dysfonctionnement de la barrière intestinale et de l'implication de la flore microbienne intestinale. Ainsi, il est suggéré que la manipulation de la flore intestinale pourrait être une bonne méthode thérapeutique. Ces découvertes ont donc encouragé la recherche et le développement de stratégies thérapeutiques nouvelles, alternatives à la chirurgie et à la corticothérapie telles que l'utilisation d'antibiotiques, de probiotiques ou d'agents modulant la réponse inflammatoire (**Tableau 3**) (Kucharzik *et al.*, 2006). De nombreuses études cliniques ont mis en avant l'utilisation d'antibiotiques ou de probiotiques dans le traitement de la MC. Cependant, les résultats montrent que les traitements doivent être choisis au cas par cas, en fonction de la localisation et de l'activité de la maladie (Isaacs and Sartor, 2004; Sartor, 2005).



✦ **Une thérapie antibiotique** peut permettre de diminuer le nombre de bactéries associées à la muqueuse, voire de supprimer les bactéries qui sont responsables des lésions histologiques primaires, et de réduire le taux de translocation bactérienne. Des antibiotiques à large spectre sont fréquemment utilisés avec succès dans le traitement de MC bénigne ou modérée. Cependant, des essais cliniques à grande échelle doivent être encore réalisés (Gionchetti *et al.*, 2006). Parmi les antibiotiques utilisés, est retrouvé un antibiotique actif contre les bactéries anaérobies strictes : le métronidazole. Son utilisation en monothérapie, surtout pour les MC coliques et iléocoliques, a montré dans certains cas des effets bénéfiques (Ambrose *et al.*, 1985; Blichfeldt *et al.*, 1978; Colombel *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 1991; Ursing *et al.*, 1982). Cependant, ce traitement présente de nombreux effets secondaires tels que des nausées, anorexies, dysgueusies, dyspepsies et neuropathies périphériques, ce qui peut limiter son utilisation. D'autres antibiotiques ont été testés dans la traitement de la MC active, notamment la ciprofloxacine, efficace en combinaison avec des traitements standards chez les patients présentant une certaine résistance (Arnold *et al.*, 2002; Colombel *et al.*, 1999). La combinaison de ciprofloxacine avec la métronidazole peut être un traitement alternatif aux stéroïdes dans les phases aiguës de la MC (Prantera *et al.*, 1996; Steinhart *et al.*, 2002). Cette combinaison est aussi utilisée pour le traitement des manifestations périanales de la MC et parfois associé à l'Infliximab (Perna *et al.*, 2001). Il faut noter qu'*in vitro*, la ciprofloxacine peut agir de façon intra-macrophagique et donc cibler des bactéries intracellulaires (Subramanian *et al.*, 2008). D'autres antibiotiques, tels que la rifaxiline (Shafran and Johnson, 2005) ou la clarithromycine (Leiper *et al.*, 2000), ont également été utilisés (pour revue : (Lal and Steinhart, 2006)).

✦ **La thérapie probiotique**, ou utilisation de microorganismes vivants en quantité contrôlée et bénéfique à la santé du patient (FAO/WHO 2001), est une approche thérapeutique alternative dans la prévention de rechute chez les patients atteints de MC. A l'heure actuelle, l'utilisation de probiotiques n'a montré aucun effet dans des phases actives de la MC (pour revue : (Isaacs and Herfarth, 2008)). Pourtant, plusieurs types bactériens ont été testés : *E. coli* Nissle 1917, *Lactobacillus GG* et l'utilisation de microorganismes tels que *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus casei* a montré un effet lors du maintien d'un état de rémission (Fujimori *et al.*, 2007; Guslandi *et al.*, 2000). Cependant, l'utilisation de probiotiques en tant que thérapie de maintien suite à une thérapie médicale ou chirurgicale n'est actuellement pas encore recommandée.



**Figure 7 : Impact des facteurs environnementaux sur le développement et/ou le maintien des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.**

De multiples facteurs environnementaux peuvent modifier l'expression de gènes cibles et moduler la fonction du système immunitaire intestinal, déclenchant ainsi une réponse inflammatoire inappropriée et persistante au niveau de la muqueuse intestinale à l'origine de la survenue, du maintien et/ou de l'aggravation des MICI (d'après Danese *et al.*, 2004).

## **I.2. Etiologie de la MC**

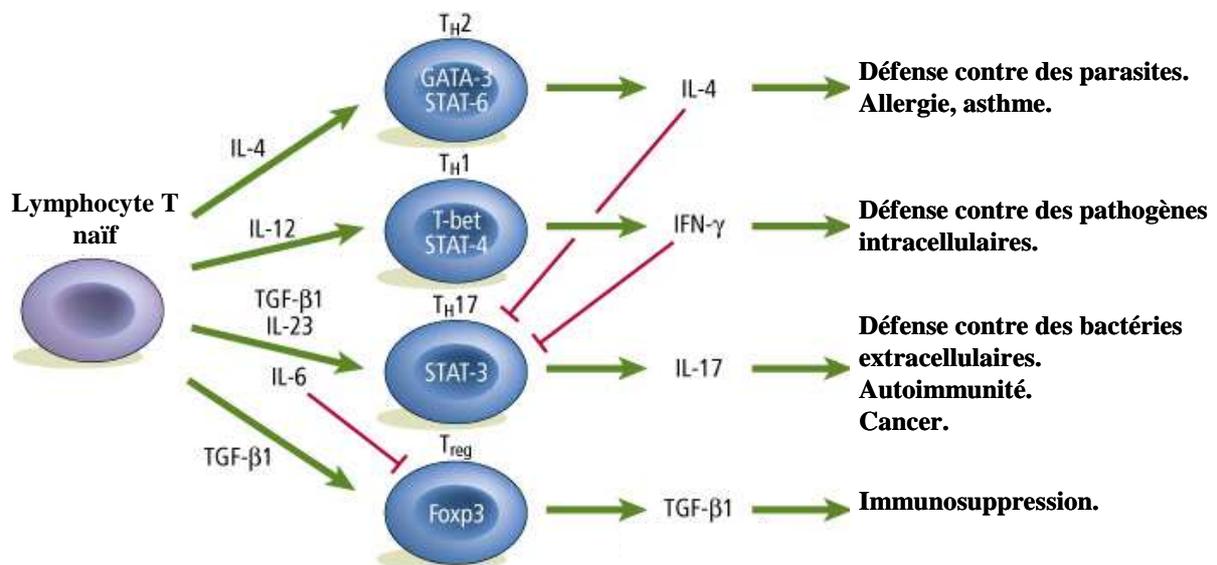
L'étiologie précise de la MC reste à ce jour mal connue. Toutefois, les études cliniques et épidémiologiques ont permis de mettre en évidence l'implication de facteurs environnementaux, de facteurs génétiques associés à une hyperactivation du système immunitaire intestinal et de facteurs infectieux. Les interactions entre ces multiples facteurs restent mal comprises, mais elles aboutissent à une réponse inflammatoire non contrôlée à l'origine de la survenue, du maintien et/ou de l'aggravation de la MC (**Figure 7**).

### **2.1.Facteurs immunitaires**

La MC est caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire qui pourrait être la conséquence d'une dérégulation de la réponse immunitaire innée au niveau de la muqueuse intestinale de l'hôte. En réponse à une infection bactérienne, l'immunité innée est activée et stimule ensuite la réponse adaptative. La détection des microorganismes implique différents récepteurs reconnaissant des molécules ou motifs bactériens, notamment les récepteurs membranaires TLR (Toll-Like Receptor) et les récepteurs cytoplasmiques NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain). Les caractéristiques et l'implication de ces récepteurs dans le développement de la MC seront développées dans le chapitre 2.3. Par ailleurs, la protéine de l'immunité innée MICA, homologue des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I, est surexprimée au niveau intestinal chez les patients atteints de MC. Cette protéine signalerait la présence de bactéries potentiellement pathogènes aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et aux cellules NK (Natural Killer).

L'inflammation intestinale se traduit par un recrutement et une activation des lymphocytes et des macrophages, mais également par une infiltration de cellules polynucléaires neutrophiles (PMN), d'éosinophiles, de monocytes et de mastocytes. La libération consécutive de cytokines solubles et d'autres médiateurs de l'inflammation conduit à l'amplification de la réponse immunitaire locale, responsable des lésions tissulaires. Les cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  sont libérées en grande quantité dans la muqueuse intestinale, conséquence directe de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) chez les patients atteints de MC (Desreumaux *et al.*, 1997; Niessner and Volk, 1995).

Les cytokines inflammatoires joueraient un rôle clé dans l'induction et la chronicité de l'inflammation intestinale chez les patients atteints de MC. En effet, selon l'environnement cytokinique est le principal responsable de la polarisation des lymphocytes T naïfs vers un profil d'activation spécifique tel que Th1 Th17 Th2 (**Figure 8**).



**Figure 8 : Schéma représentant la différenciation des lymphocytes T naifs vers le lignage Th1, Th17, Th2 ou Treg en fonction de leur environnement cytokinique.**

La présence d'**IL-4**, lors de l'initiation de la réponse immune, serait nécessaire dans la différenciation en LT Th2 (Seder, 1994). La fixation de l'IL-4 à son récepteur entraîne l'activation de STAT-6 et du facteur de transcription GATA-3 (Ouyang *et al.*, 2000).

L'**IL-12**, cytokine essentielle dans le développement de la réponse Th1, est principalement produite par les macrophages et les cellules dendritiques après stimulation par divers adjuvants ou par des agents bactériens (Hsieh *et al.*, 1993). L'IL-12 entraîne la production d'IFN- $\gamma$ . La signalisation du récepteur à l'IL-12 active la voie STAT-3 et STAT-4 (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Jacobson *et al.*, 1995). En aval de STAT-4, le facteur de transcription T-bet est spécifiquement exprimé par les LT Th1.

L'**IL-23**, l'**IL-6** et le **TGF- $\beta$**  sont indispensables à la différenciation en LT Th17 (Colgan et Rothman, 2006; Ivanov *et al.*, 2006; Iwakura et Ishigame, 2006). Les LT Th17 peuvent soit se différencier à partir du précurseur commun aux LT Th1 et Th2 soit à partir des LT pré-Th1 (Bettelli et Kuchroo, 2005). Ils produisent des cytokines proinflammatoires IL-17A, IL-17F, IL-6 et TNF- $\alpha$  (Colgan et Rothman, 2006). Le récepteur nucléaire ROR- $\gamma$ T est le facteur de transcription qui orchestre la différenciation vers le lignage Th17 (Ivanov *et al.*, 2006) et l'IL-27 induit celle vers la lignée Th1 et inhibe celle vers le lignage Th-17 (Colgan et Rothman, 2006).

En raison des taux élevés de cytokines de type Th1 observés durant la phase chronique de la pathologie, la MC est considérée comme une pathologie de type Th1/Th17. Cependant, il a été montré que les lésions précoces de la maladie sont associées à une augmentation de la production d'IL-4 (Desreumaux *et al.*, 1997).

## **2.2.Facteurs environnementaux**

En Europe et en Amérique du Nord, l'incidence de la MC n'a cessé d'augmenter au cours de la seconde partie du 20<sup>ème</sup> siècle (Lerebours *et al.*, 2003). La MC présente une répartition hétérogène dans le monde, avec des taux d'incidence géographique se déclinant selon un gradient Nord-Sud. Des différences d'incidence sont aussi constatées dans certaines populations migrantes, avec par exemple l'augmentation du nombre de MICI pour les populations asiatiques migrantes en Europe et inversement la diminution du risque de MICI chez les populations européennes migrantes en Asie (Yang *et al.*, 2001). Enfin, un dernier argument en faveur d'un facteur environnemental dans la MC est l'absence de concordance parfaite de MC chez les jumeaux monozygotiques. Il semblerait notamment que la MC serait associée à une bonne hygiène domestique (Gent *et al.*, 1994; Karlinger *et al.*, 2000; McCormick and Manning, 2001) et ces facteurs environnementaux entraînent des cas familiaux de MC (Hugot *et al.*, 2003b).

De plus, d'autres facteurs environnementaux, probablement liés au style de vie occidental moderne, ont été suspectés dans le développement de la MC.

✦ Le tabagisme actif augmente le risque de survenue de la MC, et aggrave également l'évolution de la maladie même chez le fumeur occasionnel et surtout chez les femmes (pour revue, (Birrenbach and Bocker, 2004; Cosnes *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2007; Reese *et al.*, 2008; Seksik *et al.*, 2009). Le tabagisme passif au cours de l'enfance pourrait augmenter le risque de survenue de MC (Lashner *et al.*, 1993) et à l'âge adulte serait nuisible aux patients (van der Heide *et al.*, 2009). L'arrêt définitif du tabac constitue donc une démarche thérapeutique primordiale dans le traitement de la MC (Cosnes *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2004b). Les mécanismes des effets du tabagisme restent obscurs, mais le tabac affecte à la fois l'immunité des muqueuses et l'immunité systémique, altérant les fonctions de l'immunité innée et adaptative. De plus, il augmente la perméabilité intestinale et la production de mucus au niveau du côlon (Cosnes *et al.*, 2004).

✦ L'alimentation serait impliquée dans la complication ou l'amélioration de la MC. Les fruits et les légumes joueraient un rôle protecteur (Persson *et al.*, 1992; Russel *et al.*, 1998)



alors que la consommation d'aliments de type « fast-food » ou de sucres raffinés serait un facteur de risque de MC (Matsui *et al.*, 1990; Persson *et al.*, 1992; Reif *et al.*, 1997; Russel *et al.*, 1998; Seibold, 2005). Il faut noter que des taux élevés d'anticorps dirigés contre des antigènes alimentaires tels que ceux du maïs, de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ou de protéines du lait de vache ont été retrouvés chez les patients atteints de MC (Davidson *et al.*, 1979; Knoflach *et al.*, 1987; Lindberg *et al.*, 1992; Main *et al.*, 1988; Sendid *et al.*, 1998).

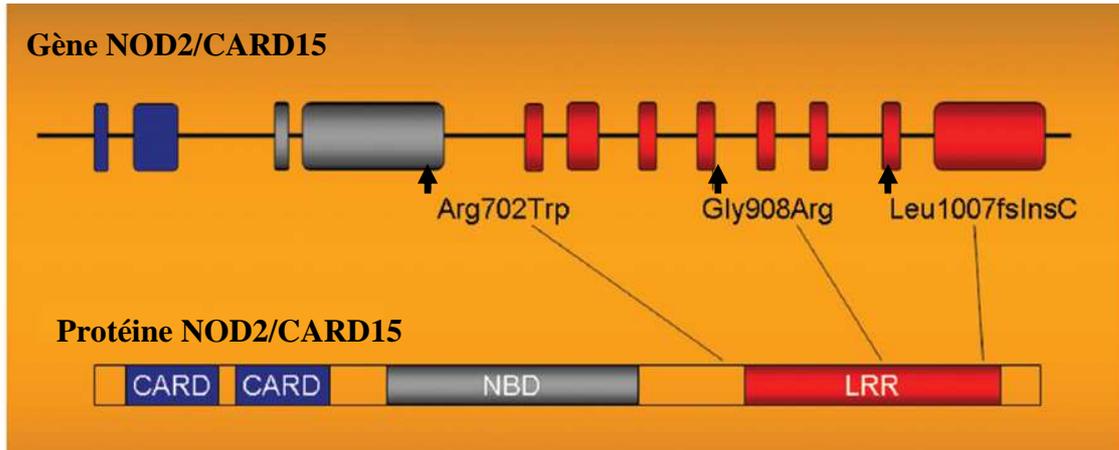
### **2.3.Facteurs génétiques**

La maladie de Crohn n'est pas une maladie « héréditaire » au sens propre du terme, mais il existe des facteurs génétiques de prédisposition à la maladie. Les études épidémiologiques indiquent que le risque de développer une MC lorsqu'un parent du premier degré est atteint est 10 à 21 fois plus élevé que dans la population générale, et la fréquence de formes familiales de MC peut atteindre 40% (Binder and Orholm, 1996; Colombel *et al.*, 1996; Monsen *et al.*, 1991; Orholm *et al.*, 1991), (pour revue (Halme *et al.*, 2006)). Le principal argument en faveur d'une prédisposition génétique est apporté par les études chez les jumeaux. La concordance de la MC varie selon les études de 44,4 à 58,3% chez les jumeaux monozygotiques alors qu'elle est pratiquement nulle (0 à 3,9%) dans le cas de jumeaux dizygotiques (Halfvarson *et al.*, 2003; Orholm *et al.*, 2000; Tysk *et al.*, 1988), pour revue (Halme *et al.*, 2006)).

Plusieurs études d'association à l'échelle du génome (GWA : Genome-Wide Association) ont permis d'identifier plus de 30 locis indépendants associés à la MC, ce qui est une avancée sans précédent permettant de mieux comprendre cette pathologie et plus généralement la composante génétique des maladies multifactorielles (GWA, 2007; Barrett *et al.*, 2008; Hampe *et al.*, 2007; Parkes *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005).

#### **2.3.1. NOD2/CARD15**

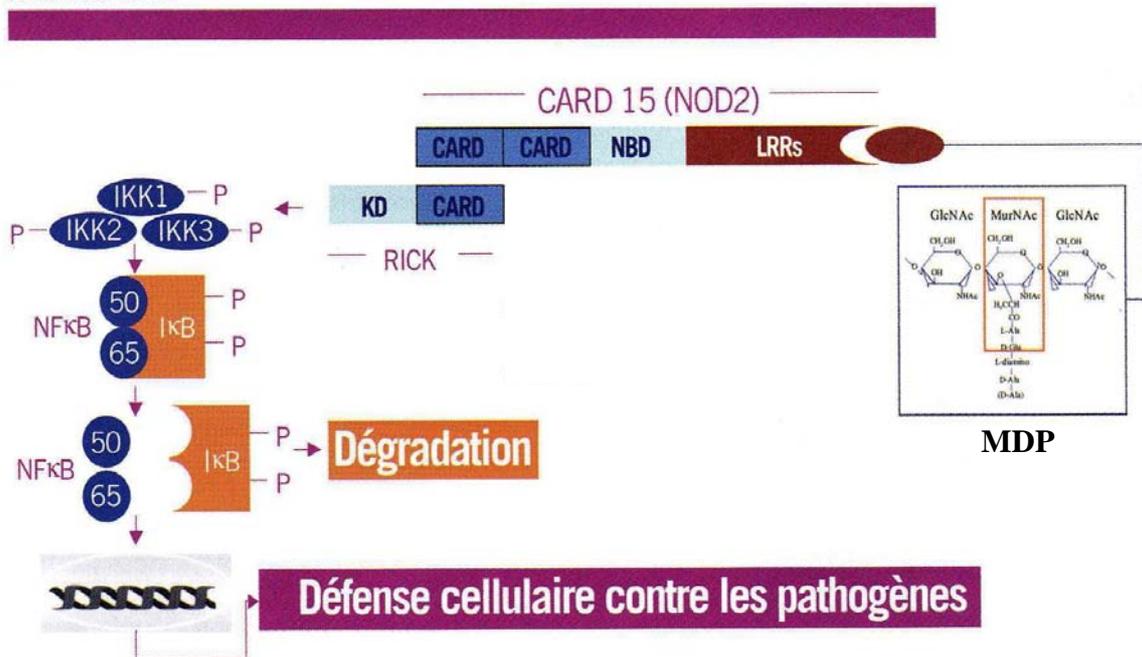
Des études de génétique humaine ont permis d'établir un lien entre la MC et la présence de mutations au niveau du gène *NOD2/CARD15* (Nucleotide-binding Oligomerization Domain/Caspase-Activating Recruitment Domain) localisé sur le chromosome 16. NOD2 est un récepteur cytoplasmique de l'immunité innée, constitué en N-terminal de deux domaines de recrutement et d'activation des caspases (CARD), d'un domaine central de liaison aux nucléotides (NBD, Nucleotide-Binding Domain) et d'un domaine C-terminal composé de



**Figure 9 : Structure de NOD2/CARD15.**

Le récepteur cytoplasmique NOD2/CARD15 contient deux domaines de recrutement et d'activation des caspases situés en N-terminal (CARD, Caspase Activating Recruitment Domain), liés à un domaine de liaison aux nucléotides (NBD, Nucleotide-Binding Domain) et un domaine C-terminal composé de motifs répétés riches en leucines (LRR, Leucin-Rich Repeats). Les flèches indiquent la localisation des 3 principales mutations de la protéine associées à la MC.

## Membrane

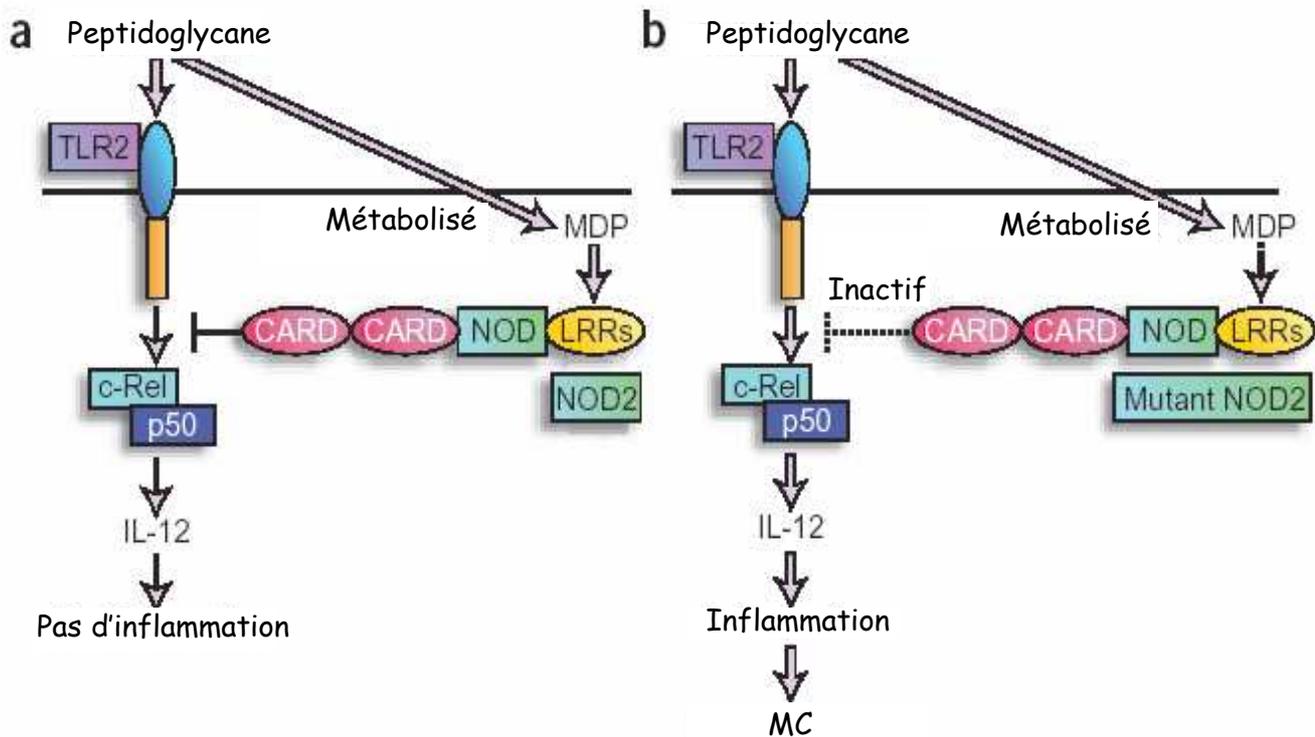


**Figure 10 : Activation de la voie NF-κB par NOD2/CARD15.**

Le MDP, composé bioactif du peptidoglycane bactérien, interagit directement avec le domaine LRR de NOD2/CARD15. Cette liaison conduit à l'oligomérisation de NOD2/CARD15 et au recrutement de la kinase RICK/RIP2 *via* une interaction homotypique CARD-CARD. RIP2/RICK active ensuite le complexe IKK, conduisant à la phosphorylation de IκB. IκB est alors ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome, libérant ainsi le facteur de transcription NF-κB qui pourra être transloqué dans le noyau. Ceci va conduire à l'activation de la transcription de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et de gènes codant des cryptidines et des α-défensines par les cellules de Paneth.

motifs répétés riches en leucine (LRR, Leucin-Rich Repeats) (**Figure 9**). Chez les patients atteints de MC, de nombreuses mutations dans le gène *NOD2* ont été mises en évidence dont trois principales qui conduisent à la production de protéines *NOD2* variantes (R702W, G908R et L1007fsinsC) (**Figure 9**) (Hugot *et al.*, 2001; Inohara *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2001). Il a été estimé que le risque de développer une MC est 1,5 à 3 fois plus important chez les sujets hétérozygotes simples que chez les sujets n'ayant pas de mutation, et environ 40 fois plus important chez les sujets homozygotes mutés ou hétérozygotes composites (deux mutations différentes sur leurs deux chromosomes), ce qui représente le plus important facteur de risque de MC connu à ce jour. Ces mutations sont généralement associées à une maladie plus précoce, à localisation iléale et d'évolution plutôt sténosante (Bouma and Strober, 2003).

Les patients atteints de MC présentent des réponses sérologiques positives à plusieurs antigènes d'origine microbienne, et les réponses sérologiques les plus fortes sont fréquemment retrouvées chez les porteurs d'une des 3 mutations principales de *NOD2* associée à la MC (Devlin *et al.*, 2007). Le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance du muramyl dipeptide (MDP), correspondant à la plus petite structure bioactive du peptidoglycane bactérien (Girardin *et al.*, 2003). L'interaction *NOD2*/MDP induit une cascade d'évènements aboutissant à l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et des MAP-kinases régulant la transcription de gènes cibles qui codent de nombreuses cytokines proinflammatoires (**Figure 10**) (Girardin *et al.*, 2001; Girardin *et al.*, 2002; Girardin *et al.*, 2003; Philpott *et al.*, 2000; Philpott *et al.*, 2001). Cependant, même si une augmentation de l'activité NF- $\kappa$ B est mesurée dans des biopsies coliques de patients (Schreiber *et al.*, 1998), les résultats obtenus *in vitro* ont montré une diminution de l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B par les trois principales formes mutées de *NOD2* associées à la MC comparativement à la protéine sauvage (Girardin *et al.*, 2003). Afin d'évaluer les fonctions de certains variants de *NOD2 in vivo*, des souris « knock-in » ont été générées. Ces animaux montrent une plus grande susceptibilité à l'induction de la colite induite au sulfate de dextran sodique (DSS) suite à une activation exacerbée de la voie NF- $\kappa$ B en réponse au MDP et une augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Maeda *et al.*, 2005). De plus, la forme sauvage de *NOD2* inhibe la réponse immunitaire innée initiée par les bactéries de la flore *via* la voie de signalisation TLR (Toll-Like Receptor)-2, bloquant ainsi la production accrue de cytokines proinflammatoires, ce qui n'est pas le cas pour le variant *NOD2* L1007fsinsC (**Figure 11**) (Watanabe *et al.*, 2004). L'absence d'une telle régulation conduirait à une susceptibilité augmentée à développer une MC (Watanabe *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2008).



**Figure 11 : Régulation négative de la voie TLR2 par la voie NOD2.**

**A.** Le peptidoglycane bactérien se lie au récepteur transmembranaire TLR2 et active cette voie de signalisation. Parallèlement, le MDP se fixe au domaine LRR du récepteur intracellulaire NOD2 qui va, une fois activé, exercer un rétrocontrôle négatif sur la voie TLR2. Ainsi, dans les conditions normales, il y a un équilibre entre les voies NOD2 et TLR2 qui permet de limiter la production de la cytokine proinflammatoire IL-12 et de contrôler l'inflammation. **B.** Dans le cas où un patient exprime une protéine NOD2 mutée, le MDP n'activera plus la voie de signalisation NOD2 et le contrôle négatif de cette voie sur la voie TLR2 est inactivé. Le peptidoglycane active donc la voie TLR2 conduisant à une production accrue d'IL-12 pouvant déclencher une réponse inflammatoire et une MC. Cette interaction entre les voies NOD2 et TLR2 permet de comprendre pourquoi les patients porteurs des mutations dans le gène NOD2 sont prédisposés à développer une MC (d'après Watanabe *et al.*, 2004).

Le récepteur NOD2 jouerait également un rôle de protection en limitant la multiplication de bactéries intracellulaires dans des cellules épithéliales intestinales humaines, comme cela a été montré avec *Salmonella* et *Streptococcus* (Hisamatsu *et al.*, 2003; Opitz *et al.*, 2004). Par contre, la protéine variante NOD2 L1007fsinsC associée à la MC n'est plus capable d'exercer cette fonction. Cet effet protecteur serait en lien avec la capacité de NOD2 à s'associer à la membrane plasmique, étant donné que le mutant L1007fsinsC n'est plus localisé à la membrane plasmique (Barnich *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005).

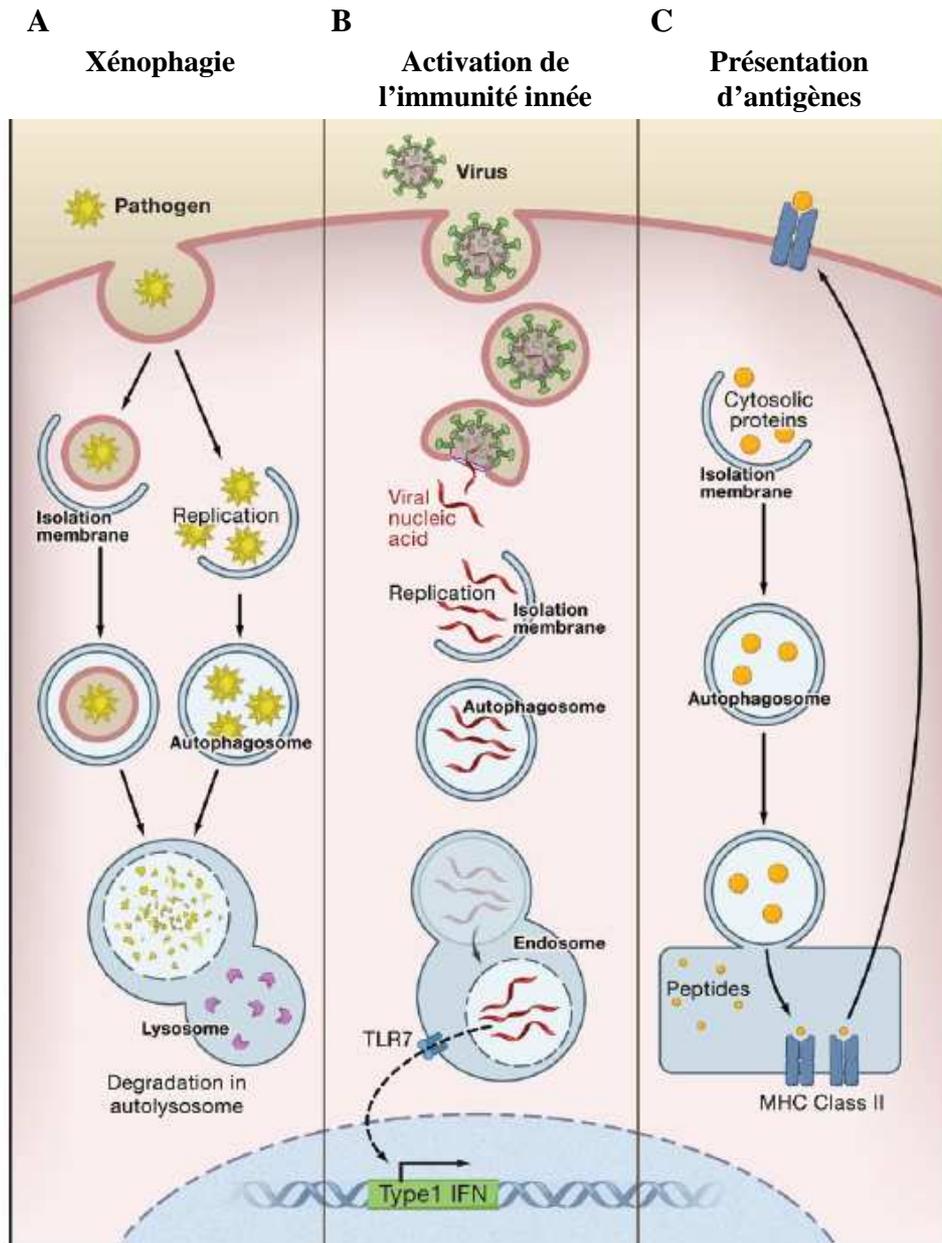
Il faut noter que les souris invalidées pour le gène *NOD2* présentent un développement anormal des plaques de Peyer ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale et une réponse immunitaire mucoale exagérée (Barreau *et al.*, 2007). Par ailleurs, pour certains patients présentant une forme iléale de MC et des mutations au niveau du gène *NOD2*, un défaut de production de peptides antimicrobiens, les  $\alpha$ -défensines, a été observé au niveau des cellules de Paneth (Fellermann *et al.*, 2006; Wehkamp *et al.*, 2004; Wehkamp *et al.*, 2005). Cependant, une autre étude a montré que cette diminution de production de défensines n'était pas directement liée au statut NOD2 mais dépendante du contexte inflammatoire (Simms *et al.*, 2008).

Ainsi, la perte du contrôle de l'infection bactérienne, l'augmentation de la perméabilité au niveau des plaques de Peyer, la déficience de production de défensines par les cellules de Paneth chez les souris *nod2*<sup>-/-</sup> renforcent l'hypothèse de l'implication d'agents bactériens dans l'étiologie de la MC chez les patients qui expriment une protéine NOD2 non fonctionnelle.

### 2.3.2. Autophagie

Deux études de GWA ont récemment montré une forte association entre le développement de MC et la présence des substitutions A197T (Latiano *et al.*, 2009; Rioux *et al.*, 2007) ou A300T (Hampe *et al.*, 2007) dans la protéine **ATG16L1** (ATG16 autophagy-related 16-like 1) impliquée dans la voie de l'autophagie. L'autophagie est un processus biologique nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire et au renouvellement des organites cellulaires. De plus, l'autophagie joue un rôle dans la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte vis-à-vis des pathogènes (Amer and Swanson, 2005; Deretic, 2005; Dupont and Lafont, 2009; Nakagawa *et al.*, 2004; Schmid and Munz, 2007; Singh *et al.*, 2006) et pourrait donc avoir un rôle clé dans la MC (**Figure 12**).

La voie de l'autophagie permet la dégradation de bactéries intracellulaires. En modèle de cellules épithéliales humaines déficientes pour les gènes de l'autophagie ATG16L1 (variant



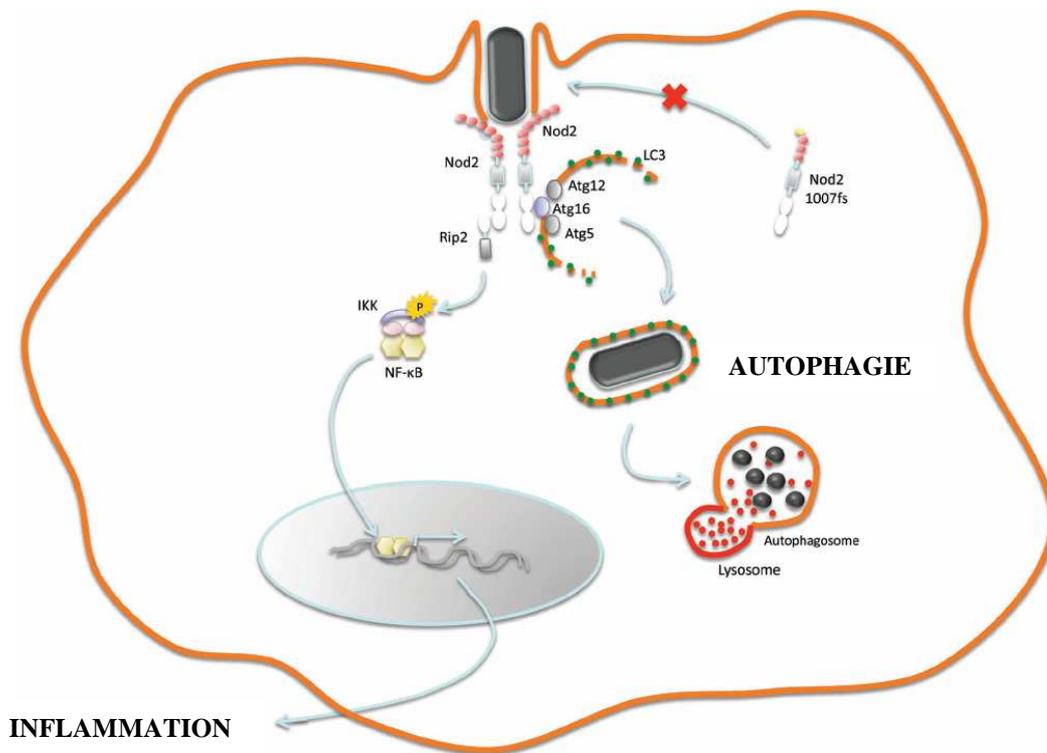
**Figure 12 : Rôle de l'autophagie dans l'immunité innée et adaptative.**

**A.** Les pathogènes intracellulaires (bactéries, protozoaires ou virus) sont soit libres dans le cytosol soit présents dans des vacuoles. Ils sont entourés par une membrane qui s'allonge afin de former un autophagosome. Après fusion avec un lysosome, le contenu de l'autophagosome est dégradé. **B.** L'autophagie peut être impliquée dans l'activation de l'immunité innée en délivrant des acides nucléiques viraux à un endosome présentant TLR-7 à sa membrane, activant ainsi la production d'IFN. **C.** L'autophagie peut être aussi impliquée dans l'immunité adaptative en délivrant des antigènes microbiens à un endosome tardif où ils sont pris en charge par des molécules du CMH de classe II pour être présentés aux lymphocytes T CD4+ (d'après Levine et Kroemer, 2008)

ATG16\*300T) et IRGM (Immunity-related GTPase protein type M), une souche de *E. coli* isolée de patient atteint de la MC se multiplie plus intensément, et ceci n'est pas observé avec d'autres souches pathogènes ou commensales du même genre. Ces données sont en accord avec une étude faite avec *S. Typhimurium* (Kuballa *et al.*, 2008) et suggèrent qu'un dysfonctionnement de l'autophagie chez des patients serait favorable à la persistance de bactéries de type *E. coli*, ceci pouvant conduire à une réponse immunitaire exacerbée caractéristique de la pathologie (Lapaquette *et al.*). De plus, en modèle murin hypomorphe pour l'expression du gène *atg16l1* ou chez des patients atteints de MC homozygotes pour la mutation *atg16L1T300A*, les cellules de Paneth sécrètent moins de granules donc moins de peptides antimicrobiens (Cadwell *et al.*, 2008). Récemment, il a aussi été mis en évidence un lien entre NOD2 et autophagie : NOD2 recrute ATG16L1 au site d'entrée des bactéries, activant ainsi la machinerie autophagique. Le mutant NOD2 L1007fsinsC associé à MC est incapable d'activer la voie NFκB et de recruter la protéine ATG16L1 (**Figure 13**). NOD2 affecte ainsi la réponse autophagique en réponse au MDP pour cibler les bactéries intracellulaires (Travassos *et al.* 2010). L'interaction NOD2/machinerie autophagique relie les deux composants majeurs de susceptibilité à la MC.

La réponse immunitaire adaptative est également influencée par le processus autophagique. En effet, l'autophagosome fusionne avec les lysosomes, conduisant ainsi à la dégradation des éléments contenus dans l'autophagosome et à la génération de peptides chargés ensuite sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. La présentation d'antigènes *via* ce processus a été démontrée chez des cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles » mais aussi chez des cellules épithéliales (**Figure 12**) (Schmid and Munz, 2007). Les cellules épithéliales faisant très peu d'endocytose, ce mécanisme semble important pour la présentation d'antigènes et la surveillance immunitaire (Dengjel *et al.*, 2005).

Une mutation dans le gène codant la protéine **IRGM**, appelé aussi p47 GTPase et intervenant dans l'autophagie, a également été associée à la MC (Parkes *et al.*, 2007). Cependant, cette mutation est silencieuse (T313C) et ne modifie pas la séquence protéique. Il faut aussi noter l'existence simultanée d'une importante délétion de 20Kb dans le promoteur de ce gène. Enfin, le gène *NCF4* codant la protéine p40<sup>phox</sup> a également été associé à la MC. Cette protéine est une sous-unité de la NADPH-oxydase et joue un rôle important dans l'activité anti-microbienne du phagosome (Ellson *et al.*, 2006; Suh *et al.*, 2006). Des mutations au niveau du gène *NCF4* pourraient donc perturber l'efficacité dégradative du phagosome, provoquant une stimulation prolongée du système immunitaire suite à l'élimination incomplète des pathogènes.



**Figure 13 : Lien entre les protéines codées par les deux gènes de susceptibilité à la MC.**

Lors d'un processus d'infection, NOD2 doit être recrutée au site d'entrée des bactéries et induit l'activation de la voie NF-κB par le recrutement de RIP2. Ce processus conduit à une réponse inflammatoire intense et à l'induction d'une réponse autophagique précoce par le recrutement de la protéine ATG 16L1 au site d'entrée de la bactérie. Chez les patients MC exprimant la protéine NOD2 L1007fsinsC variante, NOD2 n'est plus recruté au site d'entrée de la bactérie et la capacité de la cellule à activer l'autophagie est perdue (d'après Travassos *et al.*, 2010).

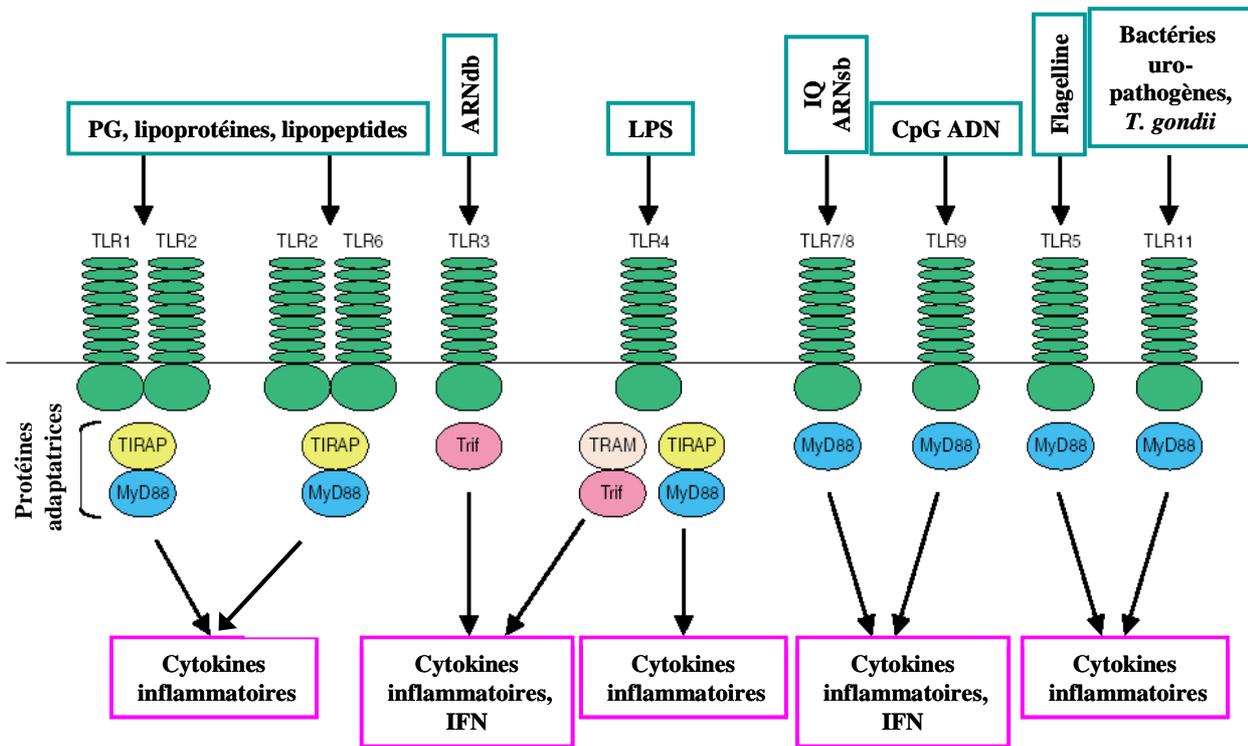
### 2.3.3. Toll-Like receptor

Les récepteurs membranaires TLR, notamment exprimés par les monocytes-macrophages et les cellules dendritiques, jouent un rôle majeur dans la détection de microorganismes et dans l'initiation des réponses immunitaires (Cario, 2005). Leur activation entraîne des cascades de signalisation conduisant à l'augmentation de l'expression de gènes codant des protéines proinflammatoires. Une augmentation de l'expression de TLR4, récepteur activé par le LPS (lipopolysaccharide) bactérien, composant de la paroi des bactéries à Gram négatif, a été observée en surface des cellules épithéliales intestinales des patients atteints de MICI (**Figure 14**) (Cario and Podolsky, 2000; Hausmann *et al.*, 2002). Par ailleurs, deux substitutions d'acides aminés (D299G et T399I) dans la séquence protéique des TLR-4 ont été retrouvées chez certains patients atteints de MC mais les conclusions des études concernant l'association entre le polymorphisme des TLR-4 et le risque de développer une MC sont controversées, vraisemblablement à cause de fonds génétiques ethniques différents, indiquant donc que le polymorphisme de TLR-4 ne constituerait qu'un facteur de risque mineur pour la MC (Arnott *et al.*, 2004; Brand *et al.*, 2005; Franchimont *et al.*, 2004; Oostenbrug *et al.*, 2005; Torok *et al.*, 2004).

Parallèlement à l'augmentation de l'expression de TLR-4 à la surface de l'épithélium intestinal chez les patients atteints de MICI, il a également été observé une diminution de l'expression du récepteur TLR-3, récepteur activé par des ARN double brin, sans modification de l'expression des récepteurs TLR-2 et 5, récepteurs activés respectivement par le peptidoglycane et la flagelline (Cario and Podolsky, 2000). De plus, un polymorphisme dans le promoteur du récepteur TLR-9, activé par des motifs CpG de l'ADN bactérien, a été observé et est significativement associé à la MC (Torok *et al.*, 2004). Cependant, aucune différence d'expression de ce récepteur n'a été mise en évidence chez les patients atteints de MICI (Pedersen *et al.*, 2005).

### 2.3.4. La voie Th17

La cytokine proinflammatoire IL-12, cytokine hétérodimérique comprenant les sous-unités IL-12p40 et IL-12p35, joue un rôle majeur dans les phénomènes inflammatoires de la MC, suggérant que la MC est une maladie de type Th1 (Bouma and Strober, 2003; Strober *et al.*, 2002). La sous-unité IL-12p40 peut également se combiner avec la sous-unité IL-23p19



**Figure 14 : Activation des récepteurs TLR et réponses immunitaires.**

Le TLR2 en dimérisant avec le TLR1 ou le TLR6 va reconnaître différents constituants bactériens (peptidoglycane (PG), lipoprotéines et lipopeptides triacylés ou diacylés). Le TLR3 reconnaît des molécules virales d'ARN double brin (db). Le TLR4 reconnaît le LPS bactérien. Les TLR7/8 reconnaissent des molécules d'imidazoquinolines (IQ) et d'ARN simple brin (sb). Le TLR9 est activé par des îlots CpG d'ADN bactérien ou viral. Le TLR5 reconnaît la flagelline et le TLR11 murin reconnaît des composants de bactéries uropathogènes ou du parasite *Toxoplasma gondii*. L'activation des TLR déclenche des voies de signalisation (NF- $\kappa$ B, MAPK...) par l'intermédiaire des protéines adaptatrices (TIRAP, MyD88, Trif ou TICAM1 et TRAM ou TICAM2) conduisant à l'activation de la transcription de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , Il-6, Il-1 $\beta$  et Il-12) et d'IFN  $\alpha$  et  $\beta$  (d'après Kawai et Akira, 2006).

pour former l'IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000). Des études cliniques ont mis en évidence une association entre la MC et plusieurs polymorphismes dans le gène **IL23R**, situé sur le chromosome 1 en position 1q31, qui code une sous-unité du récepteur à l'IL-23 (Duerr *et al.*, 2006; Latiano *et al.*, 2008; Neurath, 2007). Ce résultat, ainsi que la réévaluation des données précédemment publiées, ont remis en cause l'idée que la MC est une maladie strictement de type Th1. Les polymorphismes du gène **IL23R** augmenteraient le risque de MICI, mais de façon surprenante, une des substitutions d'acides aminés observée (A381G) conférerait au contraire une protection contre la MC. Comme l'IL-12, l'IL-23 est sécrétée par les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages. L'IL-23 joue un rôle majeur dans le maintien de la réponse lymphocytaire Th17. La fonction exacte de cette population lymphocytaire, caractérisée par la production d'IL-17, est encore mal définie ; cependant ces lymphocytes semblent jouer un rôle majeur au niveau des barrières mucosales et leur dérégulation a été impliquée dans de nombreux phénomènes inflammatoires et auto-immuns. Il est à noter que l'IL-17 stimule à son tour la production de peptides antimicrobiens et le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Ces données suggèrent donc que la MC est une pathologie non seulement Th1, mais également Th17. Des populations lymphocytaires mixtes Th1/Th17, capables de sécréter à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- $\gamma$ , ont été mis en évidence chez les patients atteints de MC (Maynard and Weaver, 2009).

### 2.3.5. Autres gènes associés

✦ Des mutations dans le gène **DLG5** (Drosophila Disc Large Homolog 5) ont également été associées à la MC (Daly *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2005; Stoll *et al.*, 2004). Le gène **DLG5**, locus situé sur en position q23 sur le chromosome 10, code une protéine de la famille des guanylate-kinases. La protéine est localisée au niveau des jonctions entre cellules et est impliquée dans la morphologie cellulaire, le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal et la régulation de la croissance cellulaire (Humbert *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 2003). La synthèse de variants de la protéine DLG5 pourrait être liée à une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale (Stoll *et al.*, 2004; Wakabayashi *et al.*, 2003).

✦ Des mutations dans les gènes **OCTN** (Organic Cation Carnitine Transporter) 1 et 2 ont été indépendamment associées à la MC (Peltekova *et al.*, 2004). Ces gènes codent des transporteurs membranaires de cations organiques et de carnitine, médiateur essentiel de l'oxydation des acides gras. Le variant OCTN1 associé à la MC présente une substitution d'un



acide aminé dans son domaine transmembranaire qui entraîne une diminution du transport de la carnitine et une augmentation de celui de cations organiques. Cependant, aucune étude ne démontre de fonction ou d'expression altérée des gènes OCTN1 et 2 chez les patients atteints de MC (Noble *et al.*, 2005; Peltekova *et al.*, 2004).

✦ Une association entre un polymorphisme du gène *CARD8/TUCAN* (tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine) et la MC a également été rapportée (McGovern *et al.*, 2006). La protéine TUCAN est exprimée au niveau de l'épithélium gastro-intestinal (Pathan *et al.*, 2001) et serait un régulateur négatif de la voie NF- $\kappa$ B (Stilo *et al.*, 2002). Le polymorphisme de TUCAN associé à la MC serait également lié aux mutations retrouvées dans le gène *NOD2*.

## 2.4. Facteurs infectieux

Parmi les facteurs environnementaux, de nombreux arguments épidémiologiques, cliniques, génétiques et expérimentaux sont en faveur d'une implication d'un agent infectieux dans l'apparition et le développement de la MC.

✦ **Les données épidémiologiques** montrent une évolution de la composition de la flore digestive due à l'hygiène et aux habitudes alimentaires au cours des 60 dernières années (Gent *et al.*, 1994) ainsi qu'à l'augmentation de l'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire. Ces changements pourraient être à l'origine d'un déséquilibre entre espèces bactériennes intestinales potentiellement « protectrices » au profit d'espèces « néfastes » (Tamboli *et al.*, 2004; Van Kruiningen and West, 2005).

✦ **Les données cliniques** montrent que les symptômes associées à la MC, incluant les manifestations extra-intestinales, peuvent être similaires à des infections avec des bactéries pathogènes à tropisme intestinal telles que *Campylobacter*, *Shigella* et *Yersinia*. De plus, il existe des risques accrus de septicémies suite aux interventions chirurgicales chez les patients atteints de MC pouvant être liés à une forte translocation bactérienne observée (Laffineur *et al.*, 1992).

✦ **Les études d'associations génétiques** (voir chapitre 2.3) ont permis d'identifier des mutations associées à la MC dans de nombreux gènes, en particulier des gènes codant des récepteurs de l'immunité innée, impliqués dans la reconnaissance de produits bactériens, ou des protéines de la voie de l'autophagie permettant l'élimination de microorganismes. Ces mutations peuvent entraîner des modifications de fonctionnalité de la protéine ce qui pourrait



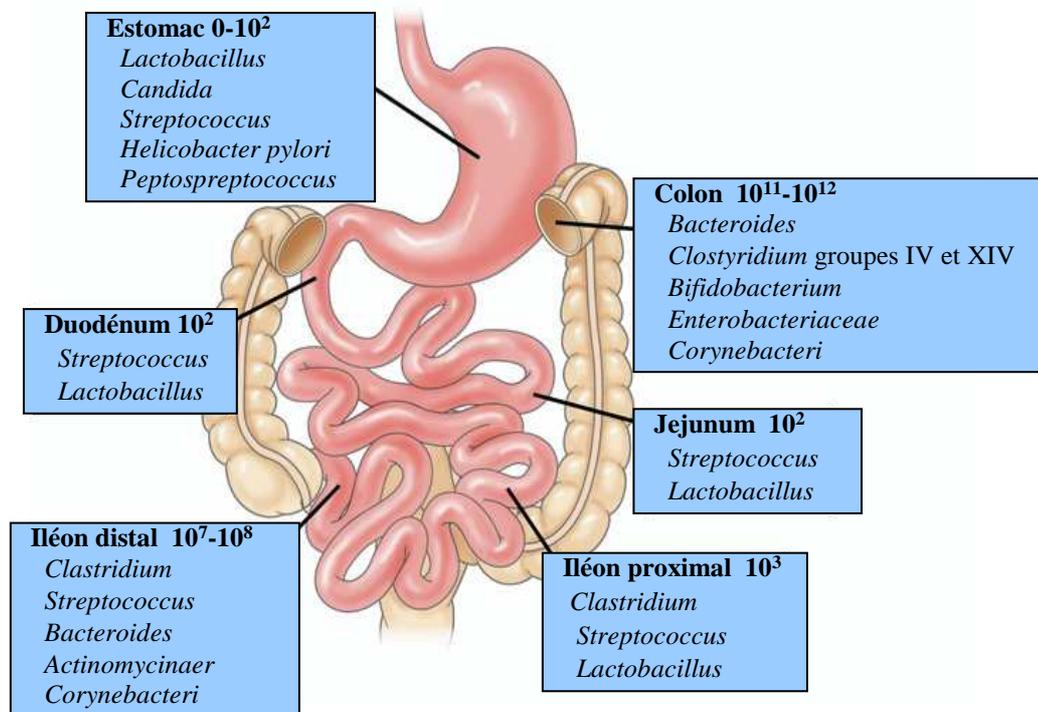
avoir pour conséquence une augmentation de la colonisation bactérienne au niveau intestinal et donc une stimulation intense et prolongée des cellules de l'immunité.

✦ **Les observations expérimentales** montrent l'importance de la flore bactérienne dans l'induction d'un état inflammatoire dans les modèles animaux mimant une inflammation intestinale (Elson *et al.*, 2005), suggérant un rôle important des bactéries dans l'étiologie des MICI.

Malgré l'importance des arguments en faveur de l'implication d'un facteur infectieux, le rôle précis de la flore intestinale dans l'étiopathologie de la MC reste encore à élucider. Il existe 3 hypothèses non exclusives : la théorie d'une translocation bactérienne excessive au niveau intestinal, la théorie d'une dysbiose intestinale favorisant l'émergence de microorganismes à effets « néfastes » et la théorie d'un agent infectieux.

#### **2.4.1. Théorie d'une translocation bactérienne excessive**

La translocation bactérienne (passage de bactéries viables de la lumière du tractus gastro-intestinal vers les nodules mésentériques et les autres organes internes, principalement le foie et la rate) est augmentée chez les patients atteints de MC. Chez les patients atteints de MC, certaines bactéries présentes dans la lumière intestinale, telles que *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium perfringens*, *Proteus spp.* et *Bacteroides fragilis* ont été retrouvées au niveau des ganglions mésentériques et sont donc capables de franchir la barrière épithéliale (Ambrose *et al.*, 1984; Takesue *et al.*, 2002). Les lésions précoces de MC sont retrouvées au niveau des follicules lymphoïdes de l'intestin, des plaques de Peyer de l'intestin grêle chez les sujets jeunes et des follicules du côlon à tout âge. Une étude récente montre une augmentation du passage de bactéries *E. coli* non pathogènes à travers la muqueuse iléale au niveau des follicules lymphoïdes et des plaques de Peyer chez les patients atteints de MC (Keita *et al.*, 2008; Salim *et al.*, 2009). De plus, des souches de *E. coli* ont été plus fréquemment isolées à partir de séreuses intestinales et de ganglions mésentériques prélevés lors d'actes chirurgicaux chez les patients atteints de MC que chez les contrôles (Laffineur *et al.*, 1992), indiquant qu'une translocation bactérienne pourrait être impliquée dans la genèse des fistules et des abcès, lésions caractéristiques de la MC.



**Figure 15 : Flore intestinale dans les différentes parties du tube digestif.**

Composition et concentrations (par gramme de contenu intestinal) dans la lumière intestinale des espèces de micro-organismes dominants dans les différentes régions du tractus intestinal chez l'homme (d'après Sartor, 2008).

#### 2.4.2. Théorie de la dysbiose

Le terme « microbiote » a été défini par Savage pour décrire l'ensemble des sociétés bactériennes qui sont associées à la surface intestinale et qui peuplent le tractus digestif d'un individu (Savage, 1977). Ce microbiote, dont font partie les souches commensales, est constitué d'une énorme biomasse comprenant des centaines d'espèces bactériennes différentes. Ce dense environnement microbien est à l'origine d'une intense activité fonctionnelle qui le rend physiologiquement très important pour l'homme. Ainsi, le microbiote intestinal peut être assimilé à un véritable organe microbien placé au sein de l'hôte et faisant partie intégrante de ce dernier (O'Hara and Shanahan, 2006). La population bactérienne est 100 fois plus importante en quantité que le nombre de cellules eucaryotes composant l'organisme. La densité de cette flore varie le long du tractus gastro-intestinal. Celle-ci est assez faible, de l'ordre de  $10^1$  à  $10^3$  bactéries par gramme de tissu, au niveau stomacal et intestinal. Une exception est tout de même faite au niveau de l'iléon, partie distale de l'intestin grêle, où une augmentation de la concentration et de la diversité bactérienne est observée. Enfin, cette flore microbienne est principalement localisée au niveau colique où la diversité et la densité de la population bactérienne sont maximales avec plus de 400 espèces bactériennes présentes de  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de tissu (Sartor, 2008) (**Figure 15**). La flore intestinale est principalement composée de bactéries mais également de protozoaires et de champignons. La majorité des bactéries sont anaérobies et appartiennent à 2 grands groupes, les Bacteroïdes dont font partie les *Cytophagia*, *Flavobacterium* et *Bacteroides*, et les Firmicutes comprenant les genres *Clostridium* et *Eubacterium* (Backhed *et al.*, 2005). Une population bactérienne aérobie, composée principalement d'entérobactéries et de lactobacilles, est également retrouvée mais à des concentrations 10 à 1000 fois moins importantes (Berg, 1996).

L'étude de la microflore intestinale des patients atteints de MC, par des techniques de culture ou par des analyses moléculaires, a permis de mettre en évidence une dysbiose généralisée ou localisée, correspondant à la diminution du nombre de bactéries habituelles, à l'augmentation du nombre de bactéries inhabituelles, qui s'accompagne quelquefois de la réduction de la biodiversité des espèces bactériennes.

La composition de la **flore fécale** diffère entre patients atteints de MICI et sujets sains (Dickinson *et al.*, 1980; Keighley *et al.*, 1978; Ruseler-van Embden and Both-Patoir, 1983; Seksik *et al.*, 2003). Les premières études utilisant des techniques de culture classique ont montré une augmentation de la concentration fécale de *B. vulgatus* et une diminution de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* chez les patients atteints de MC (Favier *et al.*, 1997). Une



augmentation significative des entérobactéries a également été observée grâce à des techniques culture-dépendantes et indépendantes chez les patients atteints d'une MC active (Keighley *et al.*, 1978). Les entérobactéries sont retrouvées chez les sujets sains mais leur concentration est bien plus importante chez les personnes atteintes de MICI, pouvant même représenter la flore intestinale dominante, ce qui n'est jamais le cas chez des sujets sains. Il a aussi été fréquemment montré qu'au moins 30% de la flore dominante chez les patients atteints de MICI appartenait à un groupe phylogénétique inhabituel (Seksik *et al.*, 2003). Par contre, ces changements de composition de flore fécale semblent être différents entre patients atteints de MC, de RCH et/ou d'infection colique, montrant que ces modifications de flore ne sont pas uniquement dues à des changements de conditions du tractus gastro-intestinal. En effet, une diminution des Firmicutes caractérise les MICI, avec notamment une diminution significative du groupe des *C. cocoides* chez les patients atteints de RCH et *C. leptum* chez les patients atteints de MC (Sokol *et al.*, 2008). D'autres études ont montré une dominance inhabituelle de certaines bactéries telles que *Pectinatus*, *Sutterella*, *Fusobacterium*, *Verrucomicrobium* et divers *Clostridium* chez les patients atteints de MC (Marteau *et al.*, 2004). Enfin, la composition de la flore fécale est instable au cours du temps chez les patients atteints de MC alors qu'elle est constante chez des sujets sains (Seksik *et al.*, 2003). Toutes ces études de composition de la flore démontrent l'existence d'une dysbiose chez les patients atteints de MC mais ne permettent pas de donner des informations sur l'activité bactérienne. En effet, la détermination des bactéries présentant une forte activité métabolique dans ces dysbioses pourrait permettre d'identifier les microorganismes impliqués dans l'initiation et/ou le maintien de l'inflammation intestinale.

**La flore associée à la muqueuse** est généralement différente de la flore fécale (Lepage *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que la population bactérienne mucoale totale est plus importante chez les patients atteints d'une MICI comparativement à des sujets sains (Kleessen *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 1997; Swidsinski *et al.*, 2002), que se soit au niveau du mucus ou à la surface de l'épithélium intestinal (Kleessen *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2002). Cette dysbiose mucoale peut être généralisée ou localisée (Lepage *et al.*, 2005; Seksik *et al.*, 2005). Enfin, la biodiversité mucoale est diminuée chez les patients atteints de MICI, avec une augmentation de la représentation de bactéries inhabituelles (Ott *et al.*, 2004). En effet, une diminution des espèces bactériennes bénéfiques telles que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* et une augmentation des bactéries pathogènes telles que *Bacteroides* et *E. coli* associées à la muqueuse intestinale ont été observées chez les patients atteints de MC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Giaffer *et al.*, 1992; Keighley *et al.*, 1978; Lederman, 1997; Manichanh *et al.*,

**Tableau 4 : Micro-organismes recherchés dans les tissus de patients atteints de MC.**  
(d'après Cartun *et al.*, 1993).

<b>Virus</b>	<b>Bactéries</b>	<b>Parasites</b>
Adénovirus	<i>Brucella</i> spp.	<i>Borrelia</i> spp.
Epstein-Barr Virus (EBV)	<i>Chlamidia</i> spp.	<i>Toxoplasma gondii</i>
Cytomégalovirus (CMV)	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Treponema</i> spp.
Virus Influenza	<i>Escherichia coli</i>	
Coronavirus	<i>Helicobacter</i> spp.	
Rotavirus	<i>Legionella</i> spp.	
Virus de la diarrhée	<i>Mycobacterium</i> spp.	
Virale bovine (BVDV)	<i>Mycoplasma</i> spp.	
	<i>Pseudomonas</i> spp.	
	<i>Salmonella</i> spp.	
	<i>Staphylococcus</i> spp.	
	<i>Straptococcus</i> spp.	
	<i>Shigella</i> spp.	
	<i>Yersinia</i> spp.	

**Tableau 5 : Micro-organismes recherchés dans les tissus de patients atteints de MC.**  
(d'après Liu *et al.*, 1995).

<b>Virus</b>	<b>Bactéries</b>
Virus influenza A	<i>Bacteroides vulgatus</i>
Virus de la diarrhée virale bovine (BVDV)	<i>Bacteroides burgdorferi</i>
Virus de la rougeole	<i>Enterococcus</i>
Virus parainfluenza types 2 et 3	<i>Escherichia coli</i>
Virus respiratoire syncytial (VRS)	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Streptococcus</i> groupe F

2006; Neut *et al.*, 2002; Seksik *et al.*, 2006; Swidsinski *et al.*, 2002; Tamboli *et al.*, 2004). En parallèle, des analyses de flore iléale de patients atteints de MC ont montré une baisse significative de la concentration de *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérie appartenant au phylum des Firmicutes, productrice de butyrate et qui aurait des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires (Sokol *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse d'une perturbation de la balance entre les bactéries potentiellement bénéfiques et les bactéries potentiellement pathogènes qui pourrait contribuer à l'initiation et/ou à la chronicité des MICI. Ces résultats ont été renforcés par la mise en évidence d'immunoglobulines dirigées contre *E. coli*, *Bacteroides spp.* et *Clostridium spp.* en quantités significativement supérieures dans la muqueuse intestinale de patients atteints de MC comparativement à la muqueuse de sujets contrôles (Macpherson *et al.*, 1996).

### **2.4.3. Théorie de l'implication d'un agent infectieux**

Les similitudes entre la MC et certaines formes d'entérocolites infectieuses suggèrent que plusieurs agents infectieux à tropisme intestinal pourraient participer à l'étiologie de la MC, comme le montrent les **tableaux 4 et 5** regroupant l'ensemble des agents infectieux recherchés par immuno-cytochimie sur pièces opératoires (Cartun *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995). Les différentes recherches se sont particulièrement orientées vers l'étude de l'implication ou de la participation de virus, de levures, et d'espèces bactériennes non commensales du tube digestif dans l'étiologie de la MC (Chiba *et al.*, 1998 ; Guslandi *et al.*, 2002; Kallinowski *et al.*, 1998).



## II Microorganismes et MC

### II.1. Les différents agents de la piste infectieuse

Depuis la première description de la MC, il a toujours été suggéré que des agents infectieux pouvaient être impliqués dans la pathologie et son évolution. De nombreuses études se sont notamment focalisées sur les potentiels rôles d'agents viraux, de levures pathogènes ou de bactéries telles que *Helicobacter*, *Yersinia*, *Listeria*, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis et *Escherichia coli* (pour revue (Pineton de Chambrun *et al.*, 2008)).

#### 1.1. Implication d'un agent viral

Pendant des décennies, l'apparition de MC et d'inflammations aiguës ont été associées avec des infections virales, notamment à cause de l'âge des personnes malades (15-25 ans), personnes les plus souvent exposées aux infections virales, mais également suite aux nombreuses études épidémiologiques associant la consommation d'eau de source avec la MC, suggérant l'implication d'un virus aquatique. La principale hypothèse est le développement d'une vasculite au niveau de la muqueuse intestinale consécutive à une infection virale persistante de l'endothélium mésentérique. Pour valider cette théorie, la présence d'agents viraux dans les tissus des patients atteints de MC a été recherchée par différentes techniques, mais les résultats n'ont pas permis de démontrer le rôle exact des virus dans la MC.

L'implication d'un **herpèsvirus** tel que l'Epstein Barr virus (EBV) ou le cytomégalovirus (CMV) dans la pathogénèse de la MICI est suspectée (Wakefield *et al.*, 1992). L'EBV et le CMV, envahissant les cellules immunitaires telles que les lymphocytes, peuvent entraîner une réponse immunitaire et la sécrétion de nombreuses cytokines.

Récemment, des recherches moléculaires par PCR ou RT-PCR ont été réalisées pour tout ADN ou ARN viral dans les tissus des patients atteints de MC (Van Kruiningen *et al.*, 2007). Seul le virus **d'EBV** a été détecté chez 15% des patients et aucun entérovirus n'a été détecté dans les tissus intestinaux, ces résultats sont en accord avec des données antérieures démontrant la présence d'ADN d'EBV dans les tissus de patients avec MICI (Bai *et al.*, 2006; Yanai *et al.*, 1999). Cependant, selon les connaissances scientifiques actuelles, aucune conclusion sur un rôle d'une infection par EBV dans une MICI ne peut être élaborée.

L'association entre le **CMV** et les MICI reste peu claire. Des études sur l'infection par le CMV dans les MICI ont proposé cette association sans spécifier si le CMV est bien le facteur



causal aggravant l'inflammation intestinale. La théorie la plus probable serait que le CMV infecte les zones actives des MICI et cause des dommages coliques. Plutôt qu'un agent pathogène impliqué dans les MICI, le CMV participerait à l'aggravation d'une colite préexistante.

L'implication du **virus de la rougeole** dans l'étiologie et/ou la pathogenèse de la MC a été suggérée (Daszak *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1995; Wakefield *et al.*, 1993). Ces observations ont conduit à établir l'hypothèse qu'une exposition précoce au virus de la rougeole, soit au cours de la grossesse (Ekbohm *et al.*, 1996), soit à la suite d'une infection post-natale (Wakefield and Montgomery, 2000) ou suite à une vaccination, prédisposerait à la MC. Cependant, ces résultats sont controversés. En effet, la détection de virus de la rougeole chez les patients atteints de MC par des techniques de PCR et de RT-PCR s'est révélée être négative (Afzal *et al.*, 1998; Iizuka *et al.*, 1995). Le seul point qui reste encore possible est une co-infection virale, associée à la rougeole, lors du jeune âge, pouvant provoquer une inflammation intestinale inappropriée chez un patient génétiquement susceptible (Wakefield *et al.*, 1999).

La théorie de l'implication des **bactériophages** pourrait expliquer la dysbiose chez les patients atteints de MICI. Les bactériophages peuvent être présents en nombre jusqu'à 10 fois supérieur à celui des bactéries dans certains écosystèmes et peuvent alors exercer une forte influence sur la diversité et la composition de la population bactérienne, et sont probablement impliqués dans une dysbiose en déstabilisant les communautés bactériennes (Riley, 2004). Ils peuvent être impliqués indirectement en favorisant le transfert de gène et une réorganisation du génome au sein de la population bactérienne, ou directement en tant qu'agent immunomodulateur (Gorski *et al.*, 2006) ou encore par compétition stérique pour une structure de surface bactérienne. Cependant, le rôle des bactériophages dans la microflore intestinale est souvent négligé. Une étude récente a déterminé la communauté phagique totale associée à la muqueuse intestinale et a comparé l'abondance de bactériophages entre des sujets sains et patients atteints de MC, que ce soit au niveau des zones lésées ou saines (Lepage *et al.*, 2008). Les résultats montrent que chaque individu présente une colonisation différente par une famille phagique dominante. Cependant, au niveau mucosal, les patients atteints de MC présentent significativement plus de VLP (Virus-Like Particles) que les sujets contrôles. De plus, une diminution des VLP est observée au niveau des muqueuses ulcérées. Deux hypothèses peuvent être proposées : (i) soit il y a plus de phages produits, (ii) soit ils survivent plus longtemps au niveau des zones non ulcérées. Bien que la variation de la



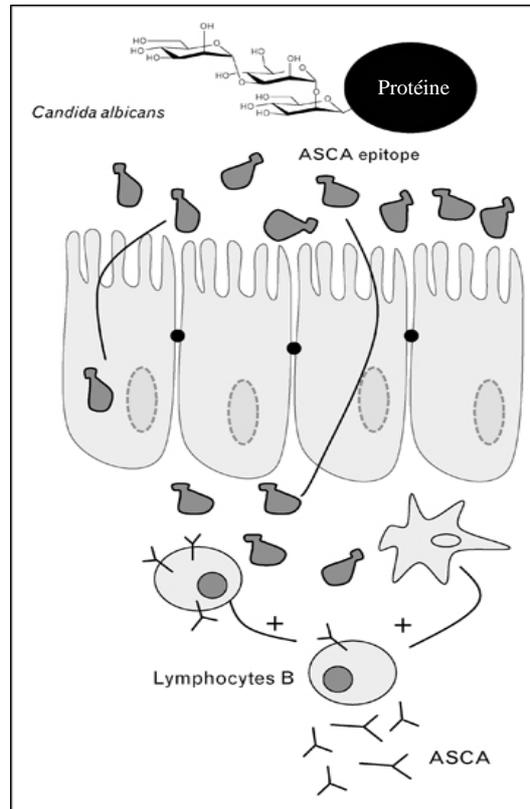
composition de la flore et de l'abondance bactérienne entre zones lésées et non lésées ne soit pas encore totalement admise, le cycle du bactériophage (lytique ou lysogénique) pourrait être responsable de certaines de ces différences. Cette étude montre donc pour la première fois une communauté bactériophagique dense spécifiquement associée à la muqueuse intestinale de patients atteints de MC. Ainsi, les bactériophages pourraient jouer un rôle dans la dérégulation de la réponse immunitaire à la flore bactérienne associée à la muqueuse observée chez les patients atteints de MC.

## **1.2. Implication de *Candida albicans***

Le phosphopeptidomannane (PPM) de paroi de levure a été identifié comme antigène entraînant la production d'anticorps ASCA (Joossens *et al.*, 2002). La présence de ces anticorps dirigés contre des antigènes de levures non pathogènes *Saccharomyces cerevisiae* permet distinguer une RCH d'une MC (Main *et al.*, 1988). De plus, il a été montré que 20% des patients présentent des ASCA au niveau sanguin avant les premières manifestations de la MC. La mise en évidence d'une réponse humorale dirigée contre une levure a ouvert de nouvelles perspectives d'études pour comprendre la pathogénèse des MICI. Un antigène environnemental portant des mannanes à sa surface pourrait être à l'origine d'une réponse inflammatoire incontrôlée de la muqueuse intestinale et/ou le système immunitaire intestinal.

Plusieurs études ont montré une association directe significative entre la présence d'ASCA et de mutations du gène *NOD2* chez les patients atteints de MC, suggérant ainsi que l'inflammation observée chez ces patients pourrait être le résultat d'un défaut de la réponse immunitaire innée contre les antigènes d'une levure pathogène. D'ailleurs, il a été identifié un sous-groupe de patients de MC caractérisé par des ASCA positifs et une mutation dans le gène *MBL* (Mannan binding lectin) (Seibold *et al.*, 2004). *MBL* est un récepteur du système immunitaire inné qui joue un rôle important dans la défense contre les antigènes contenant du mannose, incluant les résidus mannoses répétés présents sur les levures. Les variations de la protéine *MBL* entraîneraient une accumulation persistante d'antigènes dans la muqueuse intestinale, stimulant ainsi une réponse immunitaire spécifique. Cependant, une étude vient contredire cette hypothèse en montrant que la prévalence des ASCA est identique dans les populations Européenne et Tunisienne alors qu'il y a un plus faible taux de mutation *NOD2* en Tunisie (Hadrach *et al.*, 2007).

Bien qu'il y ait de nombreuses études montrant que les ASCA sont un bon marqueur de la MC, le facteur immunogène induisant leur production est encore inconnu. Récemment, il a été proposé que *Candida albicans* pouvait agir comme pathogène intestinal, entraînant la



**Figure 16 : *Candida albicans* et l'induction de la production d'anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA).**

*C. Albican* est un pathogène opportuniste contrôlé par la balance entre une réponse pro- et anti-inflammatoires. Chez les patients atteints de MC, l'augmentation de la prévalence des ASCA est en corrélation avec une augmentation de la colonisation par *C. albicans* (d'après Pineton de Chambrun *et al.*, 2008).

formation d'ASCA (**Figure 16**) (Standaert-Vitse *et al.*, 2006). Bien qu'étant un pathogène fongique, *C. albicans* peut être porté sans symptômes par une grande partie de la population en colonisant la surface muqueuse du tube digestif. *C. albicans* exprime l'épitope majeur d'ASCA sur de nombreuses molécules de surface et notamment lors de la phase pathogénique. Plus récemment, il a été montré que *C. albicans* est capable d'aggraver une colite induite au DSS dans un modèle murin Balb/cJ, en induisant notamment une augmentation de la production de cytokines TNF- $\alpha$  (Jawhara and Poulain, 2007).

### **1.3. Implication d'une bactérie pathogène**

Parmi les agents infectieux bactériens, les genres *Mycobacterium* et *Escherichia coli* sont fortement étudiés suite aux nombreuses études montrant une forte corrélation entre la présence de ces bactéries et le développement d'une MC. Plus récemment, l'implication de souches de *Helicobacter* a aussi été étudiée suite notamment aux observations faites en modèle inflammatoire murin. Enfin, l'hypothèse de la chaîne du froid permettrait de mettre en corrélation l'émergence de la MC avec un facteur environnemental qui serait l'équipement des foyers occidentaux modernes par des réfrigérateurs, où des bactéries psychrotrophes telles que *Yersinia spp.* ou *Listeria spp.* pourraient se développer et présenteraient des propriétés de stimulation de la réponse immunitaire d'un hôte génétiquement prédisposé.

#### **1.3.1 Helicobacter**

Depuis la découverte de l'association entre *Helicobacter pylori* et le système muqueux gastrique humain, entraînant la formation d'ulcères, une implication des bactéries du genre *Helicobacter* dans la MC a également été suspectée. Depuis, 59 espèces de *Helicobacter* ont été identifiées chez l'animal et l'Homme. Plusieurs espèces ont été isolées au niveau intestinal humain. *Helicobacter* serait ainsi capable de coloniser le tractus digestif de l'Homme et d'induire des pathologies. Cependant, aucun rôle spécifique de ces pathogènes intestinaux dans les MICI n'a pu encore être démontré.

Les études réalisées au cours de ces dix dernières années en modèle murin ont montré une implication directe de *Helicobacter* dans une inflammation intestinale. *Helicobacter hepaticus* est un pathogène murin proche du pathogène humain *H. pylori*. Il est impliqué dans des hépatites chez la souris et certaines souches seraient associées au développement de cancers hépatiques. Dans certains modèles murins présentant des altérations génétiques, il a été identifié comme pathogène intestinal capable d'induire une inflammation sévère,



accompagnée d'une réponse immunitaire semblable à ce qui peut être observé chez des patients atteints de MC (Cahill *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 2000; Foltz *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 1996; Franklin *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2002; Shomer *et al.*, 1997). Par ailleurs, plusieurs études montrent que la présence d'une flore endogène est très importante pour qu'une inflammation intestinale se développe après une infection par *H. hepaticus* (Burich *et al.*, 2001; Dieleman *et al.*, 2000; Kullberg *et al.*, 1998). Récemment, *Helicobacter bilis* s'est aussi avéré capable d'induire une colite chez des souris immunodéficientes C3h/HeN en conditions gnotobiotiques (Jergens *et al.*, 2007). La colonisation de ces souris par *H. bilis* entraîne une perturbation de la réponse immunitaire de l'hôte à sa flore commensale, induit progressivement une réponse immunitaire aux bactéries commensales, ce qui contribue au développement d'une inflammation intestinale, avec l'apparition d'une iléocolite. A l'heure actuelle, toutes ces études expérimentales sur modèle murin sont très prometteuses quant à une implication possible de *Helicobacter* dans la pathogenèse des inflammations intestinales chez l'Homme. Une étude clinique récente réalisée chez des enfants montre une corrélation entre la détection par PCR la de présence d'*Helicobacter* dans les fèces et une atteinte par la MC. Ceci suggère un rôle de ce genre bactérien dans le développement de MC chez des enfants (Man *et al.*, 2008).

### **1.3.2. Les bactéries psychrotrophes : *Yersinia* et *Listeria***

Les données épidémiologiques de la MC montrent une forte corrélation entre l'émergence de la maladie en occident et la modernisation des foyers, indiquant ainsi qu'il existerait des facteurs de risques environnementaux familiaux, liés au style de vie, au régime alimentaire, ou à l'hygiène domestique. Or, un facteur commun à tous ceux-ci est la réfrigération, qui pourrait représenter ainsi un potentiel facteur de risque pour la MC. En comparant l'évolution de l'équipement domestique en réfrigérateur dans la société occidentale avec celle de la MC, des coïncidences temporelles et géographiques peuvent être observées au cours du 20<sup>ème</sup> siècle. Ainsi, cette hypothèse de la chaîne du froid pourrait suggérer l'implication de facteurs infectieux qui seraient les bactéries psychrotrophes telles que *Yersinia* ou *Listeria* (Hugot *et al.*, 2003a). Ces bactéries sont fréquemment retrouvées dans une grande variété d'aliments, y compris la viande et les légumes, et ont été isolées au niveau de lésions chez des patients atteints de MC.

*Yersinia* sont des bacilles ubiquitaires à Gram négatif. Ils peuvent être pathogènes chez des animaux sauvages et domestiques tels que les oiseaux. C'est un pathogène entérique qui



cause une grande variété de symptômes cliniques chez l'Homme. Il y a de nombreux aspects de la Yersiniose communs avec la MC, notamment la présence de granulomes (Abe *et al.*, 1997). *Yersinia enterocolitica* peut pénétrer *via* les plaques de Peyer, causant ainsi des micro-abcès et des ulcérations le long de l'épithélium iléal (Grutzkau *et al.*, 1990). Cette bactérie a un fort tropisme pour les tissus lymphatiques et est notamment retrouvée au niveau des nodules mésentériques, suggérant qu'une stimulation des lymphocytes T joue un rôle central dans la pathogenèse des infections à *Yersinia*. L'infection de cellules épithéliales intestinales par *Yersinia spp.* entraîne une activation de la voie NF- $\kappa$ B et la sécrétion de cytokines proinflammatoires (Grassl *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré la présence de *Y. enterocolitica* et de *Y. pseudotuberculosis* au niveau intestinal de patients atteints de MC (Kallinowski *et al.*, 1998; Lamps *et al.*, 2003). Il a été rapporté par deux groupes indépendants, un en Grande-Bretagne et un autre en Italie, deux cas d'iléites terminales impliquant *Yersinia paratuberculosis*, chez qui une MC a été par la suite diagnostiquée (Homewood *et al.*, 2003; Zippi *et al.*, 2006). Ces résultats indiquent une implication possible de *Yersinia* chez certains patients atteints de MC, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer si cette observation est un épiphénomène ou si une infection à *Yersinia* est bien un facteur déclenchant de la MC.

La bactérie psychrotrophe *Listeria* fait l'objet de nombreuses recherches concernant son implication dans la pathogenèse de la MC (Chen *et al.*, 2000; Huijsdens *et al.*, 2003). Ainsi, *Listeria monocytogenes* pourrait représenter un bon candidat impliqué dans l'étiologie de la MC. *L. monocytogenes* a été identifié au niveau de lésions de patients atteints de MC par analyses immunohistochimiques (Chen *et al.*, 2000; Chiba *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1995; Walmsley *et al.*, 1998). Un autre point en faveur de cette hypothèse est que des souris déficientes pour NOD2, gène de susceptibilité associé à la MC, ont montré une susceptibilité accrue à une infection orale à *Listeria monocytogenes*, mais sont résistantes à une infection systémique (Kobayashi *et al.*, 2005). Cette observation est associée à une diminution des taux d'ARNm de cryptidines spécifiques, homologues aux  $\alpha$ -défensines humaines, au niveau des cellules de Paneth. Cependant, des études supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une implication de *Listeria* dans la MC.

### **1.3.3. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis***

L'hypothèse d'une mycobactérie à l'origine de la MC a été suspectée dès la description anatomopathologique de lésions granulomateuses (Dalziel, 1989). *Mycobacterium avium*

**Tableau 6 : Arguments pour ou contre l'implication de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) dans la MC (D'après Pineto 2007 et Sartor 2005).**

---

**Pour**

- ⊕ Similitudes cliniques et pathologiques avec la maladie de Johnes
- ⊕ Présence dans la chaîne alimentaire (lait, viande) et dans l'eau
- ⊕ Plus forte détection par culture, PCR et FISH de MAP dans des tissus isolés de patients atteints de MC
- ⊕ Culture de sang positive pour MAP chez les patients atteints de MC
- ⊕ Réponse sérologique augmentée chez les patients atteints de MC
- ⊕ Détection de MAP dans le lait humain par culture et PCR
- ⊕ Progression d'une lymphadénopathie en iléite distal chez les patients atteints d'infection à MAP
- ⊕ Réponse thérapeutique à une thérapie combinant des antibiotiques et des anti-tuberculeux
- ⊕ Identification de LT activés par des épitopes de MAP chez patients atteints de MC

**Contre**

- ⊖ Différences cliniques et pathologiques avec la maladie de Johnes
  - ⊖ Manque de données épidémiologiques concernant une infection qui serait alors transmissible
  - ⊖ Pas de transmission d'animaux contaminés avec MAP à des humains
  - ⊖ Pas de similitudes entre le génotype des MAP lié à la MC et isolé de bovin
  - ⊖ Variabilité des résultats pour l'identification de MAP par PCR et les tests sérologiques chez les patients
  - ⊖ Pas d'aggravation de la MC chez des patients immunodéprimés
  - ⊖ Pas de réponse thérapeutique à l'utilisation d'antibiotique anti-mycobactériens classiques
  - ⊖ Pas de données histologiques
-

*subspecies paratuberculosis* (MAP) est l'agent causal de la maladie de Johne, une iléite granulomateuse chronique des ruminants qui partage des similitudes avec la MC (Chiodini, 1989; Greenstein, 2003). Depuis une quinzaine d'années, beaucoup de données bibliographiques discutent l'implication de MAP dans la MC, ces études sont reportées dans le **tableau 6** (D'après (Sartor, 2005)).

MAP est capable de survivre en macrophages en créant une niche de réplication qui met cette bactérie à l'abri des agents bactéricides du phagocyte. Cette propriété de résistance en macrophages fait de ce pathogène un candidat potentiel qui pourrait être impliqué dans la formation de granulomes, caractéristique histologique de certaines formes de MC. D'ailleurs, de l'ADN de MAP a été détecté par PCR dans des tissus de certains patients atteints de MC, notamment dans les granulomes. Cependant, l'ADN d'autres types de bactéries a également été retrouvé au niveau de ces granulomes dont notamment de *E. coli* (Ryan *et al.*, 2004a). De plus, la présence d'ADN bactérien dans les granulomes n'indique pas forcément une relation de cause à effet. Cela pourrait influencer la progression de la maladie étant donné que l'ADN bactérien peut avoir un effet d'immunomodulation. De plus, une étude très récente montre que des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec un phénotype Th1 ou Th1/Th17, isolés de biopsies intestinales de patients atteints de MC, sont activés par des épitopes de MAP. Ces résultats suggèrent une implication de MAP dans l'inflammation associée à la MC (Olsen *et al.*, 2009).

Les résultats sont contradictoires en ce qui concerne l'isolement de cette bactérie chez les patients atteints de MC. Certaines études ayant pour but d'isoler des MAP ou d'amplifier des séquences d'ADN spécifiques de MAP indiquent la présence de MAP dans des biopsies intestinales de patients atteints de MC (Autschbach *et al.*, 2005; Naser *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2002; Sechi *et al.*, 2005) alors que d'autres études, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de cette bactérie (Ellingson *et al.*, 2003; Freeman and Noble, 2005; Shanahan and O'Mahony, 2005). Récemment, une méta-analyse prenant en compte les tests PCR ou ELISA afin de compiler tous les résultats d'études recherchant la présence de MAP chez les patients atteints de MC démontre une association entre la détection de MAP et la MC (Feller *et al.*, 2007).

Plusieurs études cliniques ont rapporté que l'administration d'une combinaison de trois ou quatre antibiotiques présentant de fortes activités contre MAP permet d'obtenir des rémissions chez environ deux tiers à trois quarts des patients avec des formes actives de MC (Borody *et al.*, 2002; Douglass *et al.*, 2000; Gui *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2002). Toutefois, il est à noter que ces antibiotiques visant à éliminer MAP sont également actifs sur de très nombreuses espèces bactériennes. Une récente étude clinique a porté sur l'efficacité d'antibiotiques anti-

**Tableau 7 : Arguments en faveur d'une implication de *E. coli* dans la MC.**

Lieu d'étude	Détection	Référence
Grande-Bretagne	Ac anti-AgO (O1 à O163)	(Tabaqchali <i>et al.</i> , 1978)
Etats-unis	Ag <i>E. coli</i>	(Cartun <i>et al.</i> , 1993)
France	Ag <i>E. coli</i>	(Liu <i>et al.</i> , 1995)
Grande-Bretagne	IgG mucosales anti- <i>E. coli</i>	(Macpherson <i>et al.</i> , 1996)
Grande-Bretagne	Ag <i>E. coli</i>	(Walmsley <i>et al.</i> , 1998)
France	Colonisation muqueuse iléale par <i>E. coli</i>	(Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> , 1998)
France	Mise en évidence <i>E. coli</i> adhérents et invasifs (AIEC)	(Boudeau <i>et al.</i> , 1999)
Japon	Ag et ADN <i>E. coli</i> sur coupes tissus	(Fujita <i>et al.</i> , 2002)
Allemagne	Détection Ag et ADN sur coupes tissus Mise en évidence <i>E. coli</i> invasives	(Swidsinski <i>et al.</i> , 2002)
Etats-Unis	Ac anti-OmpC	(Landers <i>et al.</i> , 2002)
Grande-Bretagne	Mise en évidence <i>E. coli</i> adhérents et invasifs	(Martin <i>et al.</i> , 2004)
France	Prévalence <i>E. coli</i> adhérents et invasifs (AIEC)	(Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> , 2004)
Irlande	PCR pour détection <i>E. coli</i> dans granulomes	(Ryan <i>et al.</i> , 2004a)
Grande-Bretagne	Détection ADN in situ sur coupes tissus	(Mylonaki <i>et al.</i> , 2005)

mycobactériens tels que la clarithromycine, rifabutine et clofazimine, dans le traitement de patients présentant une MC active (Selby *et al.*, 2007). Après 2 ans de traitement, aucune différence entre le groupe thérapeutique et le groupe placebo n'a pu être observée concernant les récurrences de la MC, indiquant que MAP ne jouerait pas un rôle primordial dans la MC. Cependant, cette étude montre aussi qu'au bout de 6 mois, 66% des patients ayant reçu le traitement étaient en complète rémission, ce qui est le meilleur résultat obtenu à ce jour quelque soit la thérapie utilisée, Infliximab compris.

La présence d'anticorps dirigés contre MAP a été mise en évidence chez 90% des patients atteints de MC pour lesquels la recherche d'ASCA était négative (Naser *et al.*, 2000), ce qui suggérerait l'existence de différentes formes de MC : une forme iléale avec mutation du gène *NOD2/CARD15* et présence d'ASCA, et au moins une autre forme pouvant être liée à la présence de MAP. En effet, une étude canadienne ne montre aucune corrélation entre les mutations *NOD2* et une sérologie positive pour MAP (Bernstein *et al.*, 2007).

#### **1.3.4. *Escherichia coli***

L'implication de *E. coli* dans la MC est envisagée depuis longtemps (**Tableau 7**). En effet, des études sérologiques ont montré dès 1978 des taux d'anticorps sériques dirigés contre les antigènes O de *E. coli* plus élevés chez les patients atteints de MC que chez les sujets contrôles (Macpherson *et al.*, 1996; Tabaqchali *et al.*, 1978). Plus récemment, il a été montré que les taux d'anticorps sériques dirigés contre la protéine de membrane externe OmpC de *E. coli* étaient très élevés chez environ 50% des patients atteints de MC (Landers *et al.*, 2002; Mei *et al.*, 2006; Mow *et al.*, 2004a; Mow *et al.*, 2004b). Par ailleurs, de nombreuses études sur des biopsies intestinales de patients atteints de MC ont mis en évidence la présence d'antigènes spécifiques de *E. coli*, notamment au niveau des macrophages et des cellules géantes à la base des ulcères, le long des fissures, dans les granulomes et la *lamina propria* (Cartun *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1995; Swidsinski *et al.*, 2002; Walmsley *et al.*, 1998).

Récemment, des études ont montré que *E. coli* est significativement plus abondant chez les patients atteints de MICI que chez des sujets contrôles (Kotlowski *et al.*, 2007). De plus, des souches de *E. coli* ont été isolées plus fréquemment à partir de séreuses intestinales et de ganglions mésentériques prélevés lors d'actes chirurgicaux chez les patients atteints de MC que chez les contrôles (Ambrose *et al.*, 1984; Laffineur *et al.*, 1992). *E. coli* colonise anormalement les lésions iléales aiguës et chroniques des patients atteints de MC



(représentant jusqu'à 100% de la flore totale aéro-anaérobie) comparativement aux témoins (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Lederman, 1997). Actuellement, plusieurs études indépendantes ont rapporté une augmentation du nombre de *E. coli* associés à la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MC (Conte *et al.*, 2006; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Kotlowski *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2004; Neut *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2002).

## **II.2. Caractéristiques des souches de *E. coli* associées à la MC**

### **2.1. Propriétés d'adhésion des souches de *E. coli* associées à la MC**

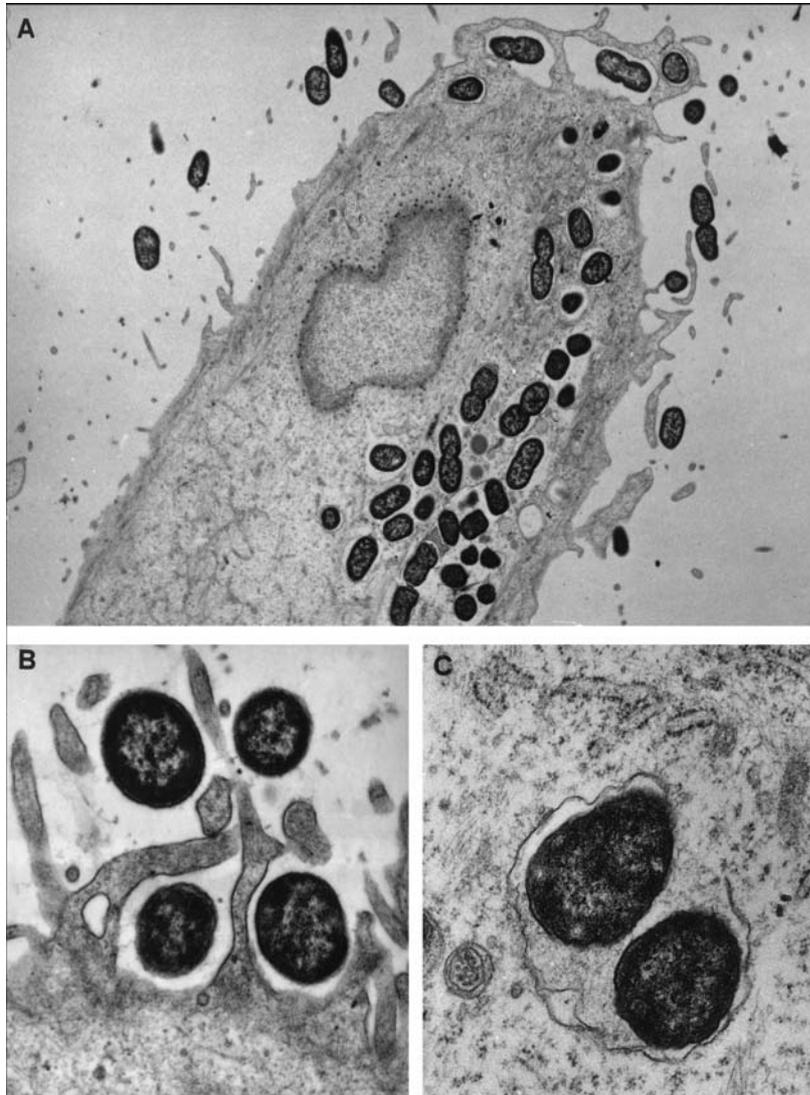
Plusieurs études ont montré que les souches de *E. coli* retrouvées au niveau de la muqueuse intestinale ou dans des selles de patients atteints de MC étaient capables d'adhérer *in vitro* aux cellules eucaryotes. En effet, des souches de *E. coli* présentant des propriétés d'adhésion aux cellules buccales ont été isolées des selles de 62% et 53% de patients atteints de MC, contre respectivement 6% et 5% de sujets contrôles (Burke and Axon, 1988; Giaffer *et al.*, 1992). De plus, des souches de *E. coli* possédant des gènes codant des adhésines responsables de l'adhésion diffuse chez *E. coli* ont été retrouvées au niveau de 39,3% des biopsies rectales de patients avec MC, comparativement à 22,2% des biopsies provenant de sujets contrôles (Schultsz *et al.*, 1997).

Il existe une relation entre le pouvoir d'adhésion et le taux de colonisation de la muqueuse intestinale par ces souches de *E. coli*. En effet, le pourcentage de souches adhérentes est d'autant plus élevé que le taux de colonisation est important. Ce résultat est illustré par le fait que 84,6% des patients atteints de MC et 78,9% des patients présentant une récurrence de MC hébergent des souches de *E. coli* adhérant aux cellules Caco-2, contre seulement 33,3% des contrôles (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998).

Les propriétés d'adhésion et d'invasion des souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de la MC sont en corrélation directe avec leur capacité à former un biofilm sur une surface abiotique (Martinez-Medina *et al.*, 2009b). La différence entre l'adhésion à des cellules et la capacité à former un biofilm donne lieu à de nombreuses discussions au sein de la communauté scientifique.

### **2.2. Propriétés d'invasion des souches de *E. coli* associées à la MC**

Plusieurs études indépendantes ont rapporté chez les patients atteints de MC la présence de *E. coli* internalisé dans la muqueuse ou la propriété des *E. coli* associés à la muqueuse



**Figure 17 : Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules épithéliales HEp-2 infectées par la souche de *E. coli* LF82.**

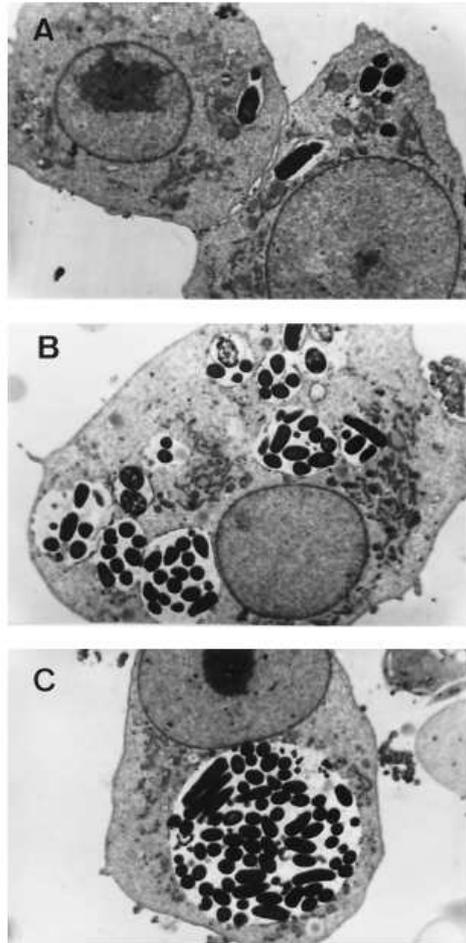
**A.** Adhésion et invasion des bactéries LF82 à la cellule hôte ( $\times 6\ 200$ ). **B.** Formation d'extensions membranaires par la cellule hôte infectée qui englobent les bactéries adhérentes en vue de leur internalisation ( $\times 21\ 600$ ). **C.** Lyse de la vacuole d'endocytose contenant les bactéries LF82 ( $\times 28\ 800$ ) (d'après Boudeau *et al.*, 1999).

d'envahir les cellules épithéliales intestinales (Alpern J., 2006; Conte *et al.*, 2006; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Kotlowski *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004).

La souche de *E. coli* LF82 isolée au niveau d'une lésion iléale chronique chez un patient atteint de MC a plus particulièrement été étudiée au laboratoire de Pathogénie Bactérienne Intestinale. Cette souche est capable d'envahir *in vitro* les cellules épithéliales intestinales des lignées Intestine-407, Caco-2 et HCT-8, ainsi que les cellules épithéliales de larynx HEp-2 et ceci avec un niveau d'internalisation comparable à celui des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), pathovar de référence des bactéries *E. coli* pour le phénotype invasif (Boudeau *et al.*, 1999).

L'interaction entre la souche LF82 et les cellules épithéliales est caractérisée par l'émission d'élongations membranaires à la surface des cellules cibles qui englobent les bactéries adhérentes. Ces élongations, localisées au site de contact intime avec les bactéries, semblent être sous-tendues par une accumulation d'éléments du cytosquelette cellulaire, comme en témoignent les zones cytoplasmiques denses observées au niveau des sites d'interaction (**Figure 17**). Ce phénomène d'internalisation de cette souche dans les cellules HEp-2 nécessite une polymérisation active d'actine, ainsi qu'un recrutement des microtubules, comme ont pu le montrer les inhibitions d'invasion en présence de cytochalasine D et de colchicine, inhibiteurs spécifiques de ces deux mécanismes. De telles modifications morphologiques ont également été observées lors des phénomènes de macropinocytose induits par *Shigella spp.* ou *Salmonella spp.* (Adam *et al.*, 1995; Finlay and Falkow, 1988; Francis *et al.*, 1993). Cependant, aucun des déterminants génétiques d'invasion connus chez *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* ou chez les *E. coli* pathogènes n'a été retrouvé chez la souche LF82, ce qui indique que son processus d'invasion repose sur des déterminants génétiques d'invasion originaux (Boudeau *et al.*, 1999).

Comme d'autres souches invasives du type EIEC, *Shigella spp.* ou *Salmonella spp.*, la souche LF82 est capable de survivre, ainsi que de se multiplier dans les cellules intestinales. L'analyse en microscopie électronique à transmission a montré que la souche LF82 avait la capacité, comme *Shigella spp.*, de lyser la membrane de la vacuole d'endocytose (**Figure 17**) et de se retrouver libre dans le cytoplasme, environnement favorable à une multiplication bactérienne (Boudeau *et al.*, 1999).



**Figure 18 : Clichés de microscopie électronique à transmission de macrophages J774-A1 infectés par la souche de *E. coli* LF82.**

**A.** Après 1 h d'infection, les bactéries LF82 sont internalisées dans un phagosome. **B.** Les bactéries LF82 sont capables de se multiplier et à 8 h post-infection, des vacuoles contenant plusieurs bactéries sont observées. **C.** A 24 h post-infection, les bactéries LF82 se retrouvent dans une large et unique vacuole ( $\times 7\ 200$ ) (d'après Glasser *et al.*, 2001).

### 2.3. Survie et multiplication des souches de *E. coli* associées à la MC

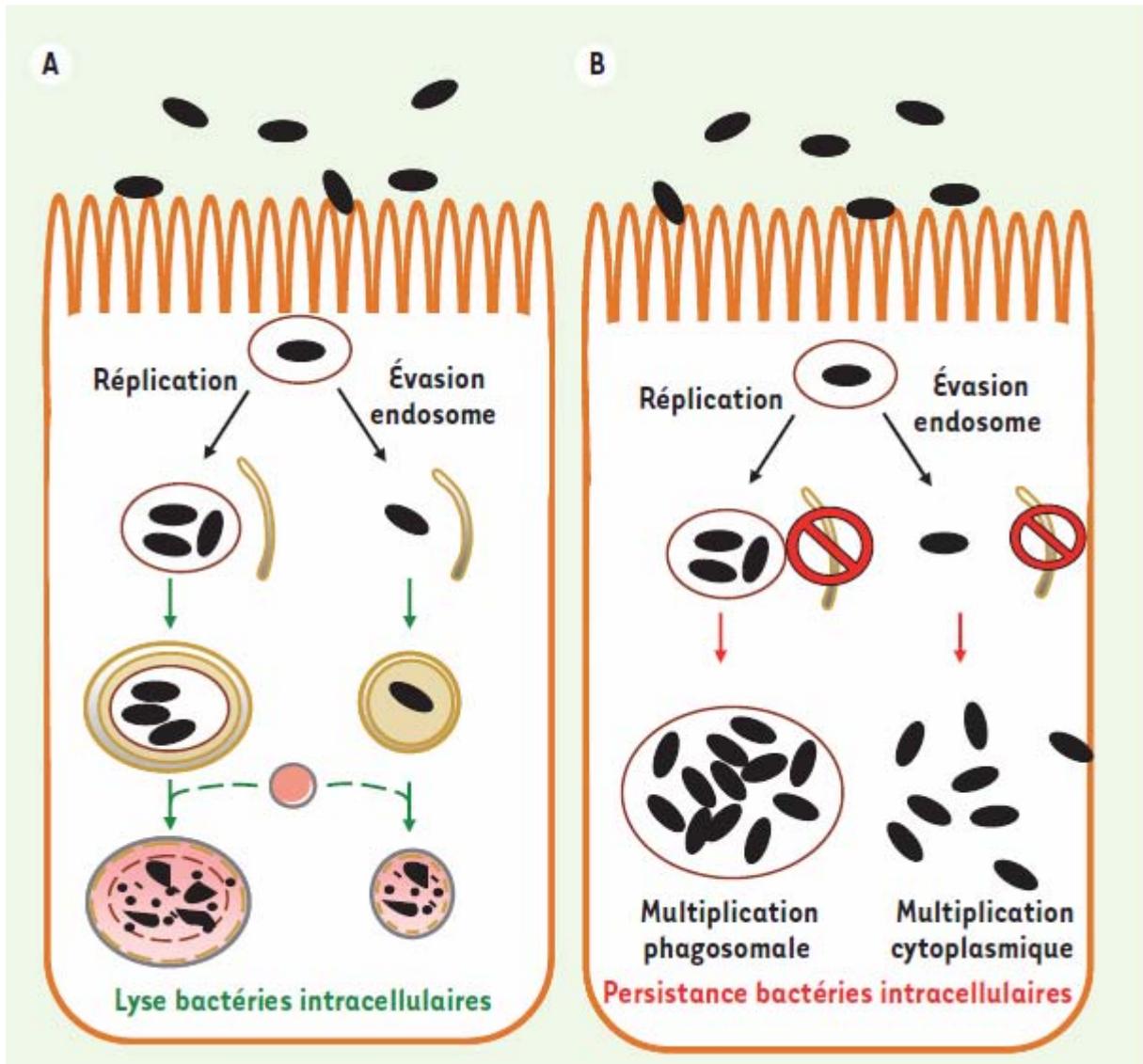
Le comportement des souches de *E. coli* associées à la MC, ainsi que le devenir de la cellule hôte, ont été étudiés dans **i.** différentes cellules macrophagiques murines et humaines (Glasser *et al.*, 2001) et en **ii.** cellules épithéliales déficientes ou non pour l'autophagie (Lapaquette *et al.*).

#### 2.3.1. Survie et multiplication en cellules macrophagiques

Les résultats obtenus montrent que 100% des souches de *E. coli* isolées de patients atteints de MC sont capables, après phagocytose par les macrophages murins J774-A1, de survivre et de se multiplier fortement jusqu'à 48 h post-infection, avec un nombre de bactéries intracellulaires à 48 h post-infection pouvant atteindre 72 fois le nombre de bactéries internalisées à 1 h. De plus, la souche LF82 est capable de résister à l'activité bactéricide des cellules macrophagiques J774-A1 pendant au moins 5 jours (Glasser *et al.*, 2001). Cependant, une étude faite sur des monocytes isolés de patients atteints de la MC avec un polymorphisme NOD2 montre une association de ce polymorphisme avec une diminution de la réponse inflammatoire précoce, sécrétion de cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-10, lors de l'infection avec la souche AIEC LF82. Ce résultat suggère une réponse inflammatoire altérée aux bactéries chez les patients atteints de la MC (Peeters *et al.*, 2007).

Les clichés obtenus en microscopie électronique à transmission montrent que les bactéries LF82 induisent la formation d'une large vacuole à 24 h post-infection, par fusion de vacuoles précoces tout en préservant l'intégrité de la cellule hôte (**Figure 18**). Aucune bactérie libre dans le cytoplasme n'a été observée. La détermination du taux de lactate déshydrogénase (enzyme cytoplasmique), un marquage par de l'annexine ainsi que l'analyse de la fragmentation de l'ADN montrent que, contrairement à *Shigella spp.* ou *Salmonella spp.*, la souche LF82 n'induit aucune mort cellulaire des macrophages infectés, par apoptose ou par nécrose. Les macrophages infectés par la souche LF82 sécrètent des taux élevés de TNF- $\alpha$  (Glasser *et al.*, 2001).

L'analyse du trafic intracellulaire des phagosomes contenant les bactéries LF82 en macrophages a montré que ceux-ci transitent normalement le long de la voie endocyttaire (Bringer *et al.*, 2006). En effet, contrairement à de nombreuses bactéries pathogènes qui échappent à la maturation phagosomale normale ou qui infiltrent la voie de l'autophagie (Dorn *et al.*, 2002; Meresse *et al.*, 1999), les bactéries LF82 sont internalisées dans des phagosomes qui évoluent vers un compartiment de type phagolysosomal acide et contenant de la cathepsine D active. Les mécanismes par lesquels les bactéries LF82 résistent à l'activité



**Figure 19 : Autophagie et contrôle de bactéries intracellulaires.**

**A.** L'autophagie contribue à l'immunité innée en dégradant des bactéries soit cytoplasmiques soit intra-phagosomales qui sont capables de résister à la dégradation par le trafic endocyttaire. **B.** Une altération du mécanisme de l'autophagie chez des patients génétiquement prédisposés, avec mutation ATG16 L1\*300A et/ou délétion en amont du gène IRGM, conduit à un défaut de prise en charge des bactéries intracellulaires AIEC, favorisant ainsi leur persistance (d'après Glasser *et al.*, 2009).

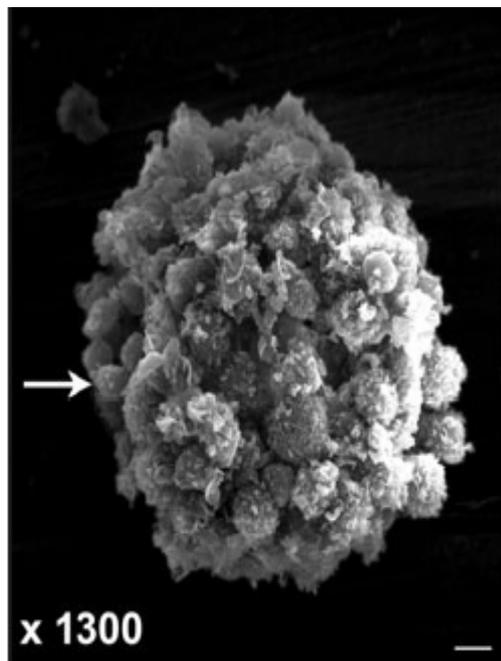
hydrolytique de la cathepsine D sont encore inconnus. La neutralisation du pH intravacuolaire des phagosomes contenant les bactéries LF82 avec des agents lysosomotropiques alcalinisants, tels que la chloroquine ou le chlorure d'ammonium, inhibe la réplication intracellulaire des bactéries, indiquant que le pH vacuolaire acide constitue un signal clé impliqué dans la régulation de gènes de virulence nécessaires à la survie/multiplication des bactéries LF82 en macrophages (Bringer *et al.*, 2006).

### **2.3.2. Survie et multiplication en cellules épithéliales**

L'hypothèse infectieuse est renforcée par les études de génétique humaine avec l'identification de variants des gènes *ATG16L1* et *IRGM* qui met en évidence l'importance de l'autophagie dans la MC (voir paragraphe I. 2.3). La colonisation iléale par des souches AIEC et l'association à la MC des polymorphismes *ATG16L1* et *IRGM* suggèrent qu'une altération de l'autophagie pourrait jouer un rôle important dans l'immunopathogénèse de la MC. En modèle de fibroblastes murins déficients pour l'autophagie, la souche de référence AIEC LF82 se multiplie plus intensément que dans des fibroblastes normaux. Ce comportement intracellulaire n'est pas retrouvé pour les souches d'*E. coli* commensaux ou entéropathogènes, semblant indiquer une prise en charge spécifique de souches AIEC par l'autophagie. Par ailleurs ce processus cellulaire est induit par les cellules en réponses à l'infection et une partie des bactéries internalisées sont retrouvées dans des autophagosomes où leur multiplication est contrôlée. Une extinction de l'expression des gènes *ATG16L1* et *IRGM* permet à la souche AIEC LF82 une réplication intracellulaire importante (**Figure 19**). Ces données suggèrent qu'un dysfonctionnement de l'autophagie chez des patients serait favorable à la persistance de bactéries AIEC pouvant conduire à une réponse immunitaire exacerbée caractéristique de la pathologie (Lapaquette *et al.* 2010).

### **2.4. Souches de *E. coli* adhérentes et invasives associées à la MC et formation de granulomes**

La présence de granulomes épithélioïdes constitue l'une des caractéristiques histologiques de la MC. Plusieurs études viennent appuyer l'hypothèse de l'implication de *E. coli* dans la formation des granulomes. En effet, des antigènes et de l'ADN de *E. coli* ont été retrouvés dans les granulomes de patients atteints de MC (Cartun *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2004a) et il a de plus été mis en évidence la présence systématique de *E. coli* ou d'antigènes de *E. coli* dans les granulomes des chiens Boxer atteints de colites



**Figure 20 : Cliché de microscopie électronique à balayage d'une structure granulomateuse induite *in vitro* par la souche AIEC LF82.**

Les agrégats contiennent à la fois des lymphocytes (indiqués par la flèche) et des macrophages (d'après Meconi *et al.*, 2007).

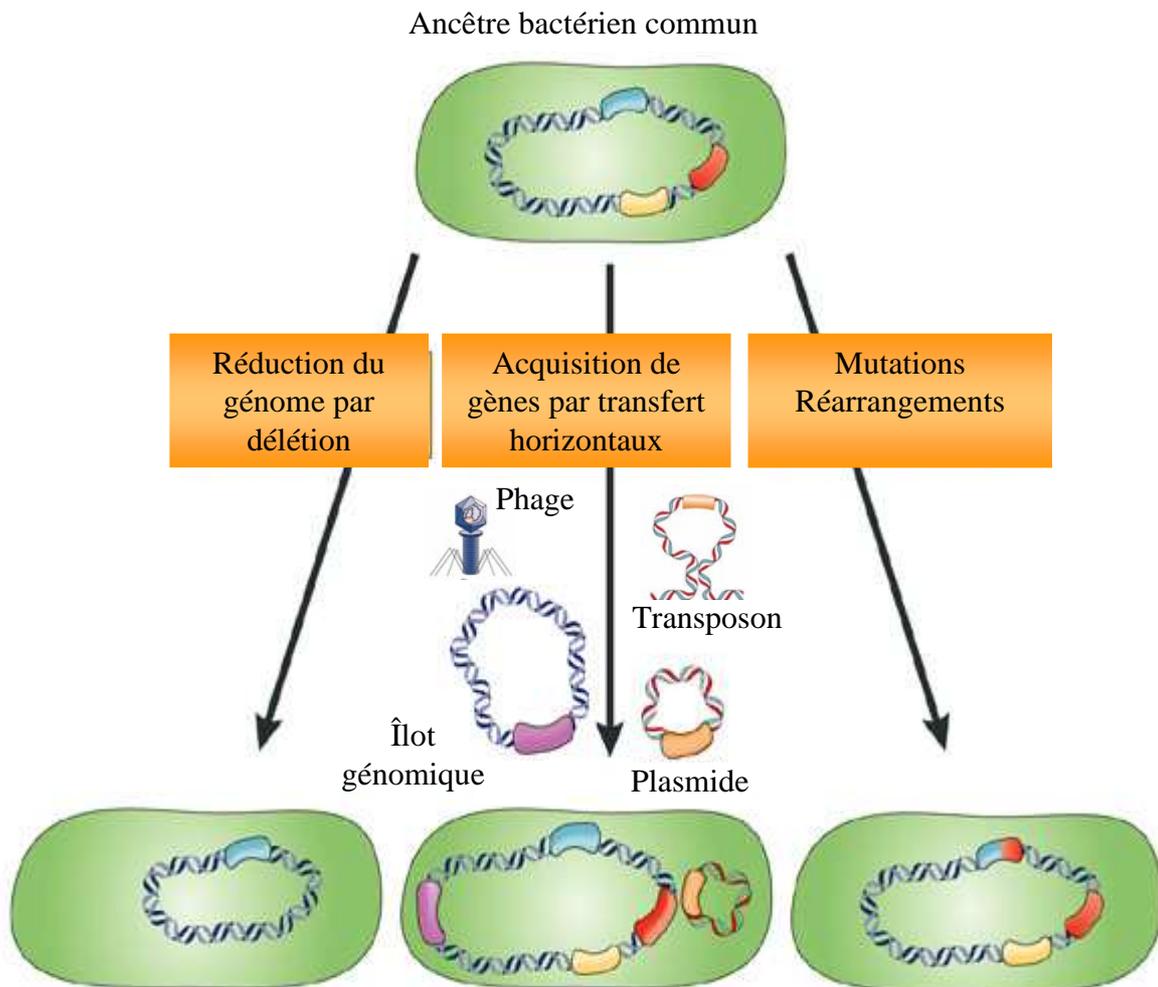
granulomateuses (Van Kruiningen *et al.*, 2005). Ces souches de *E. coli* ont la capacité d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales en culture et la capacité de survivre et de se multiplier dans les macrophages de façon similaire aux souches de *E. coli* associées à la MC (Simpson *et al.*, 2006).

Récemment, il a été montré que la souche LF82 induisait la formation de granulomes *in vitro* (Meconi *et al.*, 2007). En effet, les bactéries LF82 sont capables d'induire l'agrégation de macrophages humains infectés puis le recrutement de lymphocytes « circulants » et la formation de cellules géantes multinucléées au sein de ces agrégats. Les agrégats ainsi formés ressemblent fortement aux granulomes associés à la MC, dont la plupart sont constitués de macrophages, de lymphocytes et de cellules géantes multinucléées (**Figure 20**). Des extraits totaux de bactéries LF82 seuls sont également capables d'induire la formation de ces granulomes, alors que ni des souches vivantes de *E. coli* non pathogènes ni des extraits totaux de ces souches n'induisent la formation d'agrégats, indiquant donc la présence chez la souche LF82 d'antigènes spécifiques impliqués dans la formation des granulomes.

## 2.5. Définition du pathovar AIEC et prévalence

Les différentes caractéristiques des souches de *E. coli* associé à la MC ont permis de définir un nouveau pathovar dénommé AIEC pour Adherent-Invasive *E. coli* (Boudeau *et al.*, 1999). Les critères d'inclusion dans ce groupe sont définis sur la base de leurs caractéristiques pathogéniques: (i) capacité à adhérer et envahir les cellules épithéliales intestinales selon un processus dépendant du recrutement des microtubules et des microfilaments, (ii) capacité à survivre et se multiplier fortement au sein de larges vacuoles dans les macrophages sans induire de mort cellulaire et (iii) capacité à induire la libération de taux élevés de TNF- $\alpha$  par les macrophages infectés.

Une étude de la prévalence des souches AIEC associées à la muqueuse intestinale des patients atteints de MC a indiqué que des souches AIEC sont retrouvées au niveau de la portion néotermale de l'iléon chez 36,4% des patients atteints de MC contre seulement 6,2% chez les contrôles (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). De plus, plusieurs études indépendantes ont rapporté la présence de souches de *E. coli* adhérentes et invasives associées à la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MC (Baumgart *et al.*, 2007; Conte *et al.*, 2006; Eaves-Pyles *et al.*, 2007; Kotlowski *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009a; Sasaki *et al.*, 2007). L'ensemble de ces éléments est en faveur d'un rôle inducteur et amplificateur des AIEC dans la MC.



**Figure 21 : Schéma de l'évolution bactérienne par acquisition ou perte d'information génétique.**

L'évolution du génome bactérien peut avoir plusieurs origines non exclusives: la perte d'éléments génétiques, l'acquisition de gènes par transferts horizontaux à partir d'îlots génomiques, de plasmides ou encore de bactériophages et par mutations ponctuelles ou réarrangements chromosomiques (d'après Dobrindt *et al.*, 2004).

### **III. *E. coli* : organisation du génome et virulence**

#### **III.1. Evolution de l'espèce *E. coli***

L'organisation chromosomique entre les bactéries proches est globalement conservée mais il existe une grande variabilité génomique entre des bactéries d'une même espèce ou d'un même genre. Toutes les bactéries sont capables d'évoluer par modification (gain ou perte) de matériel génétique, causée par des recombinaisons génétiques ou des mutations, et de transmettre ces modifications verticalement aux générations suivantes. Quelques bactéries peuvent également acquérir des informations génétiques par trois mécanismes distincts : la transformation qui est un transfert de plasmide, la transduction impliquant un bactériophage, et la conjugaison grâce aux pili sexuels. Cette acquisition de gènes, provenant d'une autre bactérie ou de l'environnement, est appelée transfert horizontal de gènes. Ainsi, le chromosome des bactéries est constitué de deux groupes de gènes différents : le squelette génomique (« backbone » ou « core genome ») et les gènes flexibles acquis.

##### **1.1. Le squelette génomique de l'espèce**

L'analyse comparative des différents génomes disponibles à ce jour confirme une variabilité de taille des génomes au sein de l'espèce *E. coli*. La plupart des souches pathogènes possèdent des génomes de plus grande taille par rapport à ceux des souches commensales. Le génome de la souche de *E. coli* K-12 séquencée en 1997 est constitué de  $4,7 \times 10^6$  paires de bases (4 200 protéines codées). Certains gènes sont communs à toutes les souches de *E. coli* et définissent le squelette génomique qui théoriquement comprend tous les gènes communs à toutes les souches de cette même espèce et codent des fonctions essentielles à leur physiologie (Welch *et al.*, 2002). L'analyse de ces gènes permet d'étudier les relations génétiques entre espèces. Cependant le nombre de gènes constituant ce squelette dépend principalement du nombre et de la diversité des organismes comparés.

##### **1.2. Les gènes flexibles**

###### **1.2.1. Les systèmes de transferts génétiques**

Différents processus sont connus pour participer à la variation génique chez *E. coli* : la perte d'information génique par délétion, les mutations spontanées et l'intervention de systèmes de transferts horizontaux de matériel génétique (**Figure 21**).

✦ **Les bactériophages** (ou phages) sont des virus infectant les bactéries et participant aux transferts horizontaux de gènes entre populations bactériennes par un mécanisme appelé



transduction. Les bactériophages persistent dans le monde bactérien sous deux états distincts : en tant que phage virulent (qui se réplique dans une cellule bactérienne réceptive) ou sous forme lysogène (inséré dans le génome sous la forme d'un prophage, il devient partie intégrante du génome de l'hôte). Ainsi les bactéries peuvent acquérir de nouveaux éléments génétiques et lorsque ils codent des facteurs de virulence, la bactérie infectée voit son pouvoir pathogène augmenté : c'est le phénomène de « conversion lysogénique ». Un exemple bien connu est celui des gènes des toxines Stx des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Ces gènes *stx* sont localisés dans des séquences de bactériophages de type lambda intégrés dans le chromosome. En général, les génomes de *E. coli* se caractérisent par un contenu variable en éléments phagiques : la souche K-12 MG1655 présente 11 prophages. Les bactériophages lysogènes sont souvent intégrés dans le chromosome au niveau de loci codant des ARN de transfert (ARNt). De plus, la recombinaison homologue entre les séquences de phages cryptiques en différentes régions du chromosome serait à l'origine d'une évolution permanente de ce génome. Ces observations indiquent clairement que les bactériophages jouent un rôle prépondérant dans la diversification des souches.

✦ **Les plasmides** désignent des molécules d'ADN bactérien circulaires distinctes de l'ADN chromosomique, capables de se répliquer de façon autonome et qui sont non essentiels à la survie de la bactérie. Ces molécules d'ADN peuvent aisément être transmises de manière horizontale entre bactéries par un mécanisme appelé conjugaison, constituant ainsi des éléments particulièrement dynamiques dans la plasticité des génomes. Cependant, il existe des plasmides non conjugatifs pouvant être transférés lors d'événements de conjugaison impliquant d'autres plasmides conjugatifs. Environ 300 plasmides différents ont été décrits dans l'espèce *E. coli* et peuvent porter des gènes impliqués dans diverses fonctions comme la production de colicines, l'utilisation de sucres, la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds mais aussi des gènes associés à la virulence.

✦ **Les éléments transposables** ont été découverts au début des années 50 par Barbara McClintock qui a reçu le Prix Nobel de médecine en 1983. Ils comprennent les « séquences d'insertion » (IS), les transposons composites et non composites ; ceux-ci permettent un transfert de matériel génétique entre deux régions d'ADN (chromosomiques ou plasmidiques) par un mécanisme appelé transposition. La transposition fait intervenir des recombinases permettant l'intégration d'ADN au niveau de sites spécifiques ou non.

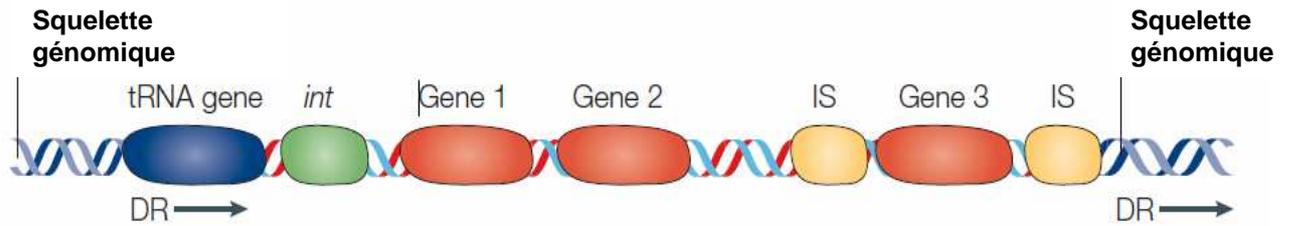


Les éléments transposables les plus simples sont les **IS** qui codent une recombinase appelée transposase permettant leur propre mobilité. Ce gène est encadré par une séquence de nucléotides inversement répétée (*inverse repeats*) qui marque les extrémités de l'IS permettant sa reconnaissance. La transposition est spécifique car les IS s'intègrent dans un site composé de deux séquences directement répétées (*direct repeats*) spécifiques à sa transposase. L'intégration d'un IS peut moduler l'expression génique et ainsi avoir un impact direct sur les caractères phénotypiques d'une souche.

Les IS peuvent également jouer un rôle important dans le mouvement de gènes par transferts horizontaux en s'associant par deux et en formant ainsi un **transposon composite**. Seule une des deux IS code alors pour une transposase, l'autre codant pour un régulateur de transposition. Il faut noter que, dans la souche K-12 de référence MG1655, 25 des 39 IS sont associées avec des séquences d'ADN acquises horizontalement (Lawrence and Ochman, 1998).

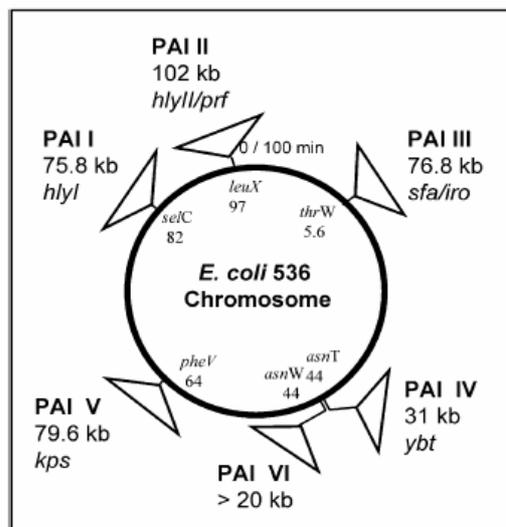
De plus, il existe aussi des **transposons non composites** caractérisés par la présence de séquences répétées inversées et l'absence d'IS aux extrémités. Les transposons peuvent intervenir dans le mouvement d'ADN acquis depuis des éléments extra-chromosomiques, comme des plasmides ou des phages, vers le chromosome. Un exemple caractéristique est le Tn21, présent chez *E. coli* et d'autres entérobactéries, qui permet le transfert de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (Liebert *et al.*, 1999).

✦ **Les intégrons** sont des éléments génétiques immobiles mais capables de capturer des gènes dits « gènes cassettes » par recombinaison site-spécifique et d'en assurer l'expression grâce à une région promotrice. Les intégrons sont constitués d'une région 5' comprenant un gène *intI* qui code une intégrase et dont le polymorphisme définit le type d'intégron, ainsi qu'un promoteur et un site d'attachement *attI*. La région 3' diffère selon les intégrons et correspond à la « cassette ». Celle-ci est constituée d'un gène (souvent un gène de résistance aux antibiotiques) et d'un site spécifique de recombinaison *attC*. L'intégrase catalyse préférentiellement la réaction de recombinaison *attI X attC* qui aboutit à l'intégration de la cassette au sein de l'intégron, mais elle est aussi capable de catalyser une réaction *attC X attC* qui aboutit à l'excision de la cassette hors de l'intégron. Les intégrons constituent donc un système de capture et d'expression de gènes et jouent un rôle important dans l'acquisition et la dissémination des gènes, notamment des gènes de résistance aux antibiotiques. L'intégration de plusieurs cassettes et leur mouvement au sein d'un même intégron permet la constitution de



**Figure 22 : Caractéristiques générales d'un îlot génomique.**

Les îlots génomiques sont acquis par transferts horizontaux et généralement intégrés dans le squelette génomique bactérien au niveau des gènes codant les ARN de transfert. Ces îlots sont bordés par des structures en répétition directes (DR) et comprennent différents gènes, notamment des séquences d'insertion (IS) et des gènes codant des intégrases (*int*) impliqués dans leur mobilité (d'après Dobrindt *et al.*, 2004).



**Figure 23 : Localisation des îlots de pathogénicité (PAI) sur le chromosome de la souche UPEC 536. Représentation basée sur la comparaison des génomes des souches de *E. coli* UPEC 536 et K-12 MG1655.**

Les six PAI de la souche UPEC 536 sont représentés à leur site d'insertion chromosomique au niveau des gènes codant les ARN de transfert. *hly*: gènes codant l'hémolysine  $\alpha$ ; *sfa*: gènes codant les pili S; *iro*: gènes codant un système de captation du fer (salmocheline); *ybt*: gènes codant le système de captation du fer yersiniabactine; *kps*: gènes codant la mise en place de la capsule (d'après Hacker *et al.*, 2004).

véritables mosaïques génétiques conférant aux bactéries des capacités rapides d'adaptation à des conditions hostiles.

✦ **Les îlots génomiques** sont acquis à la faveur d'une transformation, d'une transduction ou d'une conjugaison et sont intégrés de manière plus ou moins stable dans l'ADN bactérien. Il s'agit de zones possédant des caractéristiques différentes du reste du génome (**Figure 22**) (Dobrindt *et al.*, 2004):

- Région génomique de grande taille (entre 10 et 200 kilobases).
- GC% pouvant être différent. Ceci atteste d'une origine exogène et facilite leur identification.
- Sites spécifiques d'intégration, fréquemment situés dans des régions qui codent pour les ARN de transfert.
- Bornés par des séquences répétées directes de 9 à 136 pb créées par recombinaison lors de l'intégration de l'îlot. Il faut noter que certains îlots ont perdu les éléments ayant permis leur intégration, ainsi ils ne sont plus capables d'être transférés ce qui explique leur spécificité au sein de certains pathovars.
- Présence de gènes de mobilité fonctionnels ou le plus souvent cryptiques tels que IS, transposons et intégrons. Ainsi les îlots peuvent provoquer divers réarrangements moléculaires par recombinaison et augmenter leur diversité.

Certains îlots génomiques ne codent pour aucun phénotype connu, mais la plupart d'entre eux codent pour des voies métaboliques ou des facteurs de pathogénicité et sont alors nommés « îlots de pathogénicité » ou PAI (Hacker *et al.*, 2004). Les premiers PAIs mis en évidence et caractérisés sont les six PAIs retrouvés dans la souche de *E. coli* uropathogène 536 (**Figure 23**) qui codent d'importants facteurs de virulence comme l'hémolysine  $\alpha$ , les pili P, les pili S, un système de captation du fer ou l'antigène de capsule (Dobrindt *et al.*, 2004). Les PAIs peuvent aussi porter tous les gènes nécessaires à la mise en place d'un système de sécrétion comme le système de sécrétion de type III chez les souches de *E. coli* entérohémorragiques O157:H7 (Kirsch *et al.*, 2004) et le système de sécrétion de type VI chez les souches de *E. coli* entéroagréatives et aviaires (Dudley *et al.*, 2006; Shalom *et al.*, 2007).

Cependant, chez *E. coli* une étude comparative de plusieurs génomes montre qu'il existe des points d'insertion des îlots génomiques que les points d'insertion des îlots génomiques sont variables mais souvent situés au niveau des gènes d'ARNt ou d'intégrase. De plus, il semble que ces régions génomiques variables soient constituées de MODULES et dont la



présence ne semble pas associée à l'appartenance à un phylotype donné ni même au caractère pathogène des souches (Touchon *et al.*, 2009).

### **1.2.2. Systèmes de défense des bactéries contre les transferts horizontaux de gènes**

Seule une minuscule fraction des gènes obtenus par transferts horizontaux confère un avantage sélectif immédiat à la souche. Ainsi, les bactéries ont développé des mécanismes de protection contre ces transferts comme les endonucléases de restriction mais aussi des systèmes beaucoup plus évolués comme les systèmes d'exclusion ou le système CRISPR.

#### **i. Systèmes d'exclusion**

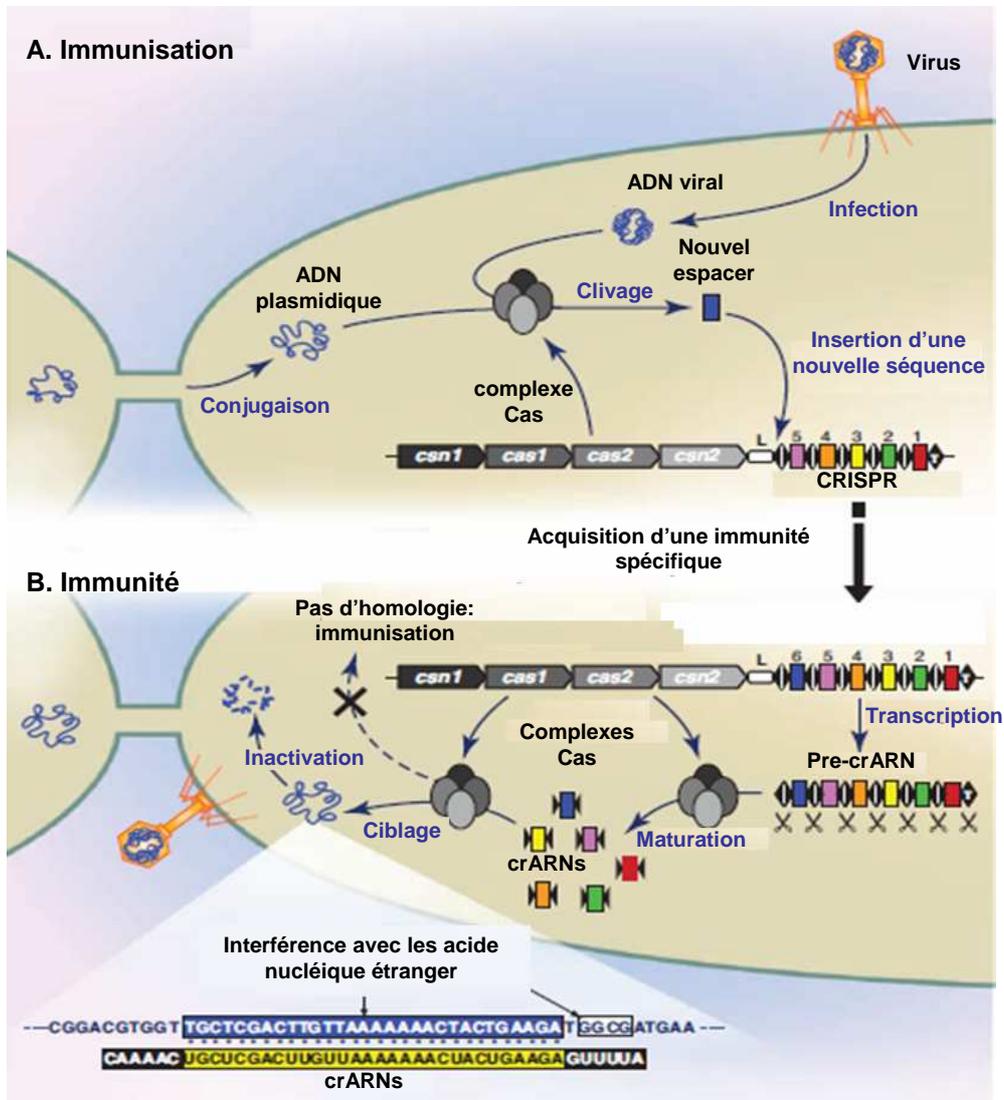
Il s'agit de mécanismes visant à limiter l'initiation de la conjugaison et la synthèse du pilus entre deux donneurs afin de limiter les dépenses d'énergie inutiles à la bactérie.

Le premier système est l'**exclusion de surface**. Un plasmide, présent dans une bactérie, code des lipoprotéines de la membrane externe TraT. Ces protéines sont semblables aux protéines OmpA qui servent d'encrage au pilus lors de l'initiation de la conjugaison. La différence est que leur affinité pour le pilus est supérieure à celle d'OmpA. La fixation du pilus à TraT bloque ainsi la conjugaison.

Le deuxième système est l'**exclusion d'entrée**. Dans ce mécanisme, une protéine de la membrane interne TraS bloque le passage des signaux envoyés par la bactérie donneuse (signal de mobilisation) après l'agrégation avec une bactérie donneuse. Ces signaux sont nécessaires au bon déroulement de la conjugaison et leur blocage arrête la conjugaison.

#### **ii. CRISPRs**

Les CRISPRs (Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) constituent une famille particulière d'éléments génétiques retrouvés dans de nombreux génomes de procaryotes (la moitié des bactéries et presque toutes les archées). Des études récentes suggèrent que ces structures représentent un système de défense contre les transferts horizontaux d'ADN, notamment la conjugaison et la transduction, fonctionnant grâce à un mécanisme d'interférence ARN analogue à celui des eucaryotes (Pour revue : Horvath and Barrangou, 2010 ; Marraffini and Sontheimer, 2010). Les CRISPRs consistent en une succession de régions très conservées et répétées dont la taille varie de 23 à 47 pb, séparées par des séquences uniques d'une taille similaire. Elles présentent en général des homologies avec des séquences d'ADN plasmidique ou phagique précédemment rencontrées par le



**Figure 24 : Mécanisme d'action du système CRISPR/Cas.**

**A. Immunisation** : après entrée de l'ADN étranger plasmidique ou phagique dans la bactérie, l'ADN est pris en charge par un complexe de protéines Cas et intégré entre deux séquences répétées juste après la séquence *Leader* du locus CRISPR. **B. Immunité** : le locus CRISPR est transcrit en un pré-crARN puis maturé en crARN. Ces petits ARN servent de guide au complexe de protéines Cas pour interférer avec les séquences ADN correspondantes susceptibles de se ré-insérer dans la bactérie. Triangles : séquences répétées; Rectangles : guides; L : séquence *Leader* (d'après Horvath et Barrangou, 2010).

microorganisme hôte représentant les cibles du système qui peuvent être étendues. Le mécanisme d'action n'est pas totalement connu, mais les séquences CRISPR sont souvent associées à des gènes appelés *cas* pour « CRISPR associated sequences ». Les gènes *cas* codent pour des protéines très variées portant des domaines fonctionnels tels que des nucléases, des hélicases, des polymérases et des polynucleotides-binding protéines. Lorsqu'un ADN étranger (plasmide, ADN phagique...) entre dans le microorganisme hôte, il serait pris en charge par un complexe de protéines Cas. Le clivage de cet ADN génère un fragment qui constitue une nouvelle signature et s'intègre en aval de la séquence Leader (promoteur de transcription). Cette étape correspond en quelque sorte à l'immunisation (**Figure 24**). Le CRISPR est ensuite transcrit par le microorganisme en pré-crARN pris en charge par des protéines Cas pour être clivé en petits ARN CRISPR contenant une seule signature : crARN. Ces petits ARN serviraient de guide à la machinerie Cas pour éliminer spécifiquement les ADN étrangers correspondants, conférant ainsi une certaine immunité aux microorganismes (**Figure 24**).

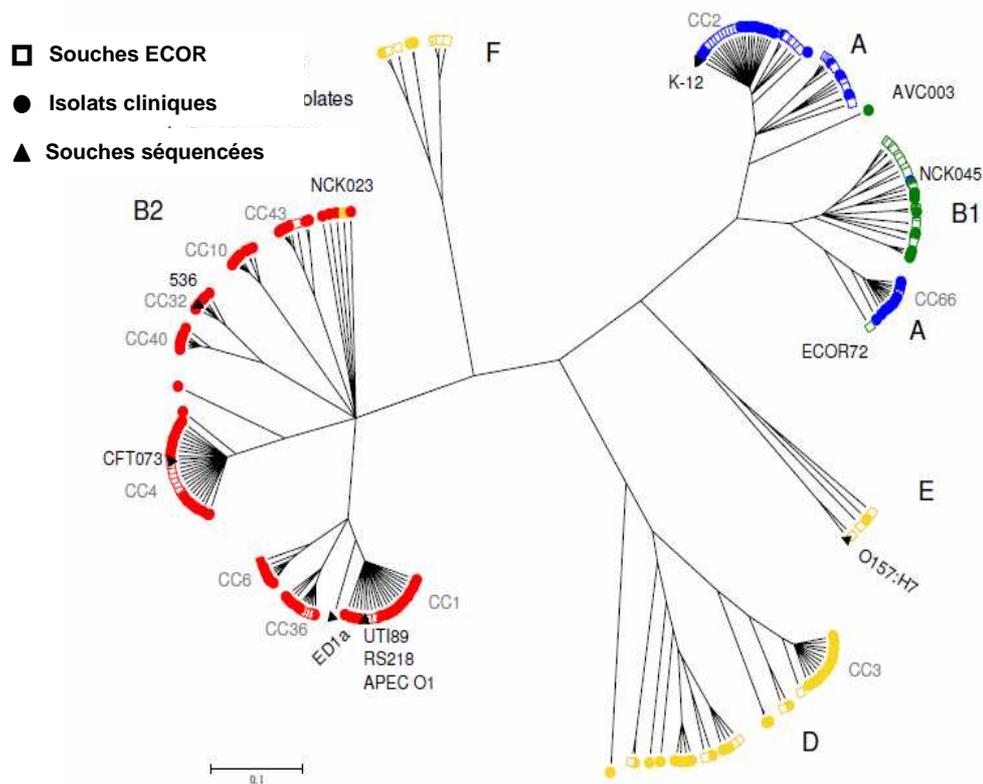
Le système d'interférence CRISPR constitue donc en quelque sorte un système d'immunité adaptative qui peut être reprogrammé, reflétant ainsi une certaine « mémoire génétique ». Il faut noter que le **CRISPR** présente aussi un polymorphisme entre différentes souches de la même espèce, ce qui en fait un marqueur génétique intéressant pour des analyses comparatives de souches bactériennes très proches et pour des études phylogénétiques.

### **III.2. Classification de l'espèce *E. coli***

Historiquement l'espèce *E. coli*, faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, a été déterminée à partir de caractères phénotypiques, biochimiques et physiologiques. Aujourd'hui ce sont des techniques basées sur l'utilisation de l'ADN qui permettent une étude génétique des populations et la caractérisation des différentes souches de *E. coli*.

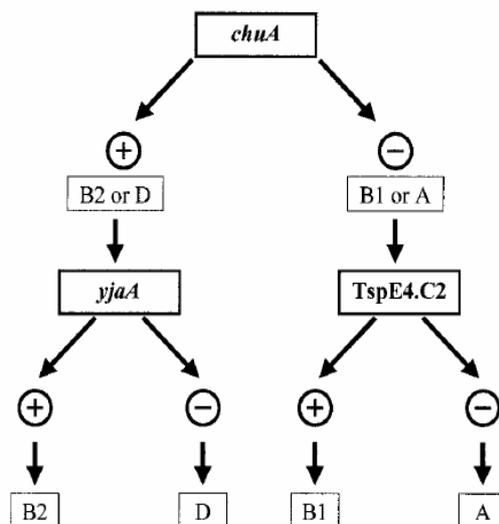
#### **2.1. Tests moléculaires et phylogénie de l'espèce**

Depuis la fin des années 90 et l'utilisation des automates permettant le développement du séquençage des gènes, la **technique MLST** (Multilocus sequence typing) est reconnue comme la plus puissante pour l'étude génétique des populations (Enright and Spratt, 1999). Elle mesure directement la variation de la séquence ADN dans un groupe de gènes dits « gènes de ménage », connus pour avoir subi peu de recombinaison, caractérisant ainsi les souches par un profil allélique unique. La technique MLST est basée sur le principe de la



**Figure 25 : Arbre phylogénétique du groupe *E. coli*.**

Étude réalisée avec ClonalFrame et basée sur l'analyse de la séquence de 8 gènes exprimés soit 4 095 nucléotides. Cercles : 161 souches de *E. coli* isolés de patients; Carrés: 67 souches de *E. coli* de la collection ECOR; Triangles: 7 souches de référence de *E. coli* totalement séquencées. Les symboles colorés ont été testé par PCR-triplex afin de vérifier le groupe phylogénétique (rouge: B2; vert: B1; jaune: D et bleu: A) (d'après Jaureguy *et al.*, 2008).



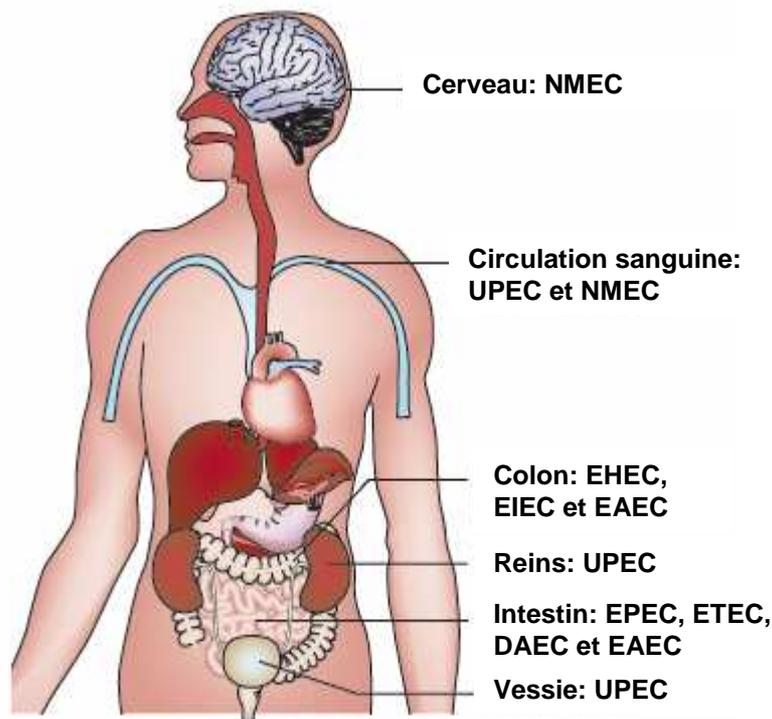
**Figure 26 : Dichotomie permettant de déterminer le groupe phylogénétique de souches de *E. coli* par amplification génique (PCR) (d'après Clermont *et al.*, 2000).**

technique **MLEE** (Multilocus enzyme electrophoresis) qui consiste à analyser des variations de mobilité électrophorétique de certaines enzymes bactériennes (isoenzymes). La technique MLEE peut être considérée comme une méthode génotypique car les variations de mobilité sont dues à des différences dans la séquence en acides aminés de l'enzyme qui reflètent des différences dans la séquence nucléotidique du gène correspondant. Pour la technique MLST, les algorithmes des logiciels de génétique des populations effectuent un regroupement, ou « clustering », des souches en fonction de la « séquence type » déduite des différents allèles. Les informations apportées par la technique MLST sont d'autant plus précises que les collections de souches de l'espèce *E. coli* sont riches. La collection modèle ECOR, établie par Ochman et Selander en 1984, comporte 72 souches (Ochman and Selander, 1984).

Dans l'espèce *E. coli*, différentes études faisant appel à la technique MLST montrent la présence de quatre groupes phylogénétiques majeurs A, B1, B2 et D (précédemment décrits par MLEE), ainsi que trois groupes mineurs nommés C, E et F. Lecointre et coll. ont pour la première fois en 1998, grâce à cette technique, raciné l'arbre de *E. coli* par comparaison avec un groupe externe *Salmonella enterica* (Lecointre *et al.*, 1998). Cette étude a permis aussi de définir le groupe B2 comme le plus ancien des groupes phylogénétiques chez *E. coli*. Des études par la technique MLST, menées par Jaureguy et coll. chez 67 souches de la collection ECOR et 161 isolats de bactériémies, ont permis de confirmer l'existence des quatre groupes phylogénétiques majeurs et de montrer que les groupe B1 et A sont proches, avec un caractère biphylétaire du groupe A (**Figure 25**) (Jaureguy *et al.*, 2008). De plus, le groupe D est séparé en deux sous-groupes ; et le sous-groupe habituellement associé au groupe B2 est nommé F.

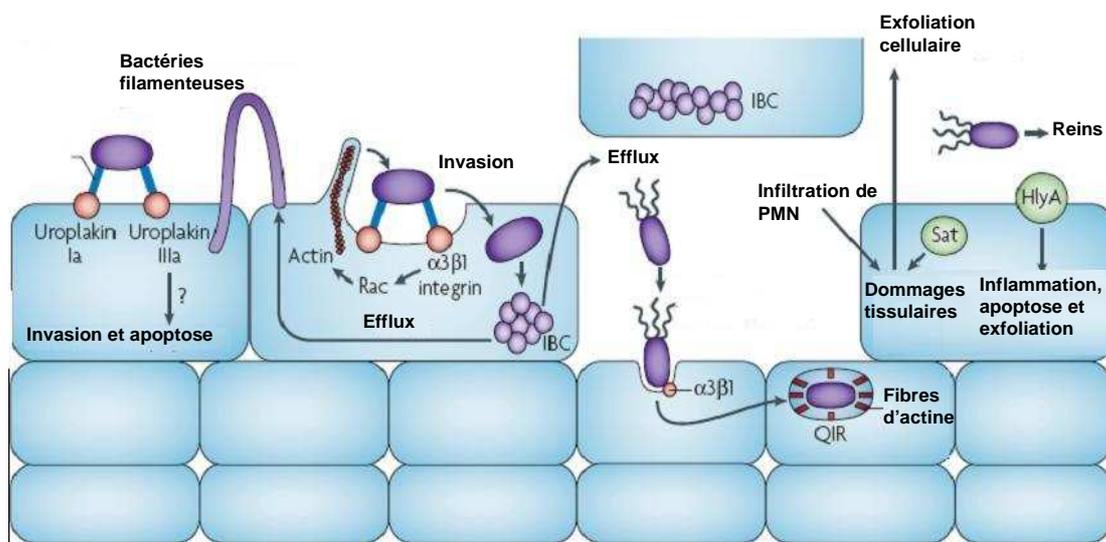
Une technique d'amplification par PCR de trois fragments d'ADN (*chuA*, *yjA* et *TSPE4.C2*), **PCR triplex**, a été mise au point afin de déterminer plus simplement l'appartenance de certains isolats aux quatre groupes phylogénétiques majeurs (B2, D, B1 et A) (**Figure 26**) (Clermont *et al.*, 2000). Cette méthode simple a montré une bonne corrélation avec la technique MLST même si elle est moins précise (Gordon *et al.*, 2008).

Les processus évolutifs ont conduit à faire de *E. coli* une espèce bactérienne hautement versatile capable de coloniser, de se multiplier dans divers environnements (tractus urinaire, intestinal...) et d'y produire des dommages en interférant avec une grande variété de fonctions de l'hôte. Ainsi les modes de vie et les propriétés physiologiques variées des souches de *E. coli* sont le reflet de leur grande diversité au niveau génétique, qui est elle-même dépendante de voies de régulation complexes.



**Figure 27 : Différents groupes de *Escherichia coli* pathogènes.**

*E. coli* entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin et sont à l'origine de diarrhées, alors que *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et *E. coli* entéroinvasif (EIEC) colonisent plutôt le colon; *E. coli* entéroaggrégatif (EAEC) peut coloniser les deux. *E. coli* uropathogène (UPEC) colonise le tractus urinaire jusqu'à la vessie et est à l'origine de cystites. En fonction des facteurs de virulence hébergés par les souches, les UPEC peuvent remonter jusqu'aux reins et entraîner une pyélonéphrite. De plus, les UPEC comme les *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC) peuvent entraîner une septicémie (d'après Croxen et Finlay, 2010).



**Figure 28 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* uropathogènes.**

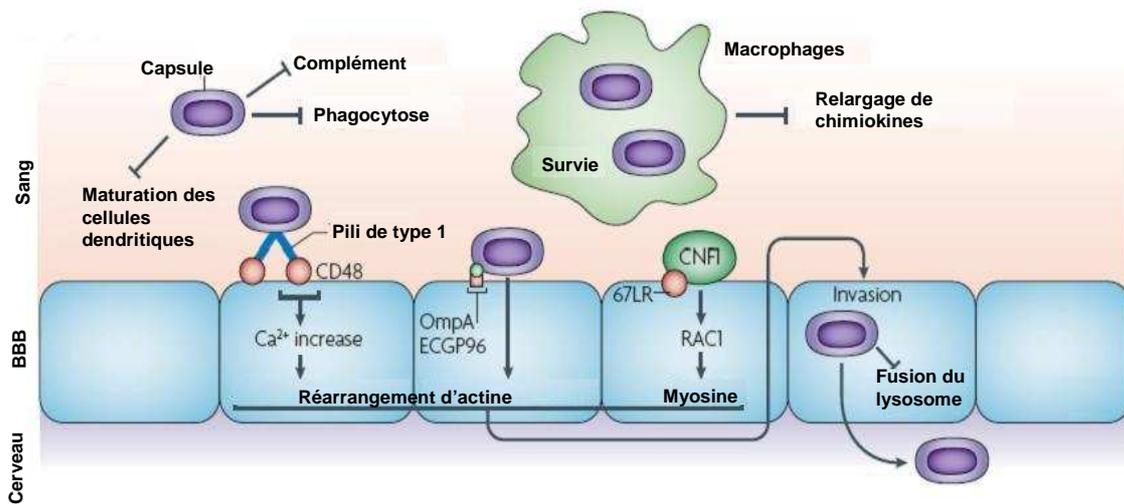
Les UPEC adhèrent aux cellules uroépithéliales *via* les pili de type 1 reconnaissant les récepteurs uroplakin Ia et IIIa; cette liaison active une voie de signalisation inconnue qui permet l'invasion et l'apoptose. La liaison des pili de type 1 aux intégrines  $\alpha3\beta1$  permet la formation d'une communauté bactérienne intracellulaire (IBC). L'hémolysine A (HlyA) est une toxine qui peut inhiber l'activation de la protéine Akt et entraîne l'apoptose et l'exfoliation des cellules ouvrant une nouvelle porte d'entrée aux UPEC. PMN: polymorphonuclear leukocyte; Sat: secreted autotransporter toxin (d'après Croxen et Finlay, 2010).

## 2.2. Diversité des souches et pathogénicité

*E. coli* est une espèce naturellement présente dans le tractus intestinal qui interagit avec son hôte dans une relation mutualiste, on parle alors de souches commensales. Cependant, chez un hôte immunodéprimé, ou lorsque la barrière intestinale est lésée, elles peuvent être à l'origine d'infections. De plus, certaines souches ont la capacité d'induire une large diversité de pathologies chez l'homme ou l'animal du fait de l'expression de facteurs de virulence spécifiques. Les *E. coli* pathogènes peuvent ainsi être séparés en deux grands groupes en fonction du type d'infection dont ils sont à l'origine (**Figure 27**). Le premier groupe, nommé ExPEC pour *E. coli* pathogènes extra-intestinaux, comprend les souches à l'origine d'infections du tractus urinaire (Uropathogenic *E. coli* ou UPEC), de méningites et de septicémies (neonatal meningitis *E. coli* ou NMEC) et le pathovar animal aviaire (APEC). Le deuxième groupe *E. coli* pathogènes intestinaux (IntEC) est à l'origine de syndromes diarrhéiques et comprend six groupes pathogènes ou pathovars. Il s'agit des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), des *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC), des *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), des *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) et des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) (Pour revues Croxen and Finlay, 2010 ; Guignot and Servin, 2006; Kaper *et al.*, 2004). De nouveaux pathovars sont fréquemment proposés et un des plus étudié est le pathovar AIEC pour adherent-invasive *E. coli* associé à la MC.

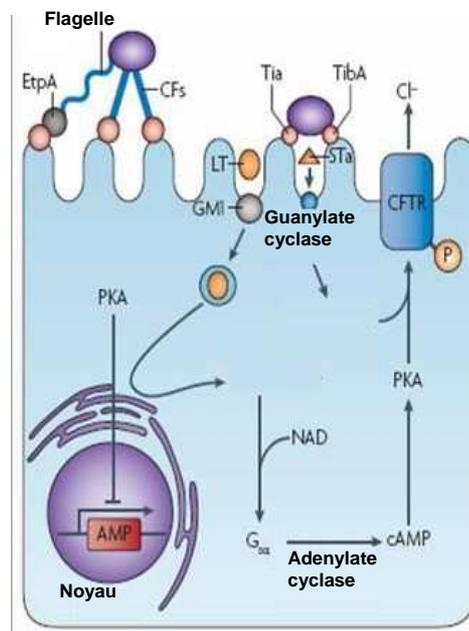
### 2.2.1. *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)

✦ **Les UPEC** sont responsables de la majorité (90 %) des infections survenant au niveau du tractus urinaire (cystites, pyélonéphrites). Leur pouvoir pathogène est caractérisé par de nombreux facteurs de virulence principalement codés par des gènes se trouvant dans des PAIs. Ces facteurs de virulence codent des systèmes de captation du fer, des adhésines, les antigènes de capsules et des toxines sécrétées (**Annexe 1**). La colonisation du tractus urinaire fait intervenir l'adhésion des bactéries aux cellules uro-épithéliales grâce à l'interaction des pili de type 1 portant l'adhésine FimH avec différents récepteurs comme les uroplakines I et IIIa ou les intégrines  $\alpha_3$  et  $\beta_1$  (**Figure 28**). Cette interaction conduit à l'internalisation des bactéries dans les cellules hôtes où elles forment une communauté bactérienne intracellulaire (IBC). L'ascension des bactéries aux reins se fait grâce à une régulation fine entre l'expression des flagelles et des pili de type 1 (Lane *et al.*, 2007). Plusieurs génomes UPEC ont été séquencés et on y retrouve les gènes codant plus de dix types de fimbriae différents. Cette analyse a permis d'introduire la notion : « Home is where your pili stick » (Wiles *et al.*, 2008). Les génomes des souches de référence 536, CFT073 et



**Figure 29 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* à l'origine de méningites néonatales.**

Les NMEC sont protégés du système immunitaire de l'hôte par une capsule de type K1. L'invasion des macrophages conduit à une niche de répllication pour les bactéries qui pourront par la suite traverser la barrière hémato-méningée afin d'atteindre le système nerveux central. Les mécanismes d'adhésion et d'invasion des NMEC fait intervenir les pili de type 1 et la protéine OmpA qui reconnaissent respectivement les récepteurs CD48 et Gp96. L'invasion met en jeu CNF1 (cytotoxic necrotizing factor 1) liant le récepteur laminine de 67 kDa (67LR) (d'après Croxen et Finlay, 2010).



**Figure 30 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entérotoxigènes.**

Les ETEC adhèrent aux entérocytes *via* les facteurs de colonisation (CF) et une adhésine localisée à l'extrémité du flagelle EtpA. Ensuite, une adhésion plus étroite fait intervenir les protéines Tia et TibA. Deux toxines, une thermolabile (LT) et l'autre thermostable (ST), sont sécrétées et entraînent des diarrhées du fait de l'activation du transporteur CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Gs $\alpha$ : stimulatory guanylyl-nucleotide-binding (G) protein  $\alpha$ -subunit; PKA,;protein kinase A. (d'après Croxen et Finlay, 2010).

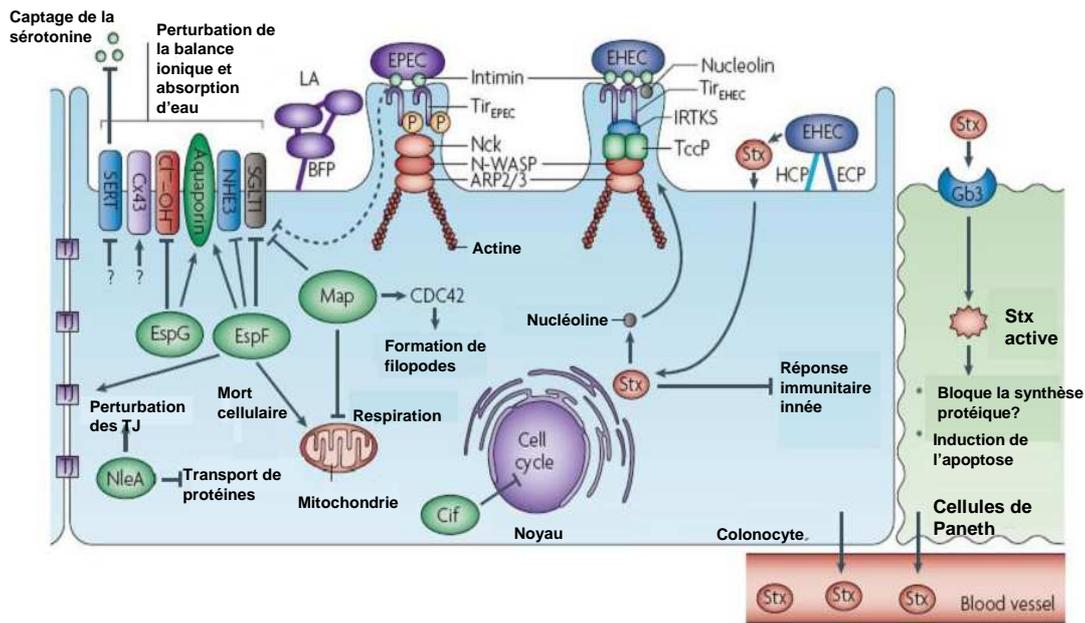
UTI89, de groupe phylogénétique B2, ont été séquencés (Hochhut *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2002).

✦ **Les NMEC** sont responsables de 80 % des cas de méningites néonatales. Le processus infectieux se fait en plusieurs étapes qui vont de la colonisation et l'invasion des muqueuses jusqu'à la traversée de la barrière hémato-méningée (**Figure 29**). Les bactéries utilisent les pili de type 1 et les fimbriae S pour reconnaître le récepteur CD48 à la surface luminale de l'endothélium cérébral. Par la suite, la protéine OmpA se lie à la glycoprotéine Gp96 pour induire l'internalisation des bactéries (Huang *et al.*, 2000; Prasadarao *et al.*, 1999). Le génome de la souche de référence S88, de groupe phylogénétique B2, contient d'autres facteurs de virulence mais leur rôle est mal connu (**Annexe 1**) (Touchon *et al.*, 2009).

✦ **Les APEC** ont été isolés de cas de colibacillose aviaire et sont responsables de pertes économiques importantes dans les élevages aviaires. Différents facteurs de virulence, déjà identifiés chez d'autres *E. coli* pathogènes, sont retrouvés chez les APEC (**Annexe 1**) (Dziva and Stevens, 2008). Cependant, ces facteurs ne sont pas représentatifs de tout le pathovar APEC, ce qui suggère différents mécanismes de pathogénicité. Le génome de la souche de référence APEC\_01, de groupe phylogénétique B2, a été séquencé (Johnson *et al.*, 2007), ce qui permettra d'accélérer l'identification de facteurs de virulence.

### 2.2.2. *E. coli* pathogènes intestinaux (IntEC) (**Annexe 1**)

✦ **Les ETEC** sont responsables de diarrhées du voyageur et de diarrhées infantiles aqueuses pouvant être fatales. Les ETEC adhèrent aux cellules épithéliales intestinales grâce aux facteurs CFA (Colonization Factor Antigen), à l'adhésine sécrétée EtpA qui se lie de façon transitoire à l'extrémité des flagelles (Roy *et al.*, 2009), et aux protéines de membrane externe Tia et TibA (**Figure 30**). De plus, les ETEC sécrètent deux entérotoxines, entérotoxines thermolabile (LT) et thermostable (ST), et les gènes codant ces toxines sont généralement situés sur un plasmide. La toxine LT est très similaire en fonction et en structure à la toxine cholérique. Il existe différents variants : LT-I associée à des maladies humaines et LT-II à des maladies animales. La toxine LT de structure AB<sub>5</sub>, avec la sous-unité A toxique et cinq sous unités B, permet l'adhésion des bactéries aux entérocytes via les gangliosides de surface GM1 et GD1b. La sous unité A active l'adénylate cyclase et induit l'augmentation de la sécrétion d'ions chlorure. La toxine ST correspond à un peptide de petite taille avec deux variants : STa (humaine) et STb (animale). La liaison de STa sur un récepteur à activité



**Figure 31 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC).**

EPEC et EHEC sont des pathogènes responsables de liaisons d'attachement-effacement (A/E) à la surface des entérocytes et entraînant la formation de piédestal. Des effecteurs sécrétés par le système de sécrétion de type III peuvent modifier l'activité des pompes  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  et  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , délocaliser des aquaporines et inhiber le co-transporteur sodium-D-glucose 1 (SGLT1).

Les **EPEC** adhèrent aux entérocytes *via* les BFP (bundle-forming pili) formant des microcolonies (adhésion localisée (LA)). Ensuite, la liaison entre le récepteur Tir transloqué et l'intimine permet une adhésion plus intime. Tir est phosphorylé par une thréonine kinase de l'hôte et  $\text{Tir}^{\text{P}}$  recrute Nck, qui active N-WASP (neural Wiskott–Aldrich syndrome protein) et le complexe protéique associé à l'actine 2/3 (ARP2/3) afin de réarranger l'actine et former un piédestal.

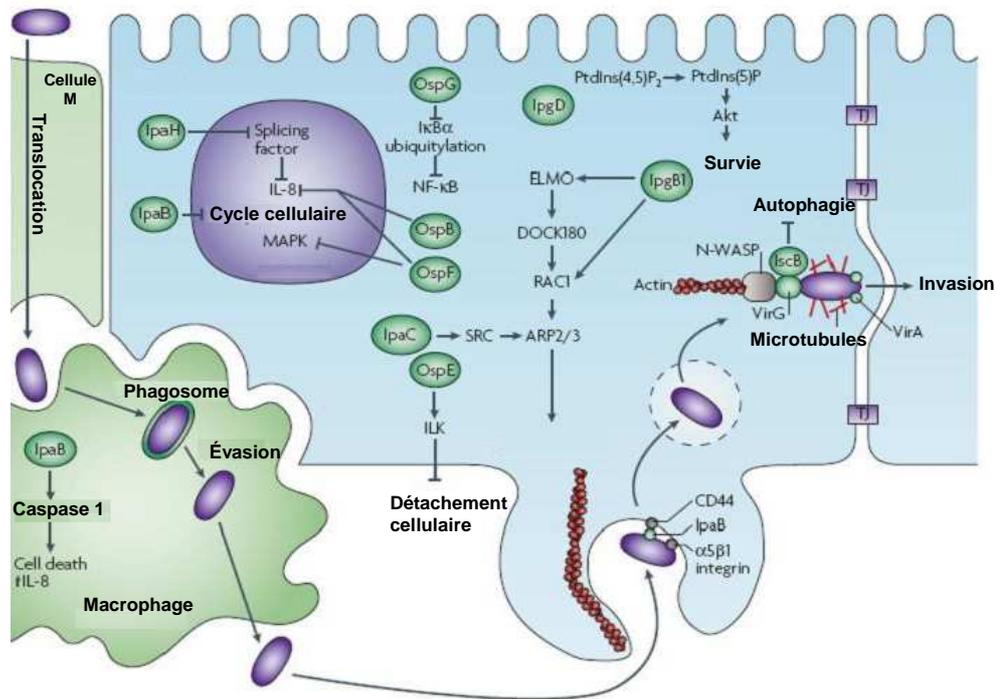
Les **EHEC** adhèrent aux entérocytes *via* les ECP (*E. coli* common pilus) et les HCP (haemorrhagic *coli* pilus). Chez les EHEC, Tir n'est pas phosphorylé et il n'y a pas recrutement de Nck. Le réarrangement d'actine nécessaire à la formation d'un piédestal est faite *via* par la protéine TccP (Tir de couplage au cytosquelette ou EspFU), qui interagit avec Tir par l'intermédiaire d'une protéine de l'hôte (IRTKS: insulin receptor tyrosine kinase substrate ou BAIAP2L1). Ce complexe se lie avec N-WASP pour activer ARP2/3. De plus, les EHEC produisent des Shiga-like toxines (Stx ou vérotoxines) qui interagissent avec le récepteur Gb3 (globotriaosylcéramide) des cellules de Paneth.

CDC42: cell division control protein 42; Cx43: connexin 43; Cif: cycle-inhibiting factor; Map: mitochondrial-associated protein; NHE3:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 3; EspI ou NleA: non-LEE-encoded effector A; SERT: serotonin transporter; TJ: jonctions serrées (d'après Croxen et Finlay, 2010).

guanylate cyclase stimule l'activité de ce dernier et augmente ainsi la sécrétion d'électrolytes au niveau intestinal. Le génome de la souche de référence E24377A, de groupe phylogénétique B1, a été récemment séquencé (Rasko *et al.*, 2008).

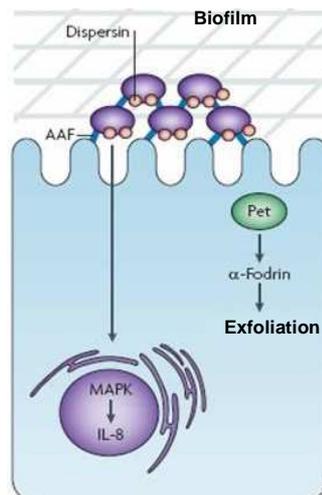
✦ **Les EPEC** ont été le premier pathovar décrit et représentent la cause majeure de diarrhées fatales chez le nourrisson dans les pays en voie de développement. Ils adhèrent aux cellules épithéliales intestinales grâce aux BFP (Bundle-Forming Pilus ou pili de type IV) codés par des gènes portés par le plasmide EAF (EPEC adherence factor) (**Figure 31**). Ces BFP permettent à la fois une adhésion bactérie-entérocyte et bactérie-bactérie formant ainsi des microcolonies et une adhésion localisée (LA) qui détruit l'architecture des microvillosités et induit des lésions d'attachement-effacement caractéristiques. Suite à cette adhésion précoce, il y a translocation d'effecteurs par le système de sécrétion de type III et notamment du récepteur Tir (translocated intimin receptor) qui permettra une liaison intime via la protéine de membrane externe intimine. Ce processus fait intervenir des protéines dont les gènes sont portés par un PAI nommé LEE (locus of enterocyte effacement), et conduit à la perturbation du cytosquelette et à la formation d'un piédestal. Les **EPEC** induisent ainsi le déclenchement d'une réponse inflammatoire au niveau de la muqueuse colique accompagnée de diarrhées. Une étude récente montre que cette inflammation est le résultat de la combinaison entre des protéines pro et anti-inflammatoires (Sharma *et al.*, 2006). En effet, alors que des facteurs extracellulaires tels que les flagelles induisent la production de signaux proinflammatoires, des protéines effectrices, telle que EspB sécrétée par le système de sécrétion de type III, atténuent cette réponse. Le génome de la souche de référence E2348/69, de groupe phylogénétique B2, a été récemment séquencé (Iguchi *et al.*, 2009).

✦ **Les EHEC** sont responsables de symptômes pouvant aller de la diarrhée simple à une diarrhée sanglante et abondante. De plus, ces *E. coli* peuvent aussi induire un syndrome hémolytique et urémique (SHU) qui se manifeste entre autres par une anémie hémolytique, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë. Le principal réservoir est le tube digestif des bovins; la contamination humaine se fait par l'intermédiaire d'eau, de lait cru et d'aliments (viande mal cuite, hamburger) contaminés. Au Japon, en Amérique du Nord et en Europe les épidémies sont généralement dues au sérotype O157:H7. Les EHEC sont capables d'interagir avec les entérocytes *via* deux type de fimbriae : les ECP (*E. coli* common pilus) et les HCP (haemorrhagic *coli* pilus) (**Figure 31**). De plus, Les EHEC produisent des Shiga-like toxines (Stx ou vérotoxines) qui, par leurs interactions avec le récepteur Gb3 (globotriaosylceramide),



**Figure 32 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* enteroinvasifs et *Shigella* .**

*Shigella*/EIEC accèdent à la sous-muqueuse par les cellules microfold (M) et se multiplient en macrophages pour ensuite aller envahir l'épithélium par le pôle basolatéral. Ce procédé est orchestré par des effecteurs sécrétés par le système de sécrétion de type III. Une fois dans le cytoplasme, d'autres effecteurs sécrétés protègent les bactéries du système immunitaire de l'hôte et permettent la dissémination bactérienne de cellule à cellule. ARP2/3: actin-related protein 2/3; DOCK180: dedicator of cytokinesis protein 1; ELMO: engulfment and cell motility; IκBα: inhibitor of NF-κB subunit-α; IL-8: interleukin-8; ILK: integrin-linked kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; NF-κB: nuclear factor-κB; N-WASP: neural Wiskott–Aldrich syndrome protein; PtdIns(5)P: phosphatidylinositol-5-phosphate; PtdIns(4,5)P2: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; TJ: jonctions serrées (d'après Croxen et Finlay, 2010).



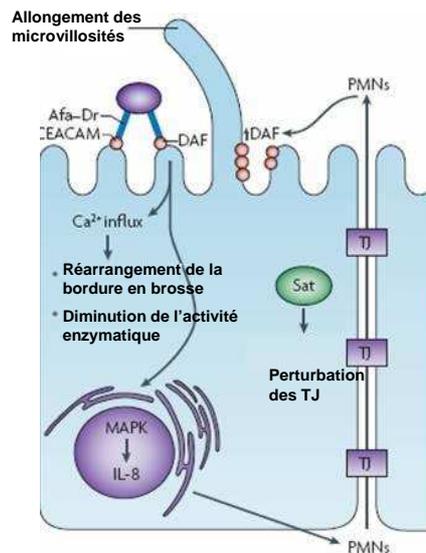
**Figure 33 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* enteroaggrégatifs.**

Les EAEC adhèrent aux entérocytes *via* les pili AAF (aggregative adherence fimbriae) en formant un biofilm et stimulant la sécrétion d'IL-8. Un plasmide code la toxine Pet qui est un autotransporteur sérine protéase des Enterobacteriaceae (SPATE) ciblant l'α-fodrin qui agit sur le cytosquelette et induit l'exfoliation cellulaire (d'après Croxen et Finlay, 2010).

induisent l'apoptose des cellules épithéliales intestinales. Les bactéries se disséminent dans l'organisme *via* la circulation sanguine. Certaines souches EHEC possèdent l'îlot de pathogénicité LEE et entraînent, comme les EPEC, la formation de lésions d'attachement-effacement. Les souches ne possédant pas ce PAI sont appelées **STEC** pour Shiga toxin-producing *E. coli* et n'induisent généralement pas d'infections chez l'homme. Il semblerait que les EPEC aient évolué en EHEC par l'acquisition d'un bactériophage contenant les gènes *stx*. Les génomes des souches de référence O157:H7 EDL933, O157:H7 str. Sakai, et O157:H7 str. EC4115, de groupe phylogénétique E, ont été séquencés (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001).

✦ **Les EIEC** ne sont différenciables des souches de *Shigella* que par des caractéristiques biochimiques car la physiopathologie associée aux infections à EIEC et à *unité* est très similaire. Ces souches sont responsables de syndromes dysentériques (forte fièvre, crampes abdominales, nausées et diarrhée aqueuse) qui évoluent rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus). Une fois internalisées, les bactéries lysent la membrane de la vacuole, se retrouvant alors libres dans le cytoplasme où elles peuvent se multiplier (**Figure 32**). Puis les bactéries induisent la polymérisation de l'actine cellulaire à un de leur pôle, permettant ainsi leur dissémination aux cellules adjacentes. Les gènes codant les facteurs de virulence à l'origine de ce mécanisme sont pour la plupart portés par un plasmide (220kb) qui code un système de sécrétion de type III. Il faut noter que ce mégaplasmide est composé en majorité d'IS permettant son évolution.

✦ **Les EAEC** sont responsables de diarrhées persistantes dans les pays industrialisés ou en voie de développement et de certaines diarrhées du voyageur. Ces souches sont définies comme ne sécrétant pas les entérotoxines LT ou ST et adhérant aux cellules intestinales en formant des structures « en amas de briques », on parle alors d'adhésion agrégative (**Figure 33**). L'adhésion bactérie-cellule et bactérie-bactérie est permise par des fimbriae appelés AAF (Aggregative adherence fimbriae) responsables de la formation d'un biofilm et codés par un plasmide. Cependant, les souches EAEC ne présentent pas toutes ce type de fimbriae et ce sont alors d'autres structures qui favorisent leur adhésion telles que la dispersine et la flagelline. Il faut noter que certaines souches d'EAEC produisent des entérotoxines (EAST1) et/ou des cytotoxines (Pet, SPATE) ainsi que d'autres facteurs de virulence dont la fonction reste inconnue.



**Figure 34 : Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* à adhésion diffuse.**

Les DAEC adhèrent de façon diffuse aux entérocytes *via* les adhésines de type Afa/Dr. Une majorité des adhésines Afa/Dr se lie au récepteur DAF (decay-accelerating factor) et une minorité aux récepteurs de type CEACAM (carcinoembryontigen- related cell-adhesion molecule). La toxine Sat est impliquée dans les lésions au niveau des jonctions serrées (TJ) augmentant ainsi la perméabilité de la barrière intestinale. L'infiltration de PMN (Polymorphonuclear leukocyte) augmente la localisation des DAF à la surface cellulaire (d'après Croxen et Finlay, 2010).

✦ **Les DAEC** sont associés à des diarrhées aiguës et persistantes chez les enfants dans les pays développés ou en voie de développement et à des infections du tractus urinaire (UTI). Ce groupe est très hétérogène et comprend des souches des quatre groupe phylogénétiques majeurs : A, B1, B2 et D (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Les DAEC adhèrent aux cellules épithéliales HEp-2 et HeLa de façon uniforme (adhésion diffuse). Cette capacité est due à l'expression d'adhésines codées par les opérons *afa/dra/daa*. Ces adhésines peuvent être fimbriales (Dr et F1845) ou non-fimbriales (Afa) et sont toutes de la famille Afa/Dr (Pour revue (Servin, 2005) (**Figure 34**). Toutes les adhésines Afa/Dr interagissent avec les cellules épithéliales intestinales ou urinaires *via* le récepteur DAF (decay-accelerating factor) qui s'accumule sous les bactéries adhérentes. De plus, il y a une modulation de la voie de signalisation dépendante du  $Ca^{2+}$  qui induit l'élongation ainsi que l'altération des microvillosités de la bordure en brosse. Il faut noter que les DAEC possédant ou non des adhésines Afa/Dr stimulent la production d'IL-8 (Arikawa *et al.*, 2005; Meraz *et al.*, 2006) de façon dépendante de la présence des flagelles (Arikawa *et al.*, 2005). Cette augmentation d'IL-8 entraîne la transmigration des polynucléaires neutrophiles (PMN) qui permet une surexpression des récepteurs DAF, améliorant ainsi l'adhérence bactérienne (Betis *et al.*, 2003).

Une sous-classe d'adhésine Afa/Dr interagit avec les récepteurs de type CEACAM (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) qui s'accumulent alors sous les bactéries adhérentes, induisant l'effacement des microvillosités. Une telle déstabilisation de la barrière en brosse peut accroître le phénomène de diarrhées chez les patients.

Le pouvoir pathogène des DAEC ne peut pas être exclusivement expliqué par le rôle des adhésines Afa/Dr. D'autres facteurs de virulence ont été recherchés, et outre les flagelles, l'autotransporteur Sat a été identifié. En effet, cette toxine peut détruire les jonctions serrées et augmenter la perméabilité au niveau épithélial (Guignot *et al.*, 2007).

(Pour revue (Le Bouguenec and Servin, 2006)

✦ **Les AIEC**, pour adherent invasive *E. coli*, ont été mis en évidence sur la base des caractéristiques pathogéniques des souches de *E. coli* associées à la MC (Boudeau *et al.*, 1999) (Voir paragraphe II.2.). Les recherches par amplification génique et par hybridation moléculaire de différents déterminants génétiques d'adhésion connus chez les *E. coli* responsables d'infections intestinales ont montré que 73% des souches AIEC ne possèdent



aucun des facteurs d'adhésion et d'invasion déjà décrits (Boudeau *et al.*, 1999; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998).

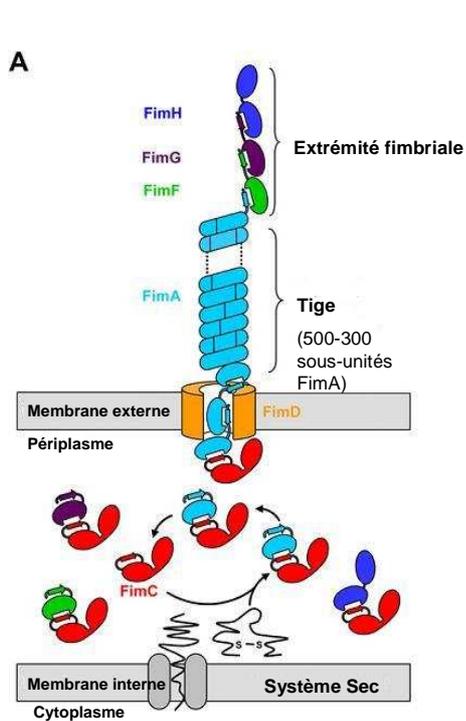
### **III.3. Propriétés des AIEC**

#### **3.1. Clonalité des AIEC**

L'ensemble des souches de *E. coli* isolées chez des patients atteints de MC, soit au niveau de lésions chroniques, soit au niveau de lésions aiguës, ou chez des patients contrôles, a été comparé par ribotypage (Masseret *et al.*, 2001). Le dendrogramme établi à partir de ces analyses montre clairement un large ensemble de souches possédant un lien génétique et isolées principalement chez des patients atteints de MC (lésions chroniques ou aiguës) par rapport aux contrôles. Néanmoins, certaines souches de *E. coli* isolées chez des patients atteints de MC apparaissent éloignées génétiquement. L'ensemble de ces résultats montre clairement qu'on ne retrouve pas de souche unique chez les patients atteints de MC, mais que quelques génotypes particuliers sont plus fréquemment associés aux lésions iléales de MC (Baumgart *et al.*, 2007; Masseret, 2001). Plus récemment, il a été montré par l'analyse du polymorphisme de la longueur intergénique entre les gènes *16S* et *23S* (Ribosomal intergenic spacer analysis, RISA) que les entérobactéries sont plus abondantes dans des biopsies de patients atteints d'une maladie inflammatoire intestinale que chez les contrôles et notamment sont retrouvées des bactéries *E. coli* appartenant aux groupes phylogénétiques B2 et D. Ces groupes sont caractérisés par la présence d'autotransporteurs de type sérine-kinase et de facteurs d'adhésion, et la plupart des bactéries de ces groupes ont un rôle dans l'étiologie de plusieurs maladies (Kotlowski *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 2009). Dans les sections suivantes nous allons nous intéresser aux différents facteurs de virulence impliqués dans les capacités d'invasion, de survie en macrophages et d'inflammation intestinale de la souche AIEC de référence LF82.

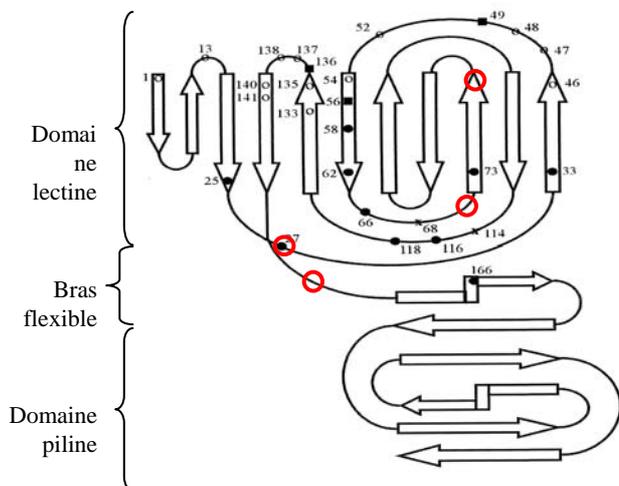
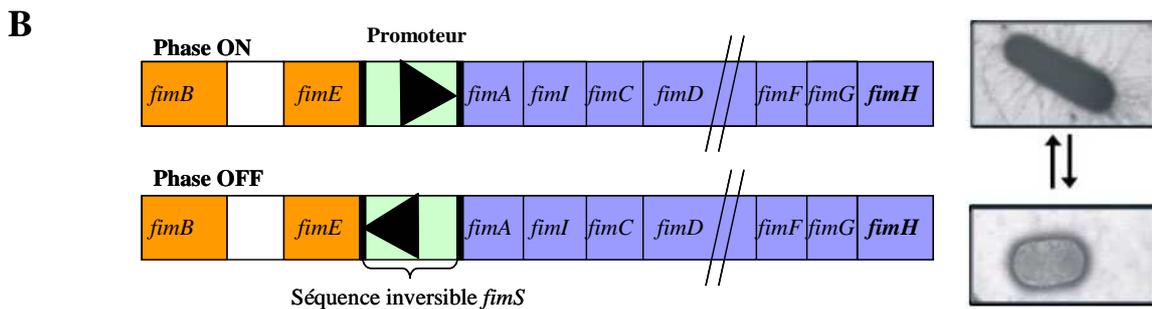
#### **3.2. Pouvoir d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales**

Etant donnée l'absence de déterminants génétiques d'invasion connus ou génétiquement similaires à ceux de souches invasives de *E. coli*, une stratégie de recherche des déterminants génétiques impliqués dans le pouvoir d'invasion de la souche AIEC de référence LF82 a été réalisée par mutagenèse aléatoire par insertion du transposon *Tn5phoA*. Le criblage de la banque de mutants d'insertion *Tn5phoA* en cellules épithéliales intestinales Intestine-407 a



**Figure 35 : Modèle d'assemblage des pili de type 1 à la surface des bactéries à Gram négatif et organisation de l'opéron *fim*.**

**A.** L'assemblage du pilus est fait par la protéine chaperonne périplasmique FimC qui assure le transport des sous-unités fimbriales jusqu'au site d'assemblage du pilus. La protéine FimD qui assure l'ancrage des pili à la surface des bactéries est enchâssée dans la membrane externe (ME). L'assemblage est initié par la fixation du complexe FimC-FimH (adhésine) aux protéines FimD formant un pore. Le complexe FimC-FimG (protéine structurale) se lie au complexe FimC-FimH-FimD et permet l'expulsion de la protéine FimH à l'extérieur du pore. La protéine FimF (protéine structurale) ainsi que plusieurs protéines FimA (sous-unité majeure de la structure fimbriale) sont ensuite ajoutées (d'après Puorger *et al.*, 2008). **B.** Les gènes codant les deux recombinases responsables de l'inversion de l'élément *fimS* sont représentés en orange. Les gènes codant les protéines structurales du pilus sont représentés en bleu.



**Figure 36 : Structure de la sous-unité FimH, adhésine des pili de type 1.**

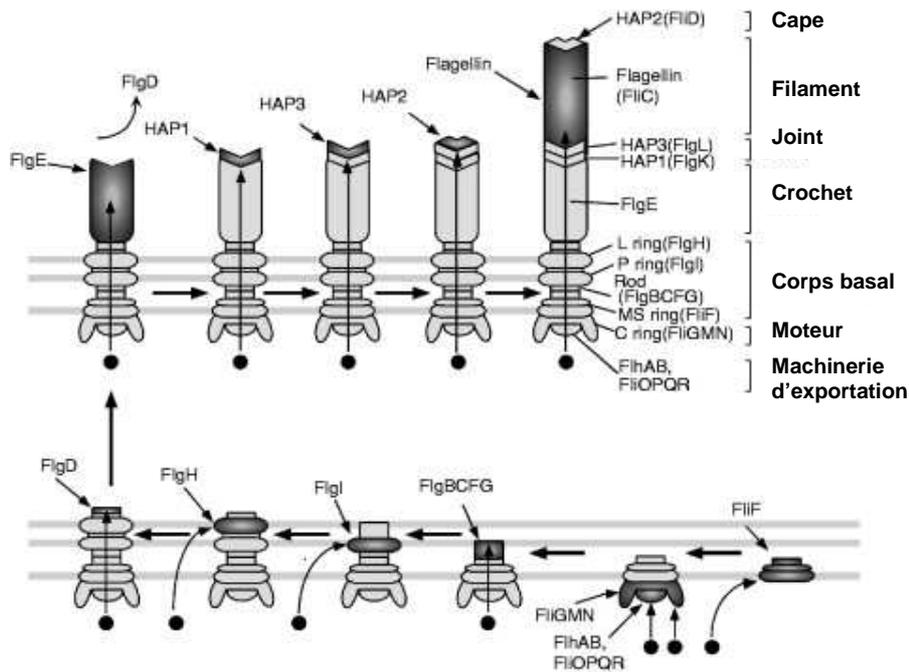
Cette sous-unité est constituée d'un domaine piline, qui permet l'ancrage dans le pilus, un domaine lectine, responsable de la reconnaissance des résidus mannose et un bras flexible qui relie les deux domaines (d'après Schembri *et al.*, 2000). En rouge sont signalées les mutations présentes chez la souche AIEC LF82 : V27A, N70S, S78N et T158P.

permis d'identifier les pili de type 1, les flagelles, la lipoprotéine NlpI, la protéine de membrane externe YfgL et les protéines de membranes externes OmpA et OmpC comme jouant un rôle dans la capacité de la souche AIEC LF82 à adhérer et à envahir les cellules épithéliales intestinales.

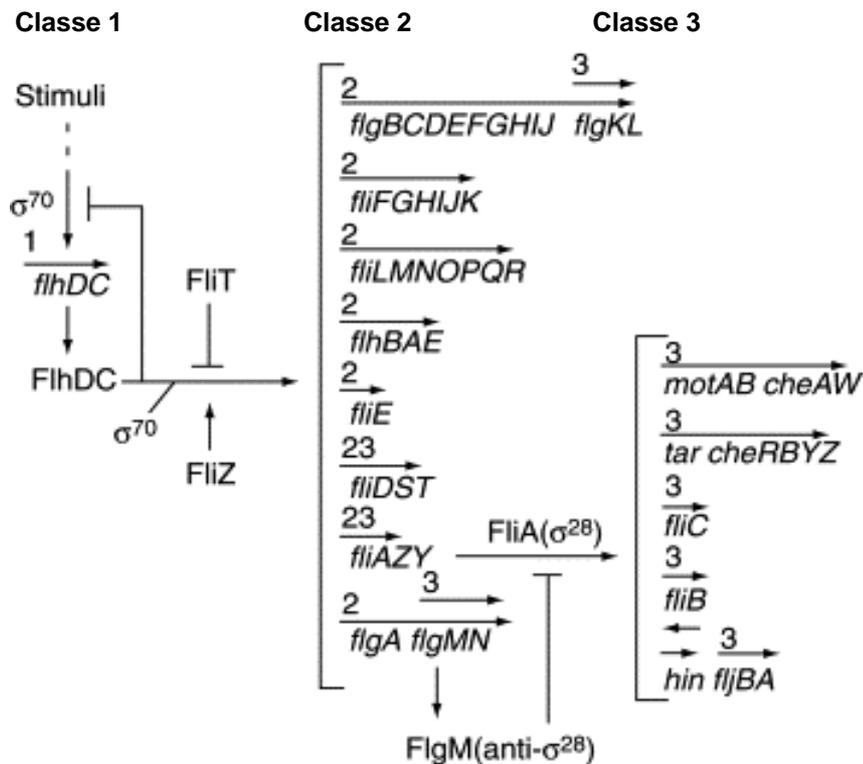
✦ Les **pili de type 1** sont synthétisés par la majorité des *Enterobacteriaceae* et leur expression est contrôlée par un mécanisme de variation de phase alternant entre un état d'expression (phase piliée ON) et de non-expression (phase non-piliée OFF) (**Figure 35**). Cette variation de phase dépend de l'inversion d'une séquence nucléotidique de 314 pb (séquence inversible *fimS*) par recombinaison site-spécifique entre deux séquences répétées inversées de 9 pb, nommées IRL (« Inverted Repeat Left ») et IRR (« Inverted Repeat Right ») (Eisenstein, 1981). L'inversion est catalysée par des recombinases codées par les gènes *fimB* et *fimE* localisés en amont de l'opéron *fim*. FimB peut provoquer indifféremment l'inversion dans le sens « on-off » ou « off-on », alors que FimE n'agit sur l'inversion que dans le sens « on-off » (McClain *et al.*, 1991).

Les pili de type 1 sont impliqués dans la pathogénicité bactérienne par leur rôle dans l'adhésion à différents types de cellules eucaryotes *via* la reconnaissance de résidus mannosides (Giampapa *et al.*, 1988; Ofek *et al.*, 1977; Sokurenko *et al.*, 1994; Tewari *et al.*, 1993; Wold *et al.*, 1990) et par leur implication dans l'invasion de souches de *E. coli* uropathogènes ou de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (Baumler *et al.*, 1994; Bower *et al.*, 2005; Horiuchi *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 2000; Mulvey *et al.*, 1998). Les pili de type 1 jouent un rôle clé dans l'invasion des cellules épithéliales par la souche AIEC LF82 en induisant la formation d'élongations membranaires à la surface des cellules cibles contribuant à leur internalisation (Boudeau *et al.*, 2001). De plus, la souche AIEC de référence LF82 exprime des pili de type 1 variants comparativement à une souche de *E. coli* K-12 non pathogène (**Figure 36**). Des expériences d'interaction entre bactéries AIEC et entérocytes isolés de patients atteints de MC ont montré que ces bactéries ont une capacité d'adhésion à la bordure en brosse augmentée lorsque les souches expriment des pili de type 1 variants par rapport à des souches exprimant des pili de type 1 de type K-12 (Barnich *et al.*, 2007). Cependant, les pili de type 1 de la souche LF82 exprimés par une souche de *E. coli* de laboratoire non invasive ne lui confèrent pas de propriétés d'invasion, indiquant que les pili de type 1 sont nécessaires mais pas suffisants pour finaliser l'internalisation bactérienne (Boudeau *et al.*, 2001).

A



B



**Figure 37 : Modèle d'assemblage des flagelles à la surface des bactéries à Gram négatif et régulation de la voie flagellaire.**

**A.** Représentation schématique de la biogenèse des flagelles. **B.** Schéma représentant les trois niveaux de régulation de la transcription du régulon flagellaire. Les opérons flagellaires sont indiqués par des flèches. Les chiffres sur les flèches indiquent la classe de hiérarchie transcriptionnelle dans le régulon (d'après Terashima *et al.*, 2008).

✦ Les **flagelles**, synthétisés par un grand nombre d'espèces bactériennes (**Figure 37**), sont responsables de la mobilité des bactéries qui les synthétisent, permettant à ces dernières de se mouvoir dans un liquide et de changer de direction. Les gènes composant le système flagellaire sont répartis en trois classes (I, II et III) de hiérarchie transcriptionnelle (**Figure 37**). La classe I est composée d'un seul opéron *flhDC*, codant les protéines FlhD et FlhC. Ces protéines s'assemblent en un hétéro-tétramère FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, régulateur transcriptionnel essentiel à la synthèse de toutes les protéines du système flagellaire (Liu and Matsumura, 1994). Il active l'expression des gènes de classe II codant les protéines du corps basal et les protéines du système de sécrétion du corps flagellaire. Cette classe de gènes comprend également l'opéron *fliAZY*, codant la protéine FliA, sous-unité  $\sigma_{28}$  de l'ARN polymérase, qui régule positivement l'expression des gènes de classe III (Aldridge and Hughes, 2002). La classe III est composée des gènes codant les protéines du filament dont la flagelline FliC. Cette classe comprend également les gènes impliqués dans la construction du moteur flagellaire, dans le chimiotactisme et l'opéron *flgMN*. Ce dernier code en particulier la protéine FlgM qui est un facteur anti- $\sigma_{28}$  et exerce un rétrocontrôle négatif sur l'expression des gènes de classe III évitant la production anarchique des protéines (Aldridge and Hughes, 2002).

Les flagelles sont également impliqués dans la virulence de certaines bactéries pathogènes. En effet, la mobilité conférée par les flagelles est indispensable au pouvoir invasif de certains micro-organismes, tels que les *E. coli* entéro-pathogènes (Giron *et al.*, 2002), *Salmonella* sérovars Typhimurium et Enteritidis (Dibb-Fuller *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2001), *Campylobacter jejuni* (Yao *et al.*, 1994) ou *Vibrio anguillarum* (Ormonde *et al.*, 2000). Cependant, le rôle des flagelles dans l'invasion n'est pas toujours restreint à la mobilité qu'ils confèrent aux bactéries. En effet, une étape de centrifugation, permettant d'établir un contact étroit entre la bactérie et les cellules épithéliales, ne permet pas à un mutant non flagellé de *Pseudomonas aeruginosa* de pénétrer dans les cellules épithéliales en culture (Fleiszig *et al.*, 2001). Les flagelles peuvent également jouer le rôle d'appareil de sécrétion de type III comme cela a pu être montré chez *Yersinia spp.* pour la sécrétion de la phospholipase YlpA (Young and Young, 2002; Young *et al.*, 1999).

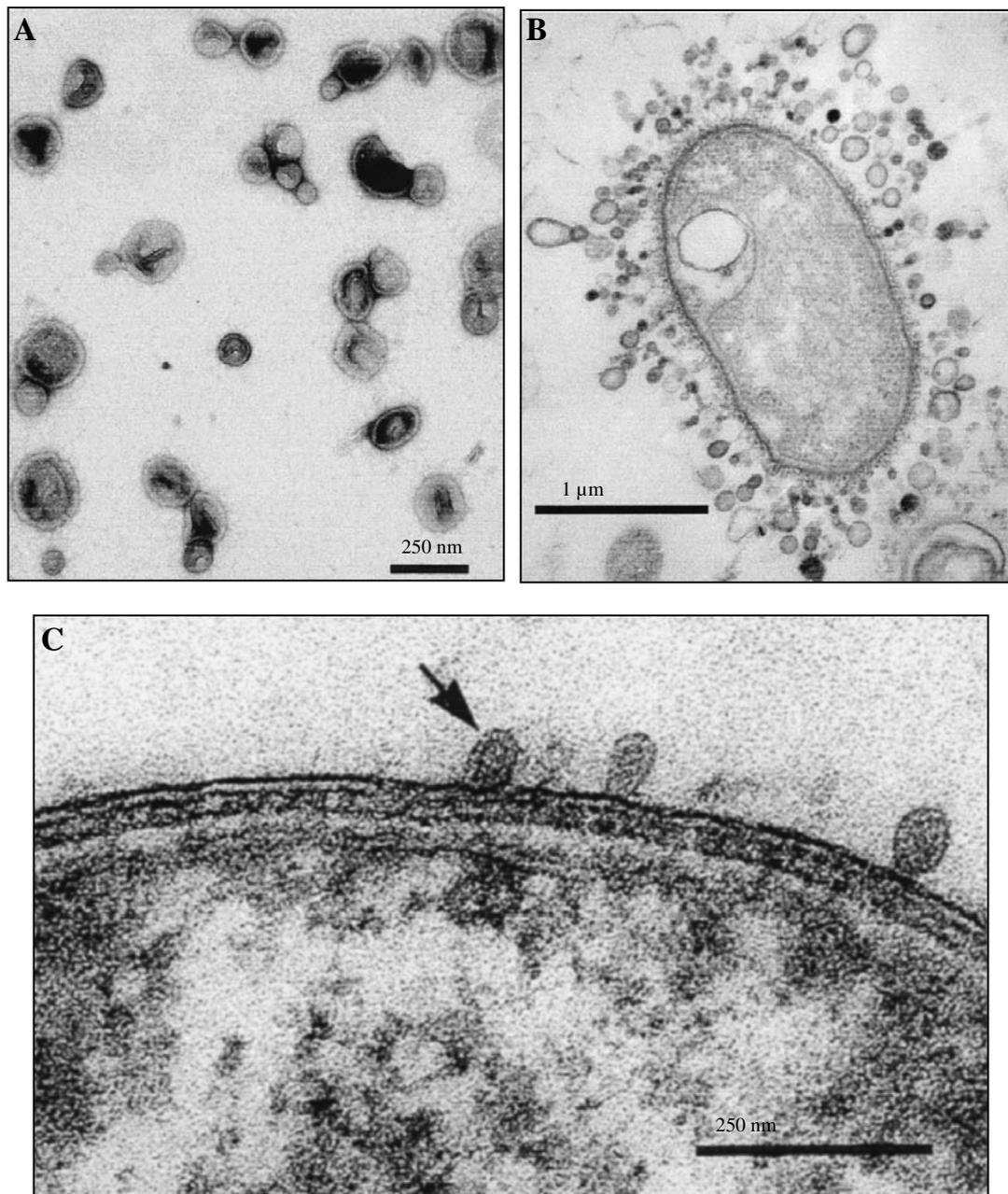
Chez la souche AIEC LF82, il a été montré qu'un mutant isogénique LF82 délété du gène *fliC* codant la flagelline FliC n'est plus capable d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales en culture (Barnich *et al.*, 2003). D'autre part, ce mutant ne synthétise plus de pili de type 1. L'absence de production de pili de type 1 par le mutant LF82- $\Delta$ *fliC* est consécutive à l'orientation préférentielle en phase OFF de la séquence *fimS* (**Figure 35**). Ceci est la première description d'une co-régulation de la synthèse des pili de type 1 et des flagelles. Une



expression induite des pili de type 1 chez le mutant isogénique LF82- $\Delta fliC$  par transformation de ce mutant avec un plasmide recombinant codant l'opéron *fim* ne restaure pas totalement les niveaux d'adhésion et d'invasion. Une étape de centrifugation permet de restaurer totalement l'adhésion, mais pas l'invasion, du mutant isogénique délété du gène *fliC* chez lequel une expression de pili de type 1 a été induite. L'absence de mobilité ne permet donc pas d'expliquer à elle seule la diminution du pouvoir d'invasion observée. Les flagelles joueraient donc un rôle par eux-mêmes chez la souche AIEC LF82 dans le processus d'invasion, soit directement comme appareil de sécrétion pour des facteurs de virulence intervenant dans l'invasion, comme déjà rapporté chez *Campylobacter spp.* (Guerry, 2007), soit indirectement en contrôlant l'expression de facteurs de virulence autres que les pili de type 1.

✦ La **lipoprotéine NlpI** joue un rôle important dans la virulence de la souche AIEC LF82. En effet, un mutant isogénique LF82- $\Delta nlpI$  présente des niveaux d'adhésion et d'invasion significativement diminués en cellules épithéliales Intestine-407 comparativement à ceux de la souche sauvage LF82 (Barnich *et al.*, 2004). Ce mutant n'est plus flagellé et ne synthétise qu'un faible taux de pili de type 1 suite à une orientation en phase OFF de la séquence inversible *fimS* localisée en amont de l'opéron *fim*. Une diminution du taux de transcrits correspondant aux gènes *fimB* et *fimE*, codant les recombinases FimB et FimE responsables de l'orientation de la séquence inversible *fimS*, a été observée chez le mutant isogénique LF82- $\Delta nlpI$ . L'absence de flagelles est corrélée à une très forte diminution du taux d'ARNm *fliC*. Une expression induite des pili de type 1 et un contact forcé entre les bactéries et les cellules épithéliales intestinales ne restaurent pas la capacité du mutant isogénique LF82- $\Delta nlpI$  à adhérer et à envahir les cellules épithéliales, démontrant que le rôle joué par NlpI dans la virulence des AIEC est indépendant des pili de type 1 et de la mobilité conférée par les flagelles.

Plus de 130 lipoprotéines ont été identifiées chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Wu *et al.*, 1996). Ces structures sont ancrées aux membranes par un groupement N-acyl-diacylglycérilcystéine localisé à l'extrémité N-terminale de la partie protéique. Les lipoprotéines peuvent jouer un rôle direct d'adhésine ou un rôle indirect sur l'adhésion et l'invasion de cellules en culture par régulation de l'expression de facteurs de virulence ou par interférence avec la sécrétion ou l'assemblage de structures particulières. Par exemple, chez *Campylobacter jejuni*, la lipoprotéine JlpA intervient dans l'adhésion aux cellules épithéliales HEp-2, et chez *Streptococcus pyogenes* la lipoprotéine Lsp est impliquée dans l'adhésion et



**Figure 38 : Vésicules de membrane externe.**

**A.** Clichés de microscopie électronique à transmission de vésicules de membranes externes (OMV) purifiées de surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* et colorées négativement. **B.** Coupe fine d'une bactérie à Gram négatif isolée au sein d'un biofilm de rivière, non identifiée et produisant des quantités importantes d'OMV. **C.** Coupe fine de *P. aeruginosa* montrant le bourgeonnement de la ME précédant la libération d'OMV dans le milieu extracellulaire (d'après Beveridge, 1999).

l'invasion des cellules épithéliales pulmonaires (Elsner *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2001). Chez *unité flexneri*, le système de sécrétion de type III Mxi-Spa lui permettant d'injecter dans le cytoplasme de la cellule hôte des protéines effectrices impliquées dans le processus d'invasion ne fonctionne qu'en présence des lipoprotéines MxiM et MxiJ. En effet, ces deux lipoprotéines interagissent et stabilisent MxiD au niveau de la membrane externe, permettant ainsi la formation de la base de la seringue moléculaire et la sécrétion de protéines effectrices (Schuch and Maurelli, 1999, 2001).

✦ La production par les bactéries à Gram négatif de **vésicules de membrane externe** (OMV, pour Outer Membrane Vesicles) a été observée dans les années 1960. Cependant, leurs mécanismes de formation et leurs rôles biologiques sont mal connus. Les OMV sont produites par de très nombreuses bactéries à Gram négatif pathogènes ou non, entre autres *E. coli* (Gankema *et al.*, 1980; Hoekstra *et al.*, 1976), *unité spp.* (Dutta *et al.*, 2004; Kadurugamuwa and Beveridge, 1999), *Bacteroides spp.* (dont *Porphyromonas*) (Grenier and Mayrand, 1987; Zhou *et al.*, 1998) ou *Helicobacter pylori* (Fiocca *et al.*, 1999). La formation d'OMV est un processus ubiquiste des bactéries à Gram négatif, observé dans différentes conditions de culture (pour revue, (Beveridge, 1999)), notamment lorsque les bactéries sont organisées en biofilms (Schooling and Beveridge, 2006). Ces vésicules résultent d'un bourgeonnement de la membrane externe (ME) à la surface des bactéries et sont donc constituées de LPS, de protéines de ME et des phospholipides (**Figure 38**). De plus, des protéines périplasmiques peuvent être emprisonnées dans ces vésicules lors de leur formation, de manière passive mais aussi active (Kato *et al.*, 2002; Wai *et al.*, 2003; Wensink and Witholt, 1981). D'une façon générale, les vésicules constituent un moyen pour les bactéries d'interagir avec des cellules eucaryotes ou d'autres cellules procaryotes. Elles peuvent véhiculer des adhésines, des toxines, et des composés immunomodulateurs qui peuvent favoriser l'adhésion, causer la cytotoxicité et/ou moduler les réponses immunes de l'hôte (pour revue, (Kuehn and Kesty, 2005)).

L'étude de la production d'OMV chez la souche AIEC LF82 a montré pour la première fois l'implication de ces OMV dans un processus d'invasion de cellules hôtes par des bactéries pathogènes (Rolhion *et al.*, 2005). Comme la plupart des bactéries pathogènes (Horstman and Kuehn, 2002; Wai *et al.*, 1995), la souche AIEC LF82 produit des quantités plus importantes d'OMV qu'une souche de *E. coli* K-12 non pathogène. De plus, la délétion du gène codant la protéine de membrane externe YfgL entraîne une incapacité de la bactérie AIEC LF82 à produire des OMV. Cette lipoprotéine YfgL régule positivement des



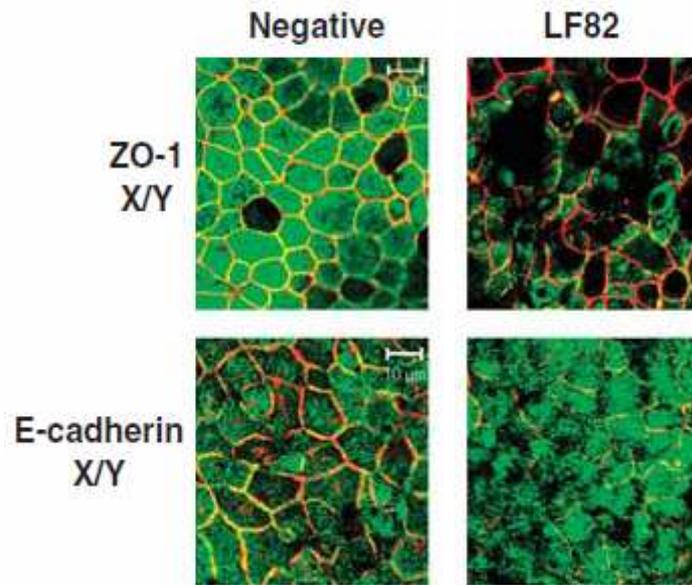
transglycosylases lytiques et serait donc impliquée dans le renouvellement du peptidoglycane de la paroi. Ainsi, en l'absence du produit du gène *yfgL*, l'activité des transglycosylases serait diminuée, entraînant une diminution de l'accumulation des produits de dégradation du peptidoglycane dans le périplasma, une diminution de la pression de turgescence exercée sur la membrane externe par ces produits de dégradation, et donc une diminution de la libération d'OMV. Cette délétion entraîne aussi une perte du pouvoir d'invasion du mutant. De manière intéressante, le pouvoir d'invasion d'un tel mutant est restauré lorsque les cellules hôtes sont prétraitées par des vésicules de la souche sauvage. Ainsi, les OMV de la souche AIEC LF82 représenteraient un système de transport permettant de délivrer à la cellule hôte des effecteurs bactériens impliqués dans les réarrangements du cytosquelette cellulaire et favorisant l'internalisation des bactéries (Rolhion *et al.*, 2005).

### 3.3. Capacité de survie en macrophages

Le criblage de la banque de mutants d'insertion Tn5*phoA* en macrophages murins J774-A1 a permis d'identifier le rôle de la protéine de stress HtrA dans la réplication de la souche AIEC LF82 en macrophages (Bringer *et al.*, 2005) et de la thioredoxine périplasmique DsbA dans le processus de survie de la souche AIEC LF82 en macrophages (Bringer *et al.*, 2007).

✦ La délétion du gène *htrA*, codant la **protéine de stress HtrA**, chez la souche AIEC LF82 induit une augmentation de la sensibilité des bactéries vis-à-vis d'un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène (Bringer *et al.*, 2005). De plus, la croissance du mutant isogénique LF82- $\Delta$ *htrA* est significativement diminuée dans un milieu reproduisant en partie le contenu d'une vacuole de phagocytose de par un pH acide (pH 5,5) et un appauvrissement en nutriments. Une forte activation transcriptionnelle de *htrA* est observée lorsque les bactéries sont cultivées en milieu acide et pauvre en nutriments, mais également lorsque les bactéries sont internalisées dans les macrophages. Ainsi certaines conditions environnementales rencontrées chez l'hôte augmentent l'expression de *htrA* et conduisent à une augmentation de la virulence des AIEC.

✦ La délétion du gène *dsbA*, codant la **thioredoxine périplasmique DsbA**, chez la souche AIEC LF82 conduit à l'absence de synthèse de flagelles et de pili de type 1 fonctionnels à la surface de la bactérie (Bringer *et al.*, 2007). Il est donc probable que cette protéine soit indispensable à la maturation de protéines flagellaires (Dailey and Berg, 1993).



**Figure 39 : Déstabilisation des jonctions serrées de cellules Caco-2 par la souche AIEC LF82.**

Observation en microscopie confocale d'une monocouche de cellules Caco-2 cultivées sur un support membranaire et infectées ou non pendant 4h par la souche AIEC LF82. Les protéines des jonctions serrées sont marquées en rouge (ZO-1 ou E-cadherin) et la F-actine en vert (d'après Sasaki *et al.*, 2007).

L'absence des pili de type 1 chez le mutant LF82- $\Delta dsbA$  n'est pas dû à un défaut de maturation de sous-unités constituant les pili de type 1, mais à la co-régulation entre les pili de type 1 et les flagelles. Enfin, la protéine DsbA joue un rôle indispensable dans le processus de survie et multiplication en macrophages, probablement *via* la maturation de facteur(s) de virulence qui reste(nt) à identifier.

### **3.4. Induction et amplification de l'inflammation intestinale par les AIEC**

De nombreux exemples dans la littérature montrent l'implication de bactéries pathogènes dans la réponse inflammatoire de l'hôte. Les AIEC sont capables de déstabiliser l'épithélium intestinal et d'amplifier un état inflammatoire induit. Cependant, en modèle murin, l'expression du récepteur CEACAM6 est requise pour la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC et l'induction d'une inflammation.

#### **3.4.1. Déstabilisation de l'épithélium intestinal par les AIEC**

La déstabilisation de l'épithélium intestinal permet aux pathogènes d'accéder plus facilement aux ganglions mésentériques localisés sous l'épithélium, entraînant ainsi une dissémination dans les organes profonds de l'hôte (foie et rate) *via* le système lymphatique et la circulation générale.

Les AIEC associés à la MC sont capables de survivre et de se multiplier en macrophages J774-A1 en induisant une forte sécrétion de TNF- $\alpha$  (Glasser *et al.*, 2001). Il a de plus été montré que le taux de TNF- $\alpha$  sécrété est directement proportionnel à la multiplication des AIEC dans un phagolysosome mature (Bringer *et al.*, 2006). De plus, des cellules épithéliales intestinales en culture infectées par des AIEC sécrètent un fort taux d'IL-8 et de CCL20 (Eaves-Pyles *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007). Ces résultats sont en corrélation avec la migration de polynucléaires neutrophiles ou de cellules dendritiques dans des modèles de co-culture (Eaves-Pyles *et al.*, 2007). De manière intéressante, les souches AIEC isolées au niveau de lésions inflammatoires chez les patients atteints de MC induisent une plus faible sécrétion d'IL-8 que les souches isolées au niveau de zones saines, suggérant que les AIEC exprimeraient un facteur protéique capable de limiter la sécrétion d'IL-8 dans le but de limiter l'inflammation comme ce qui a déjà été décrit pour *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.* et *unités flexneri* (Arbibe *et al.*, 2007; Collier-Hyams *et al.*, 2002; Foligne *et al.*, 2007; Haraga and Miller, 2003; Zhou *et al.*, 2004). Enfin, il a été récemment rapporté que l'infection par des AIEC de cellules épithéliales intestinales différenciées induit une déstabilisation des jonctions serrées visualisée par la redistribution de la protéine ZO-1 et/ou de la E-cadhérine (**Figure 39**)



(Sasaki *et al.*, 2007; Wine *et al.*, 2009). De ce fait, les AIEC ont la capacité d'induire une rupture de la barrière intestinale et une transmigration de neutrophiles et de cellules dendritiques.

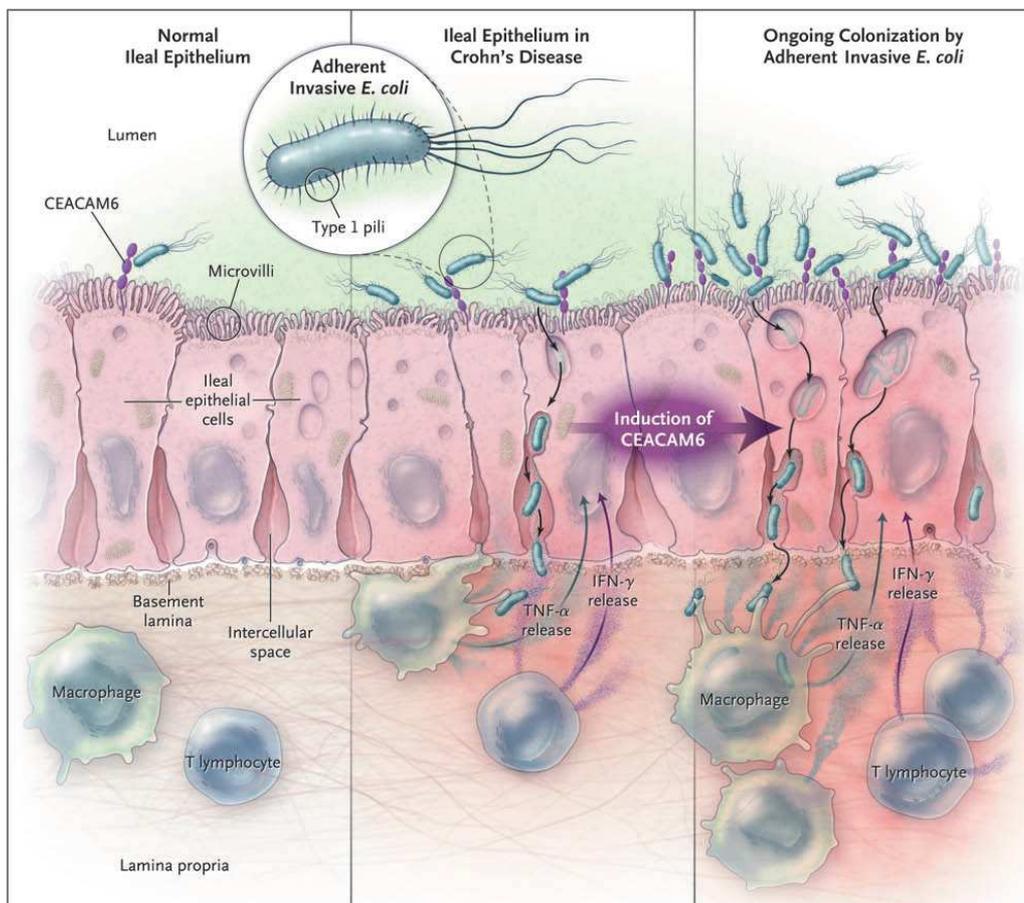
### **3.4.2. Amplification d'un état inflammatoire induit en modèle murin**

L'administration de bactéries AIEC de référence LF82 par gavage quotidien dans les modèles murins Balb/cJ et C57/BL6 n'induit aucun signe reflétant un état inflammatoire anormal (Carvalho *et al.*, 2008). Ainsi, les bactéries AIEC ne seraient pas pathogènes chez la souris comme peut l'être *Citrobacter rodentium* responsable de diarrhées (Borenshtein *et al.*, 2007; Mundy *et al.*, 2005).

Il est possible d'induire une colite expérimentale chez la souris en administrant des produits chimiques tels que le sulfate de dextran sodique (DSS : Dextran sulfate sodium). (Boirivant *et al.*, 1998). Le gavage quotidien de souris avec des bactéries AIEC de référence LF82 aggrave les symptômes cliniques de la colite modérée induite au DSS, en induisant l'apparition de selles diarrhéiques souvent sanglantes, et entraînant, pour les atteintes les plus graves, la mort (Carvalho *et al.*, 2008). Au niveau histologique, cette inflammation est caractérisée par l'apparition de larges plaques d'érosion et une augmentation de l'infiltration de neutrophiles. Par contre, aucune aggravation de la colite n'a été observée suite à l'administration de bactéries non pathogènes *E. coli* K-12. La flagelline, constituant majeur du flagelle, est un important antigène dans la MC (Lodes *et al.*, 2004). Les souris infectées par le mutant isogénique aflagellé AIEC LF82- $\Delta$ *fliC* ne montrent pas d'aggravation de l'inflammation par rapport à des souris non infectées (Carvalho *et al.*, 2008). La détection de flagelline par les récepteurs de l'immunité innée induit la production de cytokines proinflammatoires. En accord avec l'augmentation observée des niveaux d'ARNm *ipaf* et *tlr-5*, codant les récepteurs TLR-5 et IPAF, deux composants du système immunitaire inné capables de détecter la présence de flagelline, l'analyse du profil cytokinique a montré une augmentation des niveaux d'ARNm codant les cytokines IL-1 $\beta$  et IL-6 au niveau colique chez les souris traitées au DSS et infectées par la souche AIEC LF82 (Carvalho *et al.*, 2008).

### **3.4.3. Induction d'inflammation suite à une colonisation de la muqueuse intestinale via le récepteur CEACAM6**

Les souches AIEC isolées de patients atteints de MC adhèrent préférentiellement à la bordure en brosse d'entérocytes iléaux isolés de patients atteints de MC, mais pas à celle d'entérocytes provenant de sujets contrôles (Barnich *et al.*, 2007). L'utilisation de la lectine



**Figure 40 : Représentation schématique montrant l'implication des bactéries AIEC dans la MC.**

Les bactéries AIEC sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales exprimant le récepteur CEACAM6 *via* les pili de type 1 variants, d'envahir ces cellules leur permettant ainsi de traverser l'épithélium intestinal afin d'envahir les cellules immunitaires sous-jacentes entraînant de fortes sécrétions de TNF- $\alpha$  par les macrophages infectés. Chez les patients atteints de MC, il existerait une boucle de colonisation-inflammation car les bactéries AIEC seules, mais également les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  sont capables d'induire une expression de CEACAM6 au niveau des cellules épithéliales intestinales (Abraham et Cho, 2007).

concanavaline A (ConA), capable de lier les résidus mannoses, a révélé une forte expression de molécule(s) mannosylée(s) au niveau des entérocytes iléaux des patients atteints de MC et pas des entérocytes de sujets contrôles. Ainsi, l'expression de récepteur(s) glycosylé(s) connu(s) pour lier les pili de type 1 a été recherchée au niveau des cellules épithéliales intestinales des patients atteints de MC et des contrôles. Les résultats ont montré une surexpression des protéines CEACAM5 et CEACAM6, molécules riches en résidus mannoses, au niveau de la muqueuse iléale de patients atteints de MC, à la fois en zone ulcérée et en zone saine. Des expériences d'inhibition d'adhésion aux entérocytes isolés en présence d'anticorps monoclonaux dirigés contre chacun de ces deux récepteurs ont montré que la protéine CEACAM5 n'interviendrait pas dans l'adhésion des AIEC aux entérocytes, alors que l'expression apicale de la protéine CEACAM6 permet aux bactéries AIEC LF82 de se lier à la bordure en brosse d'entérocytes iléaux de patients atteints de MC (Barnich *et al.*, 2007). Une expression très augmentée de CEACAM6 au niveau iléal a été observée par immunohistochimie chez 35% des patients atteints de MC. Ainsi, une surexpression iléale de CEACAM6 pourrait expliquer chez les patients atteints de MC : (i) l'augmentation spécifique de CEACAM6 observée dans le sérum (Grunert *et al.*, 1995), et (ii) la colonisation iléale anormalement élevée par des bactéries AIEC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998).

Par ailleurs, il a récemment été montré que l'infection de souris transgéniques exprimant le récepteur CEACAM6 humain par des bactéries AIEC entraîne une colonisation intestinale et une induction d'inflammation. Ceci n'est pas observé lorsque les souris transgéniques exprimant le récepteur CEACAM6 humain sont infectées par *E. coli* non pathogène ou un mutant AIEC n'exprimant plus de pili de type 1 (Carvalho *et al.*, 2009). Toutes ces données permettraient donc de définir le récepteur CEACAM6 comme étant un nouveau facteur de susceptibilité à la MC. En effet, la surexpression de CEACAM6 au niveau iléal chez les patients atteints de MC pourrait être due non seulement à une stimulation des cellules épithéliales par des cytokines proinflammatoires, mais également à une infection par des AIEC (Barnich *et al.*, 2007), conduisant à une boucle d'amplification de la colonisation et de l'inflammation chez les patients (**Figure 40**) (Abraham and Cho, 2007).

**Tableau 8** : Récapitulatif des différents facteurs  $\sigma$ , des gènes les codant, de leur masse ainsi que de leur spécificité de liaison à l'ADN.

<u>Facteur <math>\sigma</math></u>	<u>Gène Codant</u>	<u>Masse</u>	<u>Situation</u>	<u>Séquence -35</u>	<u>Séparation</u>	<u>Séquence -10</u>
$\sigma^{70}$	rpoD	70 kD	Général	TTGACA	16-18 pdb	TATAAT
$\sigma^{32}$	rpoH	32 kD	Stress	CCCTTGAA	13-15 pdb	CCCGATNT
$\sigma^{24}$	rpoE	24 kD	Stress	Inconnue	Inconnue	Inconnue
$\sigma^{54}$	rpoN	54 kD	NO <sub>2</sub>	CTGGNA	6 pdb	TTGCA
$\sigma^{28}$	fliA	28 kD	Flagelle	CTAA	15 pdb	GCCGATAA

## IV. Régulation de l'expression des gènes

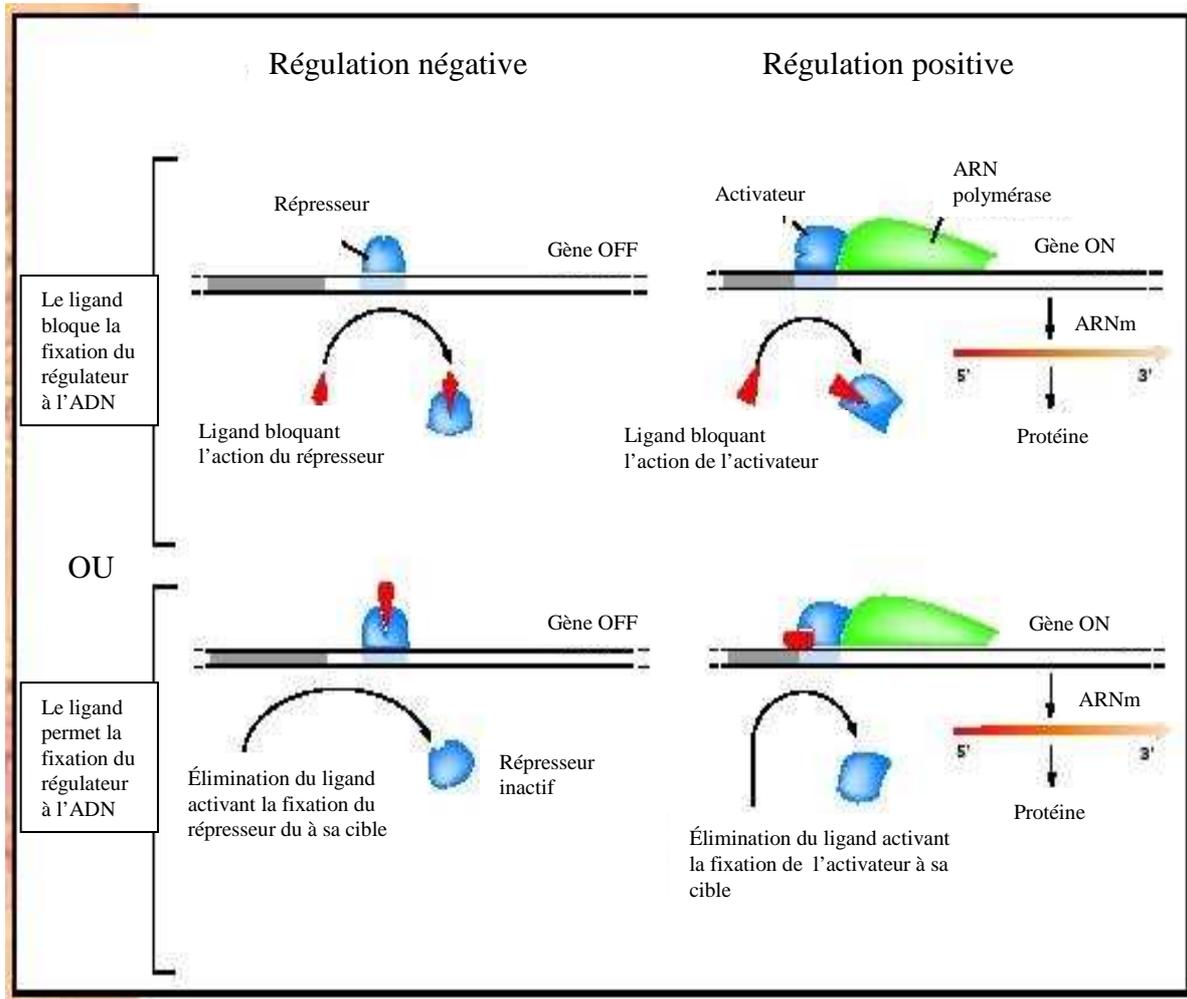
Les bactéries de types AIEC sont directement liées à la physiopathologie de la MC. Dans les conditions physiologiques particulières de l'hôte, les AIEC présentent une virulence liée à l'expression de nombreux facteurs, comme nous avons pu le développer dans le paragraphe III.3. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces souches, il est important de s'intéresser aux différentes voies de régulation contrôlant l'expression des facteurs de virulence. Dans ce but, nous aborderons dans ce chapitre l'organisation et la régulation des gènes procaryotes ainsi que les voies de transduction des signaux permettant l'adaptation des bactéries à leur environnement.

### IV.1. Régulation au niveau transcriptionnel

#### 1.1. La transcription chez les procaryotes

La transcription est une biosynthèse d'ARN de 5' vers 3' qui repose sur la complémentarité des bases et se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Chez les procaryotes, il n'existe qu'une seule ARN polymérase qui prend en charge la synthèse de l'ensemble des ARN messagers, ARN de transferts et ARN ribosomiaux. Sa structure de base ou « core enzyme », de 465 kDa, comprend plusieurs sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\beta'$ . Cette structure présente un canal de 25 Å lui permettant d'être en contact avec quelques dizaines d'acides nucléiques. Chez *E. coli*, le nombre de molécules d'ARN polymérase est estimé à 7000 dont 2000 à 5000 sont en activité à un instant donné. Elles synthétisent l'ARN à une vitesse de 20 à 40 nucléotides par seconde à 37°C avec un taux d'erreur de 1 base sur 10.000.

Le core enzyme présente une forte affinité pour l'ADN avec une constante de dissociation (Kd) de  $5.10^{-12}$  M mais aucune spécificité d'interaction. Ainsi, le core enzyme se fixe aléatoirement sur l'ADN chromosomique ou plasmidique. Cependant, il existe un mode d'interaction spécifique de l'ARN polymérase avec les séquences promotrices en amont des gènes, qui dépend de son association avec une autre sous-unité protéique, le facteur  $\sigma$ . L'interaction avec cette sous-unité diminue très fortement l'affinité du complexe ARN polymérase  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ , ou « holoenzyme », pour l'ADN en général (Kd =  $10^{-7}$  M) afin de le guider vers des sites à très forte spécificité localisés sur les promoteurs. Il existe six facteurs  $\sigma$  chez *E. coli* (**Tableau 8**) :  $\sigma^{70}$  (RpoD) qui est constitutif,  $\sigma^{24}$  (RpoE) et  $\sigma^{32}$  (RpoH) spécifiques des stress thermiques et acides,  $\sigma^{54}$  (RpoN) spécifique du métabolisme de l'azote,  $\sigma^{28}$  (FliA)



**Figure 41 : Régulation positive ou négative de la transcription des gènes procaryotes.**

La régulation négative est médiée par un répresseur fixé sur le promoteur bloquant la fixation de l'ARN polymérase. Dans le cas de la régulation positive, l'ARN polymérase nécessite un activateur pour initier la transcription. Il faut noter qu'un ligand, nécessaire à l'activation ou à l'inactivation du régulateur, peut aussi rentrer en jeu dans le mécanisme de fixation de l'ARN polymérase (d'après <http://www.biologyreference.com/Ce-Co/Control-of-Gene-Expression.html>).

spécifique des flagelles, et  $\sigma^S$  spécifique des conditions de carence en nutriments. Le facteur  $\sigma$  joue donc un rôle essentiel dans la spécificité de l'initiation de la transcription en fonction des conditions environnementales.

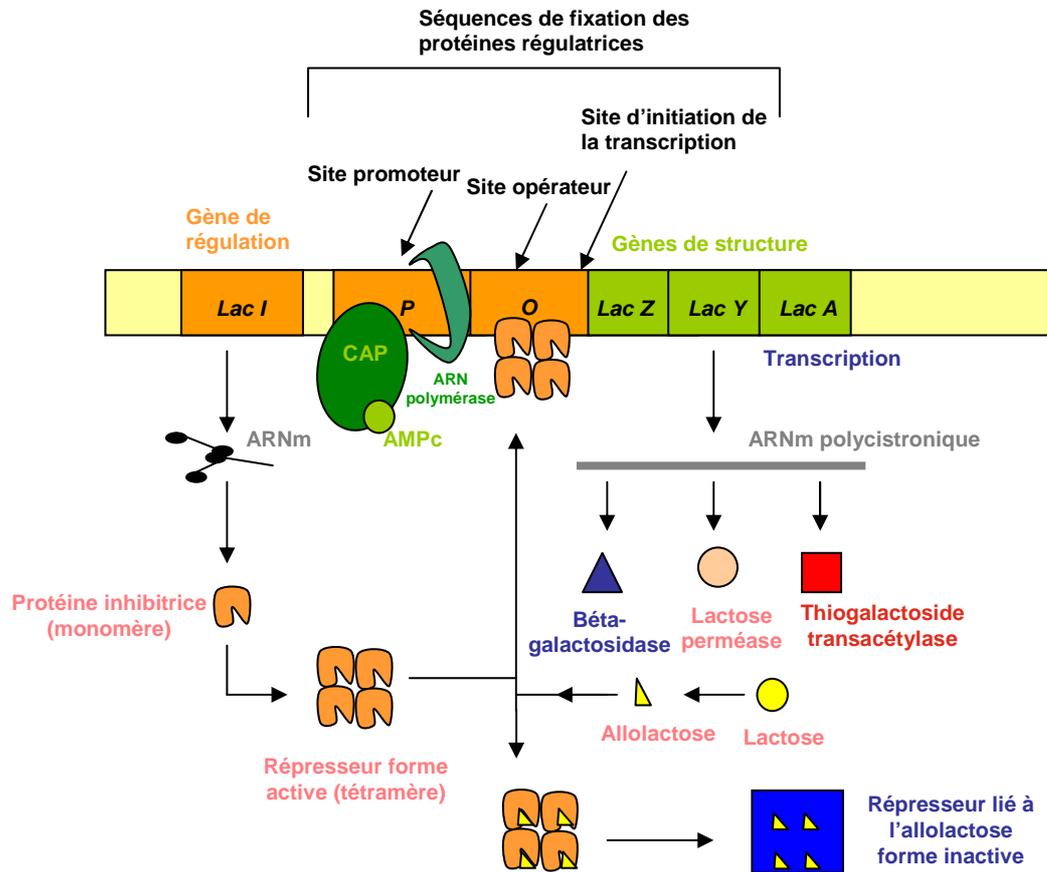
La fixation de l'ARN polymérase nécessite la présence de séquences ADN consensus, ces « boîtes » permettant une reconnaissance spécifique par les différents facteurs  $\sigma$ . Par exemple pour le facteur  $\sigma^{70}$  elles sont situées en position -10, « cassette -10 » ou « cassette TATA », et -35, « TTGACA », par rapport au site de d'initiation de la transcription. L'espacement de 16 à 19 paires de bases entre chacune de ces boîtes doit être respecté pour permettre l'initiation de l'activité transcriptionnelle. Lorsque l'ARN polymérase est correctement fixée, on observe la formation d'un complexe ouvert où l'ADN est dénaturé et où la transcription peut s'initier. Quand les conditions sont optimales, le facteur  $\sigma$  est chassé de l'ADN et la polymérase perd alors sa spécificité pour la zone promotrice. Elle se déplace le long de l'ADN en permettant l'élongation, et ce jusqu'au site de terminaison de la transcription. À ce site, l'ADN forme une structure tige-boucle qui déstabilise l'ARN polymérase et bloque son contact avec l'ADN. L'ARN nouvellement synthétisé est alors libéré et la polymérase est recyclée pour une nouvelle initiation de la transcription.

L'activité de l'ARN polymérase peut être modulée par des molécules ayant la capacité d'activer ou de réprimer la transcription : les régulateurs transcriptionnels ou facteurs de transcription. La régulation négative est assurée par un répresseur fixé sur le promoteur bloquant la fixation de l'ARN polymérase. Dans le cas de la régulation positive, l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase nécessite la présence d'un activateur. Il faut noter que des ligands peuvent se fixer à ces régulateurs et moduler leur activité, intervenant ainsi indirectement dans le mécanisme de fixation de l'ARN polymérase (**Figure 41**).

Chez les procaryotes, il existe une organisation génétique particulière où plusieurs gènes fonctionnellement apparentés se succèdent sur une même unité transcriptionnelle appelée opéron. Tous les gènes d'un opéron sont transcrits en même temps et sur une même molécule d'ARN, on parle alors d'ARNm polycistronique. La transcription de ces gènes est de ce fait co-réglée, ce qui est intéressant pour des protéines intervenant dans un processus commun.

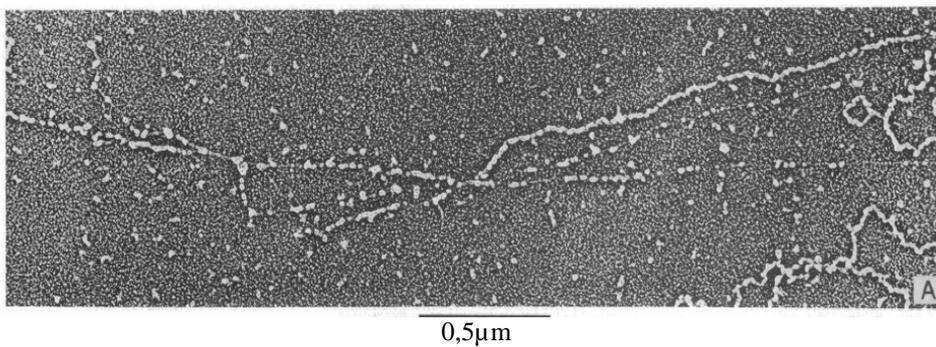
## 1.2. La répression catabolique

Lorsque *E. coli* se développe dans un milieu contenant du glucose et du lactose, la bactérie utilise préférentiellement le glucose jusqu'à ce qu'il soit épuisé. Dans ce cas, le



**Figure 42 : Régulation de l'opéron lactose par l'inhibiteur transcriptionnel LacI et par l'adénylate cyclase via le complexe activateur CAP-AMPC.**

L'allolactose, un isomère du lactose, se lie au répresseur en présence de glucose (<http://www.snv.jussieu.fr/>).



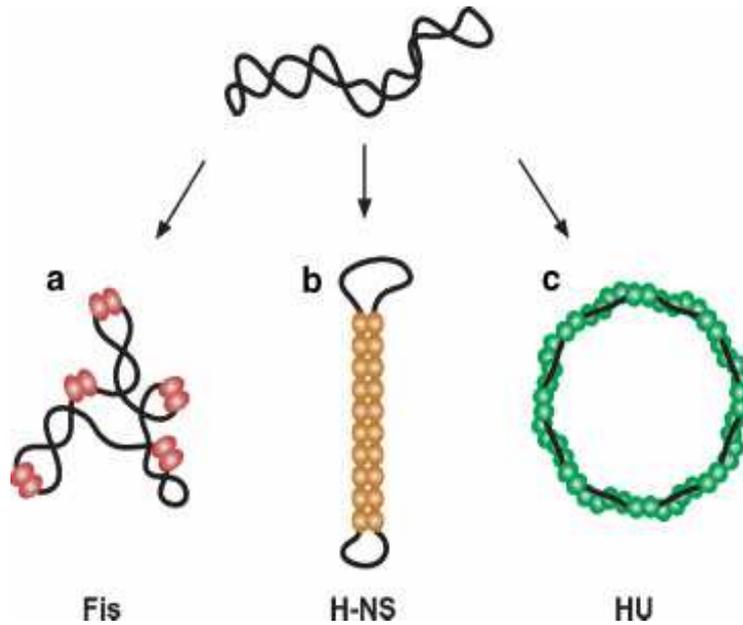
**Figure 43 : Molécule d'ADN de *E. coli* observée en microscopie électronique (Griffith, 1976).**

répresseur LacI se fixe au niveau du promoteur de l'opéron lactose, et bloque l'ARN polymérase : c'est la régulation négative. La diminution de concentration en glucose entraîne l'activation de l'adénylate cyclase, ce qui provoque une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc. Cet AMPc forme un complexe avec la protéine CAP (pour Catabolite Activator Protein) ou CRP (pour cAMP Receptor Protein). La protéine CAP est un activateur transcriptionnel qui se lie au promoteur de l'opéron lactose et augmente l'affinité de l'ARN polymérase pour ce promoteur : c'est la régulation positive (**Figure 42**).

### 1.3. Les protéines de type-histone

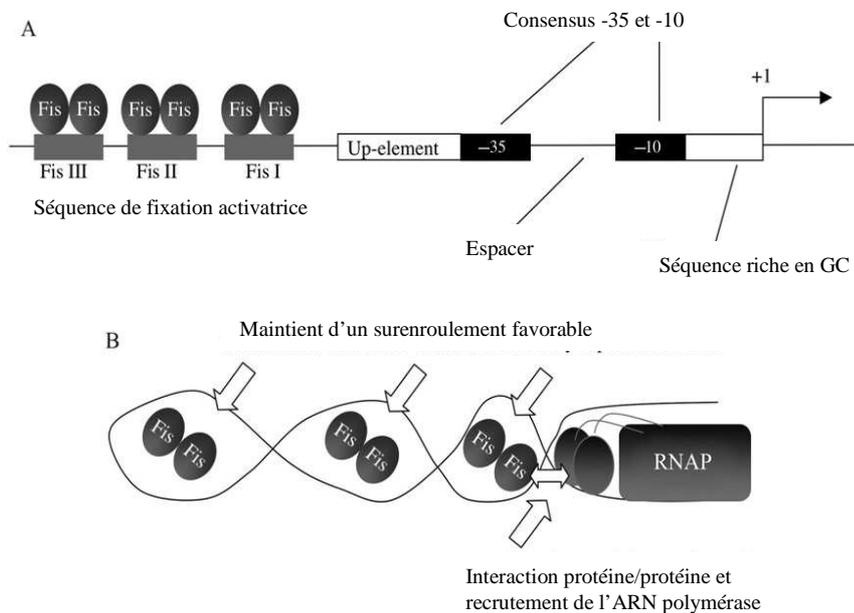
Depuis la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick en 1953, il est apparu que la taille de cette molécule déroulée est considérablement plus longue que celle de la cellule. Chez les eucaryotes, l'ADN chromosomique, localisé dans le noyau, est condensé grâce à son association avec des protéines stables, basiques et de faible poids moléculaire appelées histones qui sont au nombre de cinq : H1, H2A, H2B, H3 et H4. La structure de base de compaction de l'ADN eucaryote est le nucléosome, et l'association de plusieurs nucléosomes en « collier de perle » avec le filament d'ADN constitue la chromatine. Chez les procaryotes, l'ADN chromosomique, en général circulaire, n'est pas séparé du reste de la cellule par une membrane nucléaire. Lors des premières observations de l'ADN bactérien par microscopie électronique, des structures similaires à celles existant chez les eucaryotes ont été décrites et appelées « compactosomes » (Griffith, 1976) (**Figure 43**). Ainsi, comme chez les eucaryotes, l'ADN procaryote est très condensé et cette forme est appelée nucléoïde, cependant il ne présente pas d'organisation spécifique permanente comparable au nucléosome.

Une des composantes majeures de la structure de l'ADN procaryote est son niveau d'enroulement. La molécule d'ADN procaryote étant circulaire, ses extrémités ne peuvent pas tourner librement, ce qui entraîne une superhélicité négative nécessaire à la réplication, la transcription et la recombinaison. Chez *E. coli*, il existe deux types de topoisomérases qui sont des enzymes agissant directement sur la superhélicité de l'ADN : les topoisomérases de type I sont ATP-indépendantes et relâchent l'ADN tandis que les topoisomérases de type II sont ATP-dépendantes et induisent de la superhélicité c'est-à-dire un surenroulement négatif. Les topoisomérases I et III sont de type I et les topoisomérases II (ou gyrase) et IV sont de type II (Camacho-Carranza *et al.*, 1995). De plus, de nombreuses protéines bactériennes ont la capacité de se lier à l'ADN et d'induire une modification locale de sa topologie, en particulier l'ARN polymérase et les facteurs de transcription. Ces protéines se fixent à l'ADN avec une



**Figure 44 : Effet de la fixation des protéines de type-histone Fis, H-NS et HU sur la superhélicité de l'ADN.**

**a.** La fixation de Fis sous forme de dimère courbe l'ADN et augmente le super-enroulement négatif. **b.** La fixation de plusieurs protéines H-NS permet la formation de ponts entre deux brins d'ADN proches et augmente la compaction. **c.** La fixation d'HU au petit sillon de l'hélice de l'ADN permet de le maintenir sous sa forme la plus ouverte (Thanbichler *et al.*, 2005).



**Figure 45 : Régulation de la transcription par la protéine Fis.**

**A.** La fixation de Fis sous forme de dimères à des séquences activatrices spécifiques en amont du promoteur permet la stabilisation de celui-ci et la fixation de la sous unité alpha de l'ARN polymérase. +1: site initiateur de transcription. **B.** La protéine Fis peut influencer la transcription par un contact direct protéine-protéine avec l'ARN polymérase (RNAP) et par le maintien de micro-domaines avec un surenroulement de l'ADN adapté à l'activation du promoteur (d'après Dorman, 2009).

très grande spécificité et permettent la régulation de l'expression des gènes en agissant sur l'initiation de la transcription.

D'autres protéines possédant de l'affinité pour l'ADN, beaucoup plus nombreuses mais se fixant avec une moins grande spécificité, permettent une compaction et une modification de la topologie à plus grande échelle. Ces protéines appelées « protéines de type-histone » présentent certaines propriétés en commun avec les histones des eucaryotes, notamment leur capacité à lier l'ADN, leur forte concentration cellulaire (jusqu'à 50 000 monomères/bactérie), leur faible poids moléculaire, leur charge électrostatique et leur contribution à l'organisation de l'ADN chromosomique et plasmidique. Cependant, il n'existe pas d'analogie de séquence entre les protéines bactériennes de type-histone et les histones eucaryotes. Les protéines de type-histone participent à l'agencement du nucléoïde, en interagissant avec l'ADN, mais les structures mises en place sont moins stables et probablement moins organisées que dans le nucléosome. De plus, les protéines de type-histone contribuent à la modulation de l'expression de gènes et participent à des processus cellulaires telles que la recombinaison et la réplication de l'ADN, mais ne sont pas pour autant des facteurs de transcription au sens strict. Elles agissent de manière indirecte en régulant le niveau de compaction de l'ADN qui lui-même participe à la régulation de l'expression génique, et il faut noter que ceci peut influencer l'expression de facteurs de virulence (Dorman and Corcoran, 2009).

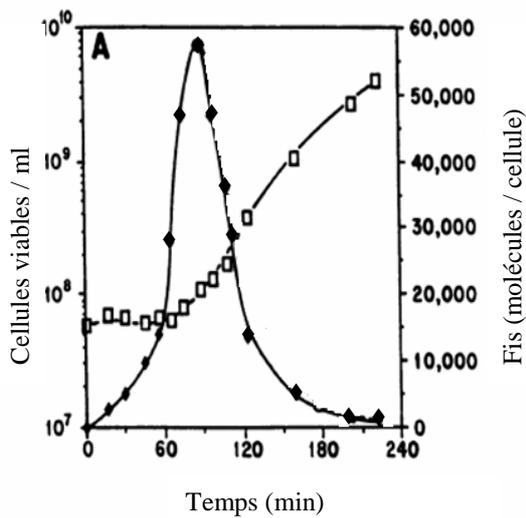
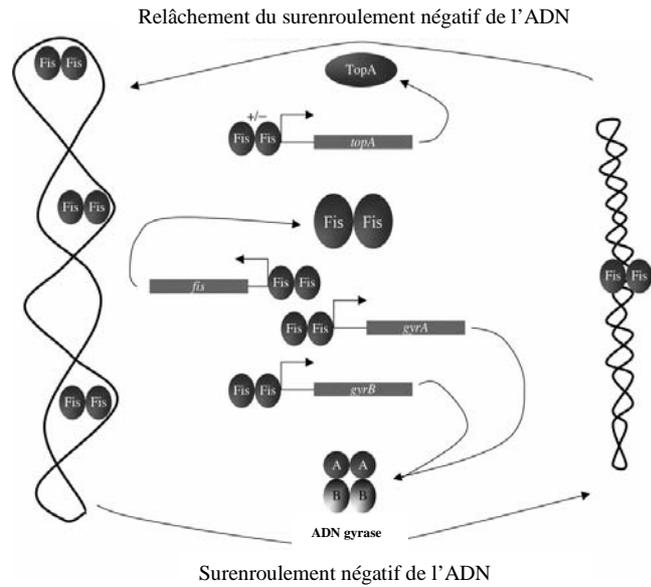
Les protéines bactériennes de type-histone ubiquitaires sont Fis (Factor for Inversion Stimulation), IHF (Integration Host Factor), H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring) et HU (Histone U). On peut associer à cette famille la protéine Lrp (Leucine responsive regulatory protein) même si cette appartenance est discutée dans la littérature. En effet, Lrp est de petite taille, basique, plus abondante que les facteurs de transcription classiques et interagit de façon spécifique ou non avec l'ADN sous forme de multimères.

### 1.3.1. Rôles des protéines de type-histone chez les Entérobactéries

✦ La protéine **Fis** de 11,2 kDa, codée par le gène *fis*, a été initialement mise en évidence dans le processus d'intégration de l'ADN du phage Mu au chromosome bactérien (Koch and Kahmann, 1986). Cette protéine possède un domaine HTH (Hélice-Tour-Hélice) qui lui permet de s'associer à l'ADN sous forme de dimère et d'induire des courbures de 50 à 90° de la double hélice (**Figure 44**). Cette association peut être spécifique grâce à la reconnaissance d'une séquence consensus de 15pb riche en A+T (Hengen *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 2008). De ce fait, Fis est un régulateur positif ou négatif de la transcription d'un grand

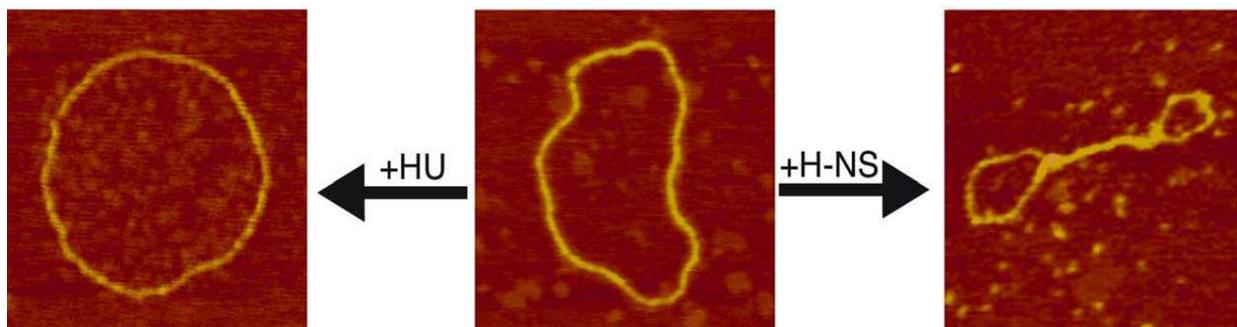
**Figure 46 : Action globale de la protéine Fis sur le surenroulement de l'ADN.**

La protéine Fis sous sa forme dimérique réprime l'expression de son propre gène et celle de gènes codant les sous unités de la gyrase (*gyrA* et *gyrB*). La relation de Fis avec l'expression de la topoisomérase I (*topA*) est plus complexe, elle peut être régulée positivement ou négativement suivant la concentration cellulaire de Fis ( $\pm$ ). Fis peut aussi se lier directement de façon aspécifique à l'ADN chromosomique afin de modifier son enroulement (d'après Dorman, 2009).



**Figure 47 : Profil d'expression de la protéine Fis au cours de la croissance cellulaire chez *E. coli* en milieu LB à 37°C.**

Carré : croissance cellulaire ; Losange : niveau de Fis par cellule (d'après Ball *et al.*, 1992).

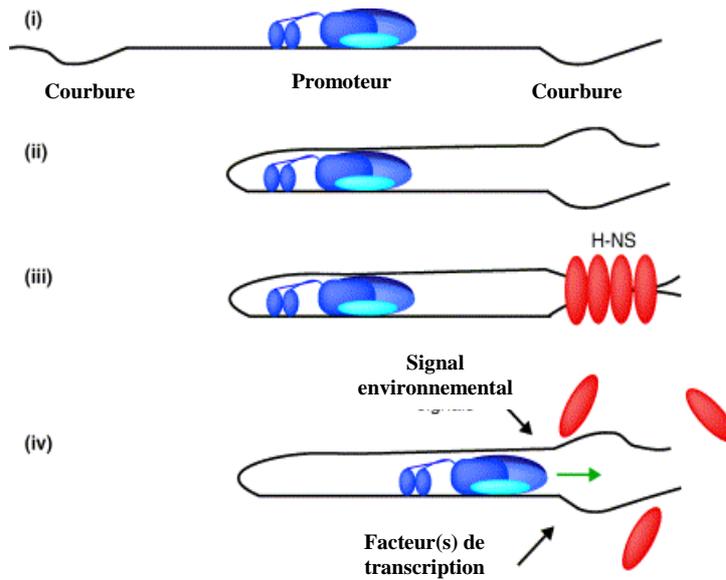


**Figure 48 : Effets opposés de H-NS et HU sur la structure de l'ADN.**

H-NS compacte le plasmide pUC19 alors que HU le relâche (Dame et Goosen, 2002).

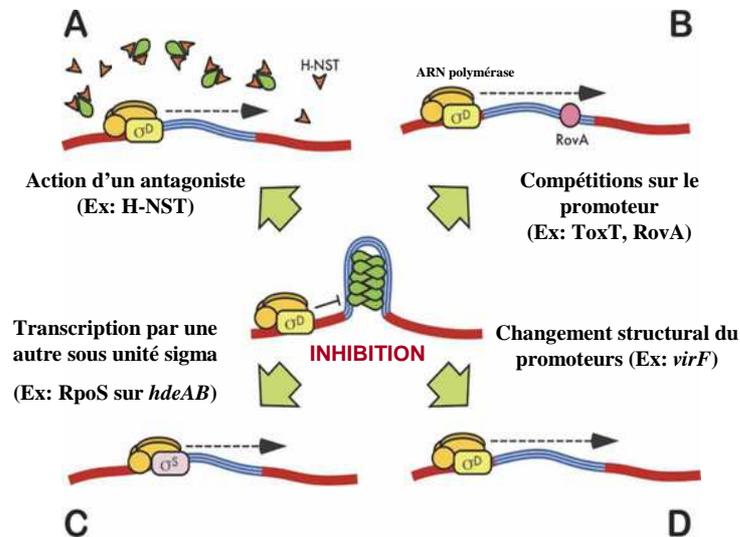
nombre de gènes. Dans certains cas, Fis agit comme un facteur de transcription conventionnel en établissant un contact physique avec l'ARN polymérase (**Figure 45**). Par ailleurs, Fis peut agir indirectement sur l'initiation de la transcription en modulant localement la superhélicité de l'ADN en se fixant spécifiquement à des séquences activatrices situées en amont de certains promoteurs, ce qui facilite la fixation de l'ARN polymérase (Auner *et al.*, 2003). Le rôle principal de Fis est de modifier la superhélicité de l'ADN (**Figure 46**). En effet, cette protéine a la capacité d'induire des courbures locales, mais elle agit aussi de façon plus générale en régulant l'expression du gène *topA* codant la topoisomérase I et en réprimant l'expression des gènes *gyrA* et *gyrB* codant pour les deux sous-unités de la gyrase. Enfin, l'expression de cette protéine de type-histone est finement autorégulée au cours du cycle cellulaire (**Figure 47**) (Ball *et al.*, 1992). En effet, l'expression de Fis est maximale en début de phase exponentielle et sa concentration cellulaire diminue rapidement au fur et à mesure de la croissance bactérienne. Cette régulation s'explique notamment par le fait que la protéine sous sa forme dimérique a la capacité de réprimer l'expression de son propre gène.

✦ La protéine **H-NS** de 15,4 kDa possède deux domaines protéiques distincts, un domaine de dimérisation en N-terminal et un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal, liés par un adaptateur flexible. Ainsi cette protéine, affine à l'ADN, crée des ponts entre deux brins d'ADN proches, augmentant ainsi la superhélicité (**Figure 44 et 48**) (Dame *et al.*, 2002; Dame *et al.*, 2005; Dame *et al.*, 2006) et facilitant le transfert latéral de gènes (Navarre *et al.*, 2007). Les interactions de cette protéine avec l'ADN sont davantage guidées par une courbure particulière de l'ADN que par la reconnaissance d'une séquence nucléique spécifique (Dorman and Deighan, 2003). Cependant, H-NS présente une forte affinité pour des régions ADN riches en A+T, et certains auteurs suggèrent même l'existence d'une séquence consensus correspondant à des régions de haute affinité (Fang and Rimsky, 2008). L'analyse du transcriptome par des techniques de puces à ADN a montré que H-NS est impliquée dans la répression de plus de 5% des gènes chez *E. coli*. Aujourd'hui la protéine H-NS, classée parmi les protéines de type-histone malgré le fait qu'elle soit neutre, non basique et exprimée de façon constante au cours de la croissance bactérienne, est reconnue comme un répresseur global de la transcription. Plusieurs molécules H-NS peuvent se fixer en amont des promoteurs au niveau de régions d'ADN coudées pour induire la formation d'une boucle dans laquelle l'ARN polymérase est piégée, provoquant ainsi une répression de la transcription (**Figure 49**) (Dorman, 2004). Cette régulation négative se fait notamment en fonction des conditions environnementales, telles que l'osmolarité, la température et le pH (Atlung and



**Figure 49 : Répression de la transcription par H-NS.**

(i) L'ARN polymérase se lie au promoteur. (ii) L'ADN s'enroule autour du promoteur. (iii) H-NS fixe les régions courbe de l'ADN en formant un pont entre deux brins. Ainsi, il y a formation d'une boucle qui emprisonne l'ARN polymérase et réprime la transcription. (iv) La répression est levée par des signaux environnementaux (la température par exemple) ou l'action positive de facteurs de transcription (d'après Dorman et Deighan, 2003).



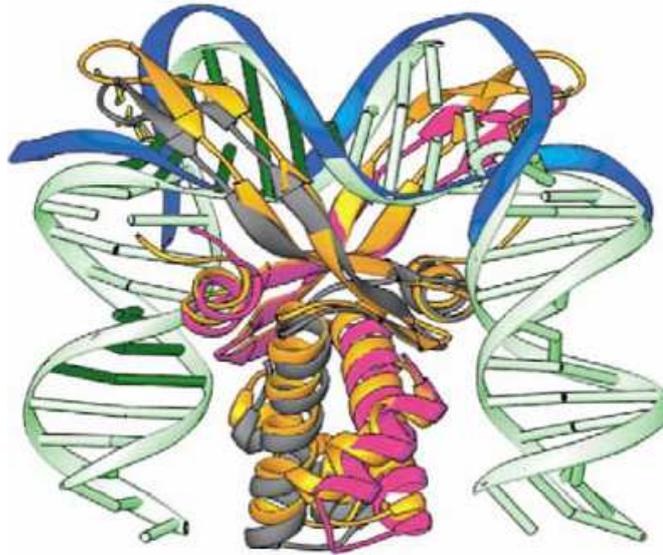
**Figure 50 : Mécanismes permettant de contrer la répression médiée par H-NS.**

Différents mécanismes ont été proposés et quatre d'entre eux sont présentés. **A.** Action d'antagonistes de H-NS (exemple H-NST) bloquant sa multimérisation et donc sa fixation à l'ADN. **B.** Fixation d'un activateur spécifique permettant l'initiation de la transcription. **C.** Activation du promoteur par une sous unité sigma de l'ARN polymérase alternative. **D.** Changement structural du promoteur en réponse à un stimulus environnemental (par exemple, la température) (d'après Navarre *et al.*, 2007).

Ingmer, 1997). Il est à noter l'existence de nombreux processus permettant de contrebalancer la répression exercée par la protéine H-NS (**Figure 50**) (Navarre *et al.*, 2007). Par exemple un changement conformationnel de l'ADN ou encore la fixation d'une autre protéine, telle que Fis, sur l'ADN, empêche la fixation de H-NS (Dorman, 2004). Pour terminer, il existe une protéine homologue à H-NS nommée **StpA** possédant 58% de séquence similaire. Cette protéine a la capacité de former un hétérodimère avec H-NS et présente une plus forte affinité à l'ADN. Il a été suggéré que StpA pourrait se substituer aux fonctions d'H-NS. Cette idée est renforcée par l'existence d'une régulation couplée de l'expression de leurs gènes (Sonden and Uhlin, 1996). Cependant, StpA a des propriétés distinctes de celles d'H-NS, en particulier un rôle de chaperonne à ARN (Zhang *et al.*, 1995).

✦ **HU**, petite protéine de 9 kDa thermostable, existe principalement sous forme hétérodimérique  $\alpha\beta$  (90%), mais peut aussi se trouver sous forme homodimérique  $\alpha_2$  ou  $\beta_2$  (10%) (Claret *et al.*, 2007). Les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont codées respectivement par les gènes *hupA* et *hupB*. Les propriétés d'interaction d'HU avec l'ADN chromosomique lui permettent d'intervenir dans de nombreux processus physiologiques comme la réplication, la transcription, la recombinaison et la réparation. HU peut se lier à l'ADN de façon non spécifique avec une faible affinité (Kd ~ 200–2500 nM) (Benevides *et al.*, 2008). Cette liaison induit une courbure de l'ADN et diminue la compaction (**Figure 44**). Cette protéine architecturale contrecarre la compaction de l'ADN due à H-NS (**Figure 48**) (Dame and Goosen, 2002). De plus, HU a une forte affinité pour l'ADN lorsque celui-ci présente des distorsions. Dans ce cas, elle peut être recrutée par un régulateur de transcription pour moduler son activité et ainsi l'expression de certains gènes (Kar and Adhya, 2001).

✦ La protéine **IHF** présente des similitudes en termes de séquence et de structure avec la protéine HU. IHF existe également sous forme hétérodimérique  $\alpha\beta$ . Les sous-unités  $\alpha$  (11 kDa) et  $\beta$  (9 kDa) sont codées respectivement par les gènes *ihfA* et *ihfB*. IHF a été décrite comme participant à l'intégration du génome du bactériophage lambda dans le chromosome bactérien (Nash and Robertson, 1981). A la différence d'HU, IHF se fixe sur l'ADN avec une forte affinité (Kd ~ 2–20 nM). Cette liaison se fait par la reconnaissance d'une séquence très spécifique et pour laquelle le consensus suivant a été établi : WATCARXXXXTTR (W=A ou T ; X=A, T, C ou G ; R=A ou G) (Benevides *et al.*, 2008). Cependant, les structures des complexes formés par IHF ou HU avec l'ADN sont très similaires et courbent l'ADN jusqu'à



**Figure 51 : Superposition des structures cristallographiques d'IHF et HU liées à l'ADN.** HU est représentée en jaune et son substrat en bleu. IHF est représentée en gris et rose et son site spécifique de liaison en vert foncé (Swinger et Rice, 2004).

180° (**Figure 51**) (Swinger and Rice, 2004). Le rôle positif ou négatif de la protéine IHF dans la transcription est soit d'assister en tant qu'organisateur structural l'action d'un régulateur, soit de jouer directement le rôle de régulateur (Goosen and van de Putte, 1995).

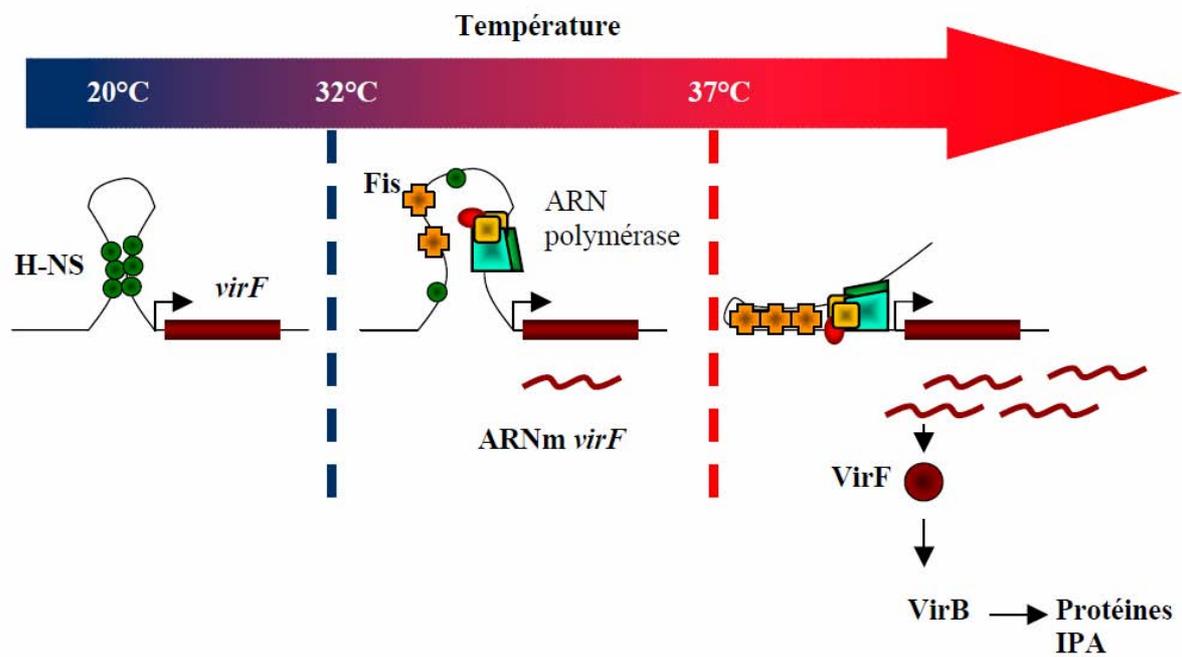
✦ La protéine **Lrp**, codée par le gène du même nom, est modérément abondante, basique et s'associe en dimères de 18,8 kDa chacun. Lrp a été initialement mise en évidence lors de la recherche de gènes régulés par la leucine. Aujourd'hui, cette protéine est reconnue comme une structure affine à l'ADN pouvant se lier à la séquence consensus suivante : YAGHAWATTWTDCTR (Y=C ou T, H≠G, W=A ou T, D≠C, et R=A ou G) (Cui *et al.*, 1995). Cette liaison induit une courbure de l'ADN, ce qui prouve son action directe sur la structure du nucléoïde. Cependant, Lrp a également la capacité de réguler positivement ou négativement l'expression d'un grand nombre de gènes et notamment des opérons sous la dépendance ou non de la leucine (Newman and Lin, 1995). En effet, l'utilisation de puces à ADN a montré que Lrp affecte environ 10% des gènes chez *E. coli* (Hung *et al.*, 2002; Tani *et al.*, 2002). La plupart sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés et un petit nombre dans l'expression de structures fimbriales (Hung *et al.*, 2002). De plus, la fixation de Lrp à l'ADN peut bloquer la méthylation des sites GATC et inversement. Ce type de régulation est à l'origine du contrôle de l'expression des pili *pap* chez *E. coli* (Nou *et al.*, 1995). Pour terminer, l'analyse de différents génomes procaryotes a montré l'existence de différents régulateurs transcriptionnels pouvant s'apparenter à la « famille Lrp » ce qui prouve l'importance de cette protéine ubiquitaire (Brinkman *et al.*, 2003).

### **1.3.2. Virulence et protéines de type-histone**

Les protéines de type-histone sont nécessaires au maintien de la structure du nucléoïde et à sa compaction. Cependant ces protéines peuvent également moduler la transcription de certains gènes de façon spécifique, soit par une action structurale sur l'ADN, soit en jouant le rôle de facteur de transcription. Il est intéressant d'évaluer leurs rôles dans la régulation des facteurs de virulence en prenant quelques exemples chez les entérobactéries et en développant plus en détail leur implication sur l'expression des fimbriae.

#### **i. Exemples d'implication des protéines de type-histone dans la régulation de la virulence chez les entérobactéries**

Chez *Shigella flexneri* et *E. coli* entéroinvasif (EIEC), l'expression de gènes permettant l'infection de cellules épithéliales et de macrophages est activée par deux



**Figure 52 :** Mode d'action du répresseur H-NS et de l'activateur Fis en fonction de la température sur l'expression du gène *virF* chez *Shigella flexneri* et *E. coli* entéroinvasif. (d'après Lautier et Nasser, 2005)

régulateurs transcriptionnels : **VirF** et **VirB** (Dorman and Porter, 1998). Lorsque la température est inférieure à 32°C, H-NS réprime la transcription de *virF* en se fixant spécifiquement en amont du promoteur de ce gène grâce à la reconnaissance d'une courbure d'ADN. A des températures voisines de celle de l'hôte (37°C), une modification de la topologie de l'ADN empêche la fixation de H-NS (**Figure 52**) (Falconi *et al.*, 1998; Falconi *et al.*, 2001; Prosseda *et al.*, 2004). De ce fait, la protéine de type-histone Fis peut se fixer en amont du promoteur sur des sites spécifiques, permettant une augmentation de la transcription de *virF*. Le régulateur VirF active ensuite l'expression de VirB, régulateur spécifique des gènes de virulence nécessaires à l'invasion des cellules.

Chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, les îlots de pathogénicité 1 et 2 (**SPI-1** et **SPI-2**) doivent être exprimés pour le développement de gastroentérites chez l'hôte. Le génome de *S. Typhimurium* comporte cinq îlots de pathogénicité nommé SPI-1 à -5. SPI-1 et SPI-2 codent notamment deux systèmes de sécrétion de type III ayant des rôles différents : SPI-1 participe à l'invasion des cellules épithéliales tandis que SPI-2 contribue à la survie en macrophages. L'expression de ces îlots de pathogénicité est en général réprimée par H-NS (Olekhovich and Kadner, 2007; Walthers *et al.*, 2007). Par exemple, l'expression du gène *hilA*, régulateur positif du système SPI-1, est réprimée par H-NS dans des conditions de faible osmolarité. Cependant, dans les conditions de forte osmolarité comme celles rencontrées dans l'intestin, cette répression est levée. Par ailleurs, HU et Fis régulent positivement *hilA*, favorisant une entrée massive des bactéries dans les cellules épithéliales (Schechter *et al.*, 2003). H-NS exerce aussi un pouvoir répresseur sur SPI-2 tandis que la protéine Fis à un rôle activateur direct ou indirect (Kelly *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2006). Il faut noter une forte implication d'IHF qui est nécessaire à l'expression des différents SPI-1 à 5, notamment en début de phase exponentielle de croissance pour SPI-1, ce qui suggère un rôle important d'IHF dans la coordination de l'expression des facteurs de virulence (Fass and Groisman, 2009; Mangan *et al.*, 2006).

Chez les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC), il existe un îlot de pathogénicité appelé **LEE** pour "Locus of Enterocyte Effacement" comportant en outre les gènes codant un système de sécrétion de type III. Le LEE est constitué de cinq opérons : LEE1 à LEE5. Le LEE1 code la protéine Ler (LEE Encoded Regulator) qui régule positivement l'expression les autres opérons. A 27°C les opérons LEE sont réprimés par H-NS mais cette inhibition n'a plus lieu à 37°C, conditions physiologiques d'infection (Umanski

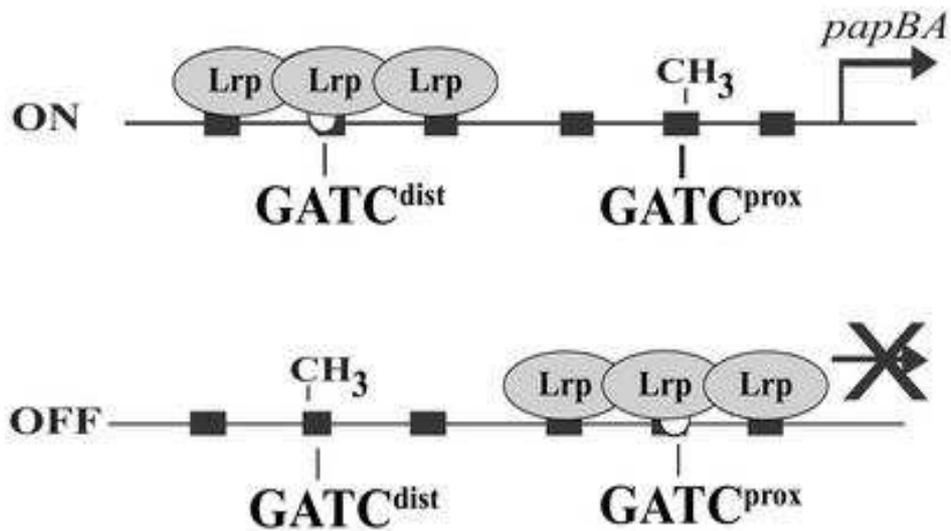


Figure 53 : Implication de la protéine Lrp dans la variation de phase de l'opéron codant les pili Pap de *E. coli* responsables d'infections urinaires (Hernday *et al.*, 2002).

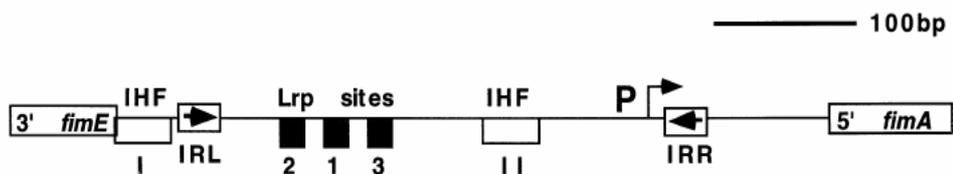


Figure 54 : Organisation du promoteur de l'opéron *fim* dans la position ON.

Les protéines Lrp et IHF se fixent à leurs sites spécifiques. Les flèches indiquent les sites de répétitions inversées (IRL et IRR). Le promoteur (P) pour la transcription de l'opéron *fim* est à proximité de IRR (Roesch et Blomfield, 1998).

*et al.*, 2002). IHF régule positivement LEE1 en permettant la liaison d'un régulateur nommé PerC à son promoteur et donc l'expression de l'anti-répresseur Ler (Porter *et al.*, 2005).

## ii. Régulation de l'expression des fimbriae chez *E. coli*

De nombreuses structures fimbriales sont décrites dans la littérature comme servant d'adhésine ou facteur d'adhésion pour des récepteurs situés à la surface des cellules eucaryotes. L'adhésion des micro-organismes aux tissus de l'hôte est une étape primordiale à la colonisation et au processus de pathogénicité des *Enterobacteriaceae* (Krogfelt, 1991). Il existe plusieurs types de structures fimbriales, telles que les LPF (long polar fimbriae), les curli, différents pili (type 1, Pap...)... et beaucoup d'entre elles sont des facteurs de virulence.

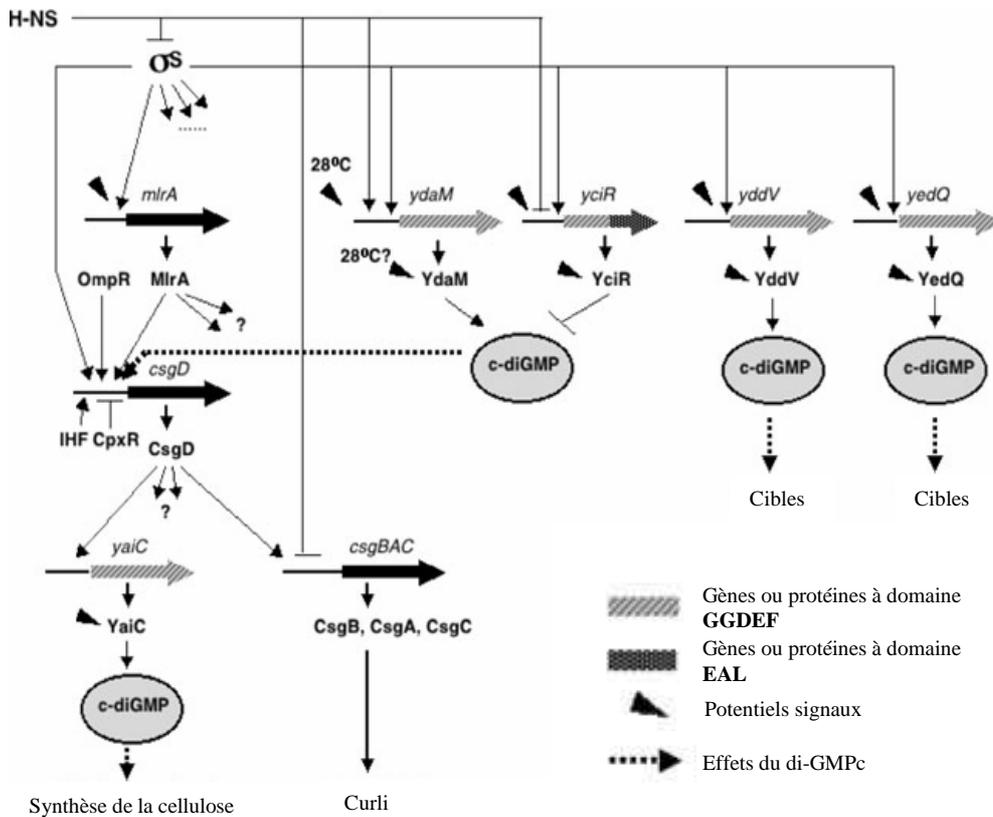
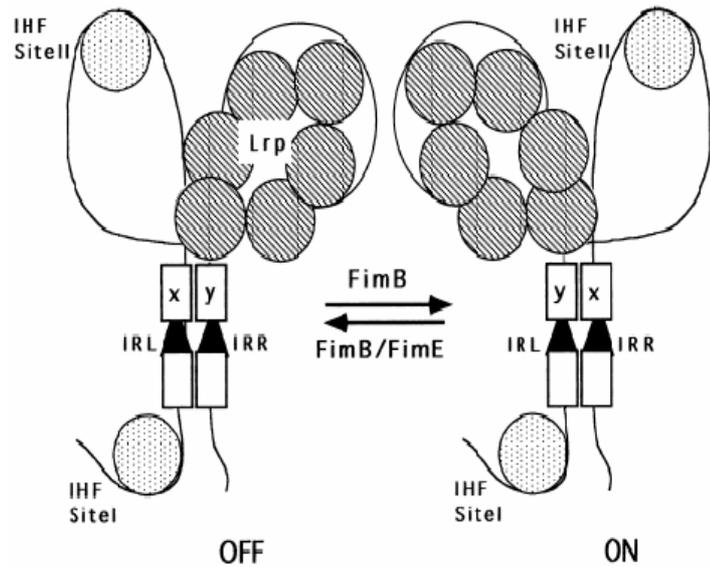
De nombreux exemples dans la littérature montrent l'implication des protéines de type-histone, à l'exception d'HU, dans la régulation de l'expression de structures fimbriales. C'est le cas pour H-NS qui agit comme un inhibiteur transcriptionnel de l'expression des **LPF** impliqués dans les capacités d'adhésion *in vitro* de la souche *E. coli* (EHEC) O157:H7 aux cellules en cultures (Torres *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2008).

Dans la bibliographie, de nombreux exemples relatent l'implication de Lrp dans la régulation de différents pili impliqués dans l'adhésion. Lrp régule l'expression des pili de *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) responsables de gastroentérites chez les bovins et les porcins, tels que les antigènes **CS31A** (Crost *et al.*, 2003), **K88** (Nagy *et al.*, 1977) et **K99** (Braaten *et al.*, 1992), ou de *E. coli* responsables d'infections urinaires (UPEC) chez l'homme tels que les **antigènes S** et **F1845** (van der Woude and Low, 1994). De plus, Lrp est le régulateur permettant la variation de phase de ON vers OFF et de OFF vers ON pour l'opéron codant les **pili Pap** (Pyelonephritis-associated pili) des UPEC. Lrp agit dans la région promotrice de l'opéron *pap*, en bloquant la méthylation du site GATC distal de façon préférentielle. Alternativement, lorsque la concentration en Lrp augmente et en fonction de la réplication de l'ADN, Lrp bloque la méthylation du site proximal (**Figure 53**) (Hernday *et al.*, 2002). H-NS intervient également dans cette régulation mais n'est pas comme Lrp essentielle à l'inversion de phase. En réalité, cette protéine de type-histone module l'expression des pili Pap en réponse à divers stimuli environnementaux (White-Ziegler *et al.*, 1998; White-Ziegler *et al.*, 2000).

L'expression des **pili de type 1**, sous la dépendance d'un promoteur localisé sur une séquence inversible *fimS*, est aussi régulée par plusieurs protéines de type-histone. La variation de phase du promoteur est régie par les recombinaisons FimE et FimB qui se lient au

**Figure 55 : Modèle schématique du mécanisme de variation de phase des pili de type 1 chez *E. coli*.**

Les carrés vides représentent FimB et FimE, les cercles hachurés Lrp et les cercles grisés IHF (Blomfield *et al.*, 1997).



**Figure 56 : Modèle de signalisation du di-GMPc via les protéines à domaines GGDEF et EAL dans le réseau  $\sigma^S$  chez *E. coli*.**

Le contrôle de l'expression des curli et de la synthèse de la cellulose est sous la dépendance de la voie  $\sigma^S$  de réponse au stress.

**Pendant l'entrée en phase stationnaire**, l'expression de  $\sigma^S$  est induite et cet activateur permet l'expression de différents gènes (*ydaM* et *yciR* codant respectivement des protéines à domaine GGDEF et EAL et *mlrA* et *csgD* codant des activateurs). De plus, la protéine de type-histone H-NS active l'expression de *ydaM*.

**Pendant la phase exponentielle de croissance**, H-NS joue un rôle important de régulateur négatif sur  $\sigma^S$ . De plus, H-NS est un inhibiteur permanent de l'expression de *yciR*.

Ainsi se met en place une cascade de régulation convergeant vers l'expression du régulateur principal de l'expression des curli CsgD (d'après Weber *et al.*, 2006).

niveau des sites adjacents aux séquences répétées inversées IRL et IRR pour catalyser la réaction de recombinaison site spécifique. Lrp se lie coopérativement au sein de la séquence inversible *fimS* en trois sites spécifiques et IHF en deux sites, l'un étant localisé entre l'extrémité 5' de *fimE* et la séquence IRL (site I), et l'autre au sein de *fimS* (site II) (**Figure 54**) (Blomfield *et al.*, 1997; Lahooti *et al.*, 2005; Roesch and Blomfield, 1998). Lrp et IHF régulent ensemble le promoteur de l'opéron *fim*, en augmentant l'efficacité du processus d'inversion assuré par les recombinases. Il a été montré que l'efficacité de recombinaison de FimB et FimE est diminuée dans les mutant *lrp*, *ihfA* et *ihfB* (Blomfield *et al.*, 1993; Dorman and Higgins, 1987; Eisenstein *et al.*, 1987). La liaison des protéines de type-histone à *fimS* et le niveau de superhélicité entraînent des modifications de la conformation de l'ADN dans cette région, ce qui permettrait d'aligner les séquences IRL et IRR dans une orientation favorable à la recombinaison (**Figure 55**) (Blomfield *et al.*, 1997). De plus, la protéine H-NS intervient également dans cette régulation en diminuant préférentiellement l'expression de *fimB* et en inhibant la transition de la phase OFF vers la phase ON (O'Gara J and Dorman, 2000; Schwan *et al.*, 2002).

Pour terminer cette liste non exhaustive, un seul exemple montre l'implication de la protéine de type-histone Fis dans la régulation de l'expression des **curli**, structures fimbriales, chez les EPEC et les EHEC. Dans ces souches de *E. coli*, les curli permettent l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales et la formation de biofilms. Fis régule négativement la transcription du gène *csgD* codant le régulateur positif de l'opéron *csg* codant les curli (Saldana *et al.*, 2009). Cependant, ces structures fimbriales ne sont pas régulées exclusivement par Fis, d'autres régulateurs sont impliqués. H-NS, jouant habituellement un rôle de répresseur, régule à la fois de façon négative et positive l'expression des curli en agissant sur la transcription de *csgD*, et ceci semble être fonction du contexte génétique de la souche étudiée (Jubelin *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 2006). Un modèle proposé par Weber et coll. montre l'implication à plusieurs niveaux d'H-NS en amont d'une cascade de régulation aboutissant à l'expression des curli (**Figure 56**) (Weber *et al.*, 2006). H-NS agit notamment sur l'expression d'enzymes contrôlant le niveau d'un messenger second, le di-GMPc (Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate) qui régule positivement l'expression de *csgD*.

En conclusion, les protéines de type-histone sont importantes pour la structure de l'ADN procaryote mais aussi pour la régulation de l'expression des gènes et notamment de

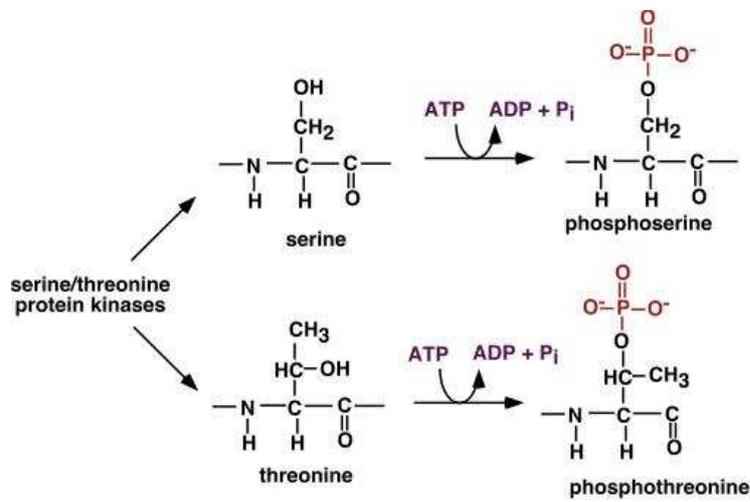


Figure 57 : Transfert des groupements phosphate à partir de l'ATP vers les groupements hydroxyles des sérines et thréonines par les sérine/thréonine kinases.

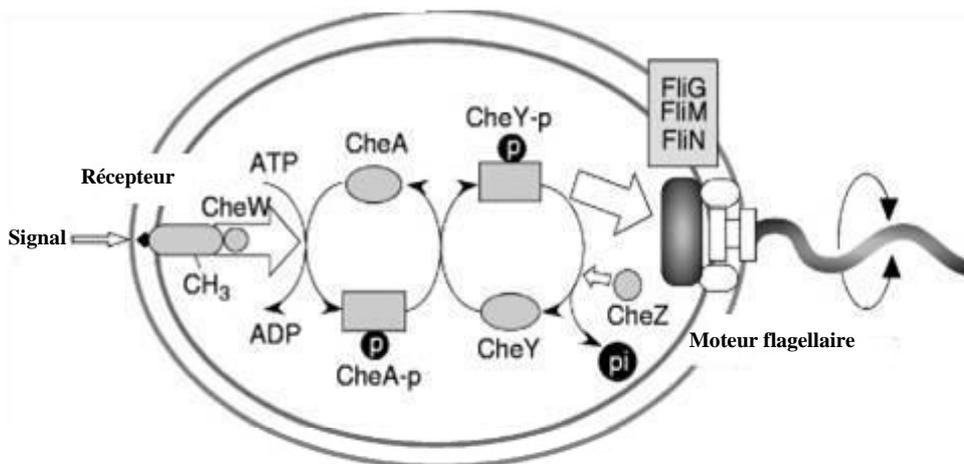


Figure 58 : Voie d'activation du chimiotactisme.

Le stimulus est perçu par des protéines membranaires qui vont être méthylées, induisant une phosphorylation *via* le complexe CheA/CheW de CheY et CheB qui vont activer le moteur flagellaire.

gènes de virulence. Comprendre leur rôle permet de mieux disséquer les mécanismes complexes de régulation des gènes chez les entérobactéries interagissant avec les voies de signalisation telles que les systèmes à deux composants ou les seconds messagers.

## **IV. 2. Les différentes voies de transduction du signal**

La régulation de la synthèse protéique chez les bactéries peut s'exercer à plusieurs niveaux : sur la transcription, sur la traduction ou sur la stabilité des ARNm ou des protéines. La régulation fait intervenir des systèmes qui permettent une réponse intégrée à des stimuli environnementaux, c'est la transduction du signal. Il existe différentes voies de transduction des signaux chez les organismes procaryotes : les protéines sérine/thréonine kinases, les protéines méthylées impliquées dans le chimiotactisme, les systèmes à deux composants et les seconds messagers.

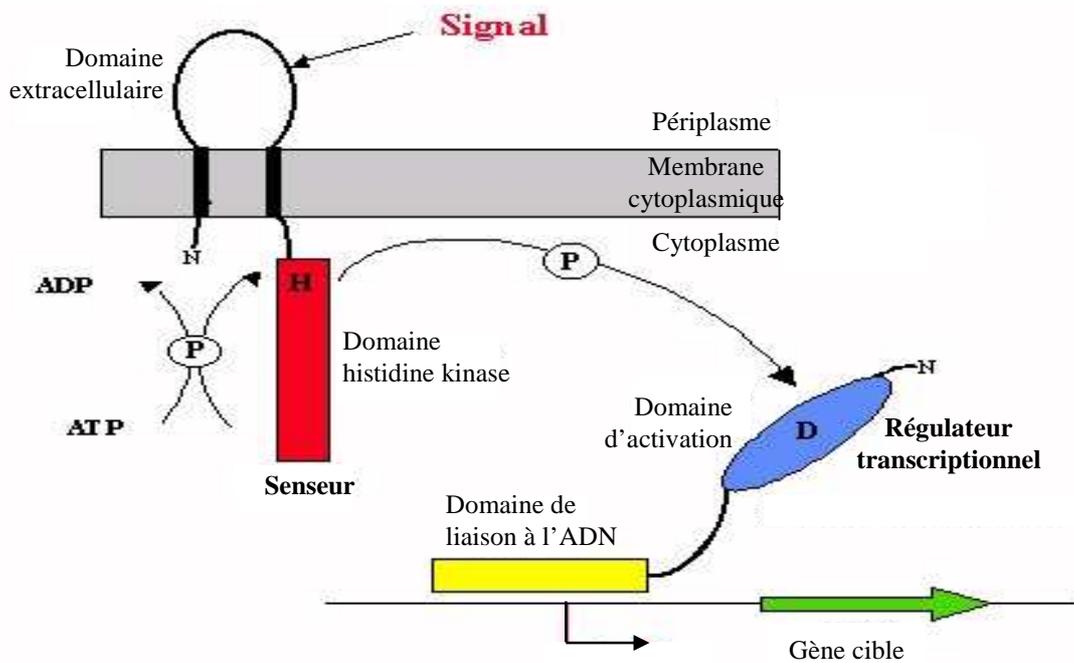
### **2.1. Les sérine/thréonine kinases**

Parmi les protéines impliquées dans la transduction du signal chez les procaryotes, les sérines/thréonines kinases interviennent dans la régulation du métabolisme secondaire et dans les phénomènes de différenciation morphologique (**Figure 57**) (Umeyama *et al.*, 2002).

Le couple AfsK/AfsS, récemment caractérisé chez *Streptomyces coelicolor*, constitue aujourd'hui le modèle de régulation transcriptionnelle le plus connu concernant les sérine/thréonine kinases. Ce système fait intervenir une sérine/thréonine kinase, AfsK, capable de s'autophosphoryler avant de phosphoryler un régulateur transcriptionnel, AfsR, dont l'affinité pour son site de fixation dépend directement de son niveau de phosphorylation.

### **2.2. La méthylation de protéines impliquées dans le chimiotactisme**

Une autre voie de signalisation intracellulaire décrite chez les procaryotes est la méthylation de protéines impliquées dans le chimiotactisme (Bourret and Stock, 2002). Le schéma général de cette voie est proche de celui des systèmes à deux composants (Williams and Stewart, 1999). Le stimulus est capté par un récepteur transmembranaire qui est alors méthylé (**Figure 58**). Le récepteur se présente sous forme de dimère, couplé à deux adaptateurs CheW et un homodimère CheA. CheA activé phosphoryle les protéines effectrices CheY et CheB. Ces dernières agissent au niveau du moteur du flagelle pour en réguler la rotation. Quatre récepteurs ont été caractérisés chez *E. coli* alors que plus de 40 ont



**Figure 59 : Schéma général du fonctionnement des systèmes de régulation à deux composants.**

La détection d'un signal au niveau du domaine extracellulaire va activer le domaine histidine kinase du senseur, induisant la phosphorylation d'un résidu histidine. Le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate du domaine d'activation du régulateur transcriptionnel, conduisant à l'activation du domaine de liaison à l'ADN. Le régulateur transcriptionnel activé peut ensuite se fixer sur des régions promotrices spécifiques pour activer ou inhiber la transcription de gènes cibles (d'après Rodrigue *et al.*, 2000).

été décrits chez *Vibrio cholerae*. Ce complexe est l'équivalent de l'histidine kinase dans la voie des systèmes à deux composants.

## 2.3. Systèmes à deux composants

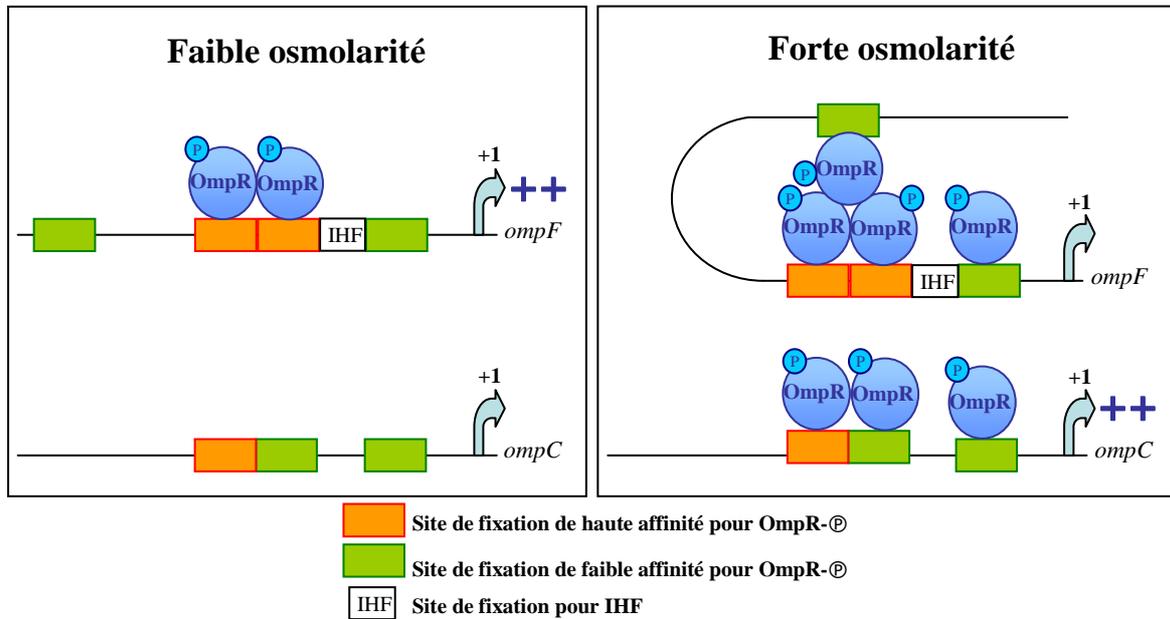
### 2.3.1. Généralités sur les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants sont des mécanismes de régulation transcriptionnelle permettant une adaptation rapide de la bactérie à son environnement. Ils sont communément retrouvés chez les procaryotes, mais quelques systèmes existent également chez des eucaryotes tels que les levures et les plantes (Bernal *et al.*, 2001). Plus de 250 systèmes différents ont pu être identifiés dans le monde bactérien, dont une trentaine chez *E. coli* (Mizuno, 1997).

Les systèmes de régulation à deux composants répondent à un stimulus spécifique et font intervenir deux protéines : un senseur enchâssé dans la membrane interne et un régulateur de transcription à localisation cytosolique (**Figure 59**) (Rodrigue *et al.*, 2000). L'activation de ces systèmes repose sur des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. Le domaine N-terminal du senseur forme une boucle extracellulaire à localisation périplasmique et constitue le domaine de reconnaissance d'un signal particulier. La reconnaissance du signal par la protéine senseur induit en général l'autophosphorylation d'un résidu histidine localisé dans le domaine histidine kinase en C-terminal de la protéine senseur. La molécule donneuse du groupement phosphate lors de cette autophosphorylation est l'ATP. Grâce à l'activité phosphotransférase de la protéine senseur, le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate localisé au niveau du domaine d'activation du régulateur transcriptionnel correspondant. Le régulateur transcriptionnel ainsi activé peut se fixer, *via* son domaine de liaison à l'ADN, sur des régions promotrices spécifiques pour activer ou réprimer la transcription de gènes cibles. Afin de limiter l'activation ou la répression de la transcription des gènes concernés, le régulateur transcriptionnel phosphorylé est rapidement inactivé grâce à une activité phosphatase qui, dans la majorité des systèmes à deux composants, se trouve au niveau de la protéine senseur (Mizuno, 1997).

### 2.3.2 Le système d'osmorégulation EnvZ/OmpR et l'activation de la voie $\sigma E$

Selon les conditions environnementales, la pression osmotique cytoplasmique des bactéries est variable. Afin de résister à une entrée d'eau, la bactérie doit mettre en place des mécanismes de transport pour maintenir la différence d'osmolarité entre le cytoplasme bactérien et le milieu extérieur. Par exemple, les entérobactéries doivent s'adapter aux



**Figure 60 : Régulation transcriptionnelle des gènes *ompF* et *ompC* par le régulateur transcriptionnel OmpR.**

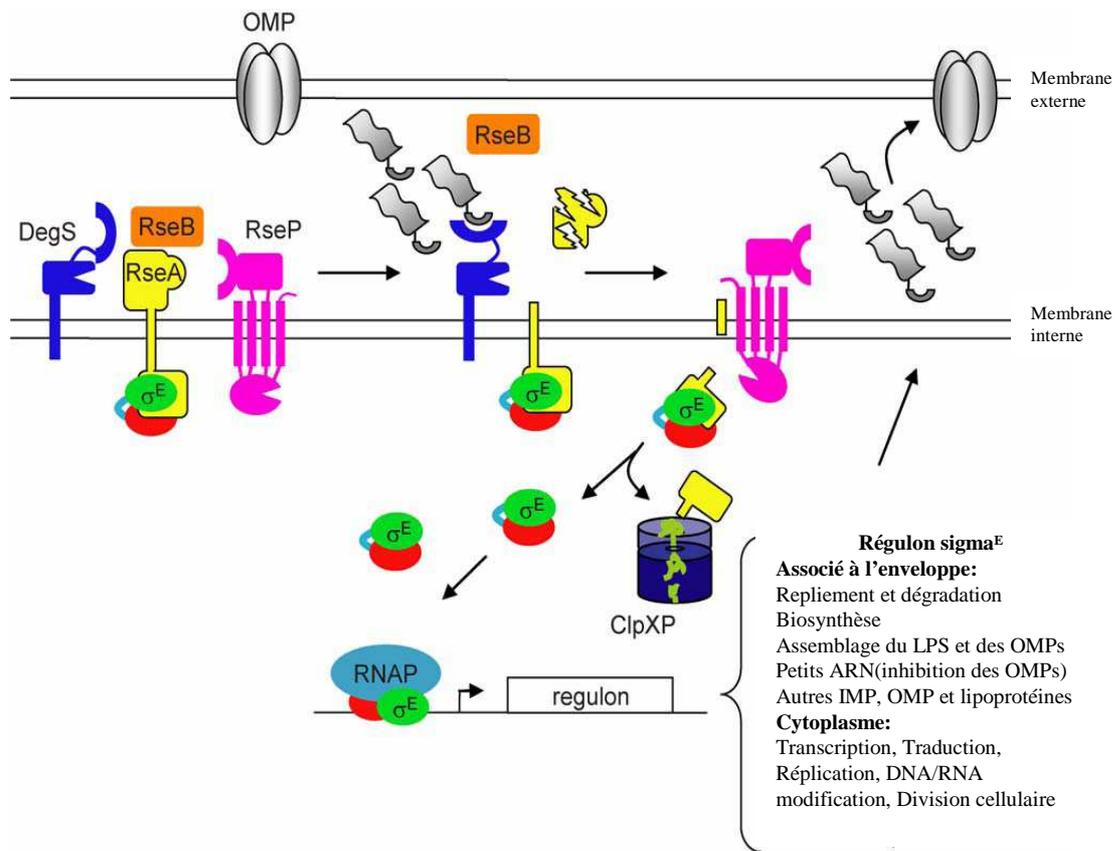
A faible osmolarité, les molécules OmpR-phosphorylées (OmpR-Ⓟ) se lient aux sites de fixation de forte affinité en amont du promoteur *ompF* et activent la transcription du gène *ompF*. A forte osmolarité, les molécules OmpR-Ⓟ se lient aux sites de fixation de forte et faible affinité en amont des promoteurs des gènes *ompC* et *ompF*, activant la transcription du gène *ompC* et réprimant la transcription du gène *ompF* (d'après Pratt *et al.*, 1996).

changements rapides d'osmolarité rencontrés le long du tractus intestinal, et pour cela elles possèdent le système à deux composants EnvZ/OmpR qui régule la transcription notamment des gènes codant les porines OmpC et OmpF permettant de modifier la perméabilité membranaire.

Les gènes *ompR* et *envZ*, codant **le système à deux composants EnvZ/OmpR**, sont regroupés dans un même opéron *ompB*. Ils sont transcrits en un seul ARNm polycistronique. Cependant, un plus grand nombre de molécules OmpR est accumulé comparativement au nombre de molécules EnvZ (Cai and Inouye, 2002). Il a pu être identifié environ 125 gènes dont l'expression est modulée par OmpR. Diverses fonctions bactériennes telles que la régulation de la pression osmotique, le métabolisme d'acides aminés (cystéine et leucine), la synthèse de transporteurs, le système de captation du fer (entérochéline) ou la synthèse de flagelles, sont sous le contrôle du système à deux composants EnvZ/OmpR (Takesue *et al.*, 2002).

Le mécanisme moléculaire de la régulation en réponse à l'osmolarité fait intervenir le système à deux composants EnvZ/OmpR (Inouye *et al.*, 2003; Pratt *et al.*, 1996). L'osmolarité est perçue par la protéine senseur EnvZ qui possède une activité kinase mais également une activité phosphatase. EnvZ transmet ainsi l'information au régulateur transcriptionnel OmpR en modulant son activité par phosphorylation ou déphosphorylation. A faible osmolarité, l'activité phosphatase de la protéine senseur EnvZ est légèrement supérieure à son activité kinase et le taux de protéines OmpR phosphorylé (OmpR-Ⓢ) est maintenu à un niveau faible. A forte osmolarité, l'activité phosphatase de la protéine EnvZ devient plus faible que son activité kinase, conduisant à une augmentation de la concentration cellulaire en régulateur transcriptionnel OmpR-Ⓢ, qui se fixe au niveau de la région promotrice des gènes cibles afin d'en moduler l'expression. En particulier, l'expression des gènes *ompC* et *ompF* est régulée par OmpR-Ⓢ : à de faibles concentrations en molécules OmpR-Ⓢ, *ompF* est activé alors qu'à de fortes concentrations en molécules OmpR-Ⓢ, *ompF* est réprimé et *ompC* est activé (Forst and Inouye, 1988; Mizuno and Mizushima, 1990; Pratt and Silhavy, 1995) (**Figure 60**).

OmpC et OmpF sont des porines, c'est-à-dire des **OMP** (« **Outer Membrane Protein** ») permettant la diffusion passive de petites molécules hydrophiles d'une taille inférieure à 600Da à travers la membrane externe (pour revues : Nikaido and Vaara, 1985; Nikaido, 2003). Ces deux porines principales OmpC et OmpF sont impliquées dans la diffusion passive de composés cationiques, OmpF permettant l'entrée de solutés de taille plus importante que



**Figure 61 : Activation de la voie sigma<sup>E</sup> par des stress périplasmiques.**

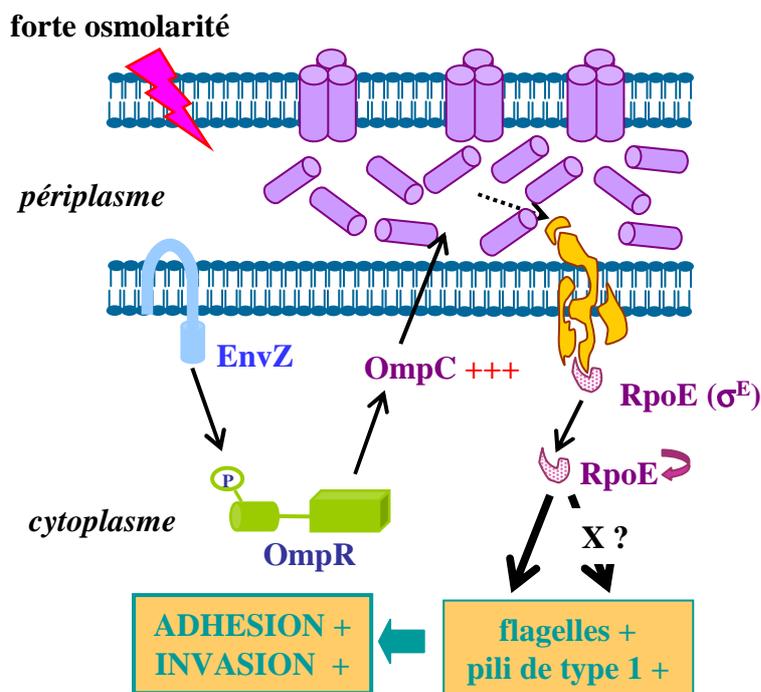
En présence d'un signal de stress dans le périplasm (mauvais repliement des Omp ou surexpression des Omp), la voie de régulation dépendante du facteur alternatif sigma<sup>E</sup> peut être activée. La mise en route de cette voie va conduire à la modulation de la transcription de gènes cibles de façon à permettre à la bactérie de répondre aux stress rencontrés. OMP: Outer membrane protein; IMP: Inner membrane protein (d'après Hayden et Ades, 2008).

OmpC en raison d'un pore d'un diamètre plus large (Basle *et al.*, 2006; Cowan *et al.*, 1992). OmpC et OmpF sont présentes sous forme de trimères au sein de la membrane externe et sont fortement associées à la couche de peptidoglycane par des liaisons non covalentes (Lambert, 1988). L'expression des gènes codant les porines OmpC et OmpF est régulée différemment en réponse à plusieurs facteurs environnementaux. Ainsi le rapport OmpC/OmpF varie en fonction de l'osmolarité du milieu, mais aussi en fonction du pH et de la disponibilité en nutriments (Heyde and Portalier, 1987; Liu and Ferenci, 2001; Pratt *et al.*, 1996). Il est à noter que les conditions de forte osmolarité et de température élevée observées dans l'intestin favorisent la production de protéines OmpC et répriment la production de protéines OmpF, limitant ainsi l'entrée des sels biliaries.

Lorsque les conditions environnementales, telles que l'osmolarité, favorisent une forte expression des OMP, leur accumulation périplasmique et/ou leur mauvais repliement active **la voie RpoE** (ou  $\sigma^E$ ) (**Figure 61**). La voie  $\sigma^E$ -dépendante fait appel à la sous-unité de l'ARN polymérase  $\sigma^E$ , à des protéines régulatrices de l'expression des gènes appartenant au régulon *RpoE RseABC* ainsi qu'à des protéases périplasmiques ou membranaires telles que DegS et RseP (Young and Hartl, 2003). La protéine RseA comprend un domaine C-terminal cytoplasmique interagissant avec le facteur  $\sigma^E$ , permettant ainsi sa séquestration à proximité de la membrane interne et empêchant sa fonctionnalité. En cas de stress, le mauvais repliement de certaines protéines permet l'exposition d'un motif C-terminal de type YQF, normalement masqué au sein de ces protéines, qui active DegS en interagissant avec son domaine PDZ. La protéase DegS clive le domaine périplasmique de RseA. Ce clivage est favorisé par RseP qui dégrade à son tour la région membranaire de RseA. Le facteur  $\sigma^E$  est alors libéré et fonctionnel et module l'expression de l'ensemble des gènes du régulon  $\sigma^E$  (Hayden and Ades, 2008; Young and Hartl, 2003).

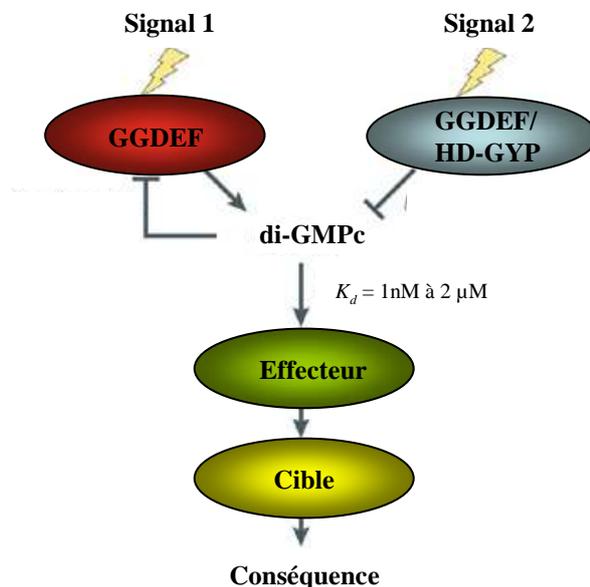
### **2.3.3. Implication du système d'osmorégulation EnvZ/OmpR et de la voie $\sigma^E$ dans la virulence de la souche AIEC LF82**

Depuis la première mise en évidence du rôle du système à deux composants EnvZ/OmpR dans la régulation de la virulence de *Shigella flexneri* (Bernardini *et al.*, 1990), de nombreuses études ont montré l'importance de ces systèmes dans la virulence d'autres espèces bactériennes.



**Figure 62 :** Modèle d'implication d'OmpC dans la virulence de la souche AIEC LF82.

L'osmolarité du tractus intestinal va activer la voie du système à deux composants OmpR/EnvZ, ce qui va se traduire par une augmentation de l'expression de OmpC. L'accumulation périplasmique de cette protéine va libérer le facteur de transcription alternatif RpoE qui est séquestré à la face interne de la membrane interne. Ce dernier va augmenter l'expression des pili de type 1 et des flagelles ainsi que d'autres facteurs de virulence (d'après Rolhion *et al.*, 2007).



**Figure 63 :** Voie de signalisation des seconds messagers : exemple du di-GMPc.

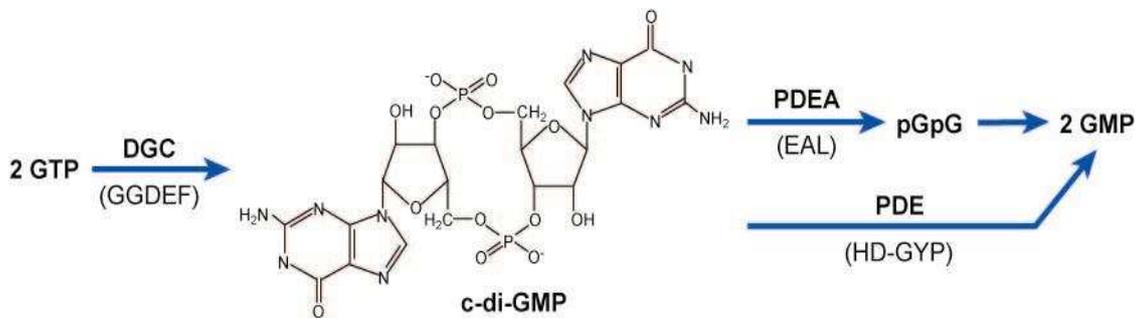
Les mécanismes de régulation faisant intervenir un second messenger se déroulent en différentes étapes : (1) un signal extérieur est détecté, (2) des enzymes (dans le cas présent il s'agit de protéines à domaine EAL, GGDEF et/ou HD-GYP) synthétisent ou dégradent le second messenger, (3) ce dernier interagit directement avec son effecteur afin de (4) réguler sa cible et ainsi contrôler des mécanismes cellulaires (d'après Hengge, 2009).

Dans la souche AIEC de référence LF82, la forte osmolarité de la lumière intestinale est perçue par le système à deux composants EnvZ/OmpR, ce qui provoque une augmentation de synthèse de la porine OmpC (Rolhion *et al.*, 2007). Le rapport entre le nombre de porines OmpC et OmpF présentes dans la paroi permet à la bactérie de modifier sa perméabilité membranaire (Hall and Silhavy, 1981). La surexpression d'OmpC engendre une accumulation anormale de protéines dans le périplasma bactérien, entraînant alors une activation de la voie de signalisation  $\sigma^E$  qui active l'expression des gènes codant les pili de type 1, les flagelles, mais aussi des facteurs de virulence non identifiés et impliqués dans l'interaction bactérie/cellule (Rolhion *et al.*, 2007). Cependant, chez une souche MG1655, la régulation passant par RpoE conduit à une diminution de l'expression des flagelles et des pili de type 1. Ainsi, le milieu intestinal pourrait constituer un signal clé dans le déclenchement de l'expression de gènes de virulence chez les souches AIEC associées à la MC. La différence de régulation de ces gènes chez les E.coli non-pathogènes et les AIEC pourrait représenter pour ces dernières un avantage adaptatif favorisant la colonisation de la muqueuse intestinale. (Rolhion *et al.*, 2007) (**Figure 62**). De plus, le haut niveau d'expression de OmpC chez la souche AIEC LF82, combinée avec une forte colonisation iléale par ces bactéries (Rolhion *et al.*, 2007), pourrait expliquer en partie les taux très élevés d'anticorps anti-OmpC retrouvés chez les patients atteints de MC (Franchimont *et al.*, 2004; Landers *et al.*, 2002).

#### 2.4. Seconds messagers bactériens

Les seconds messagers sont décrits comme des petites molécules synthétisées en réponse à un messenger primaire et impliquées dans des systèmes de transduction de signaux. Ce sont des molécules qui agissent dans des processus cellulaires tels que le métabolisme, la réponse au stress et l'expression de facteurs de virulence. Un mécanisme de régulation faisant intervenir un second messenger se découpe généralement en quatre points : un **signal extérieur** est transmis à des **enzymes** permettant la synthèse ou la dégradation du second messenger qui interagit directement avec son **effecteur** pour réguler une **cible** afin de modifier un mécanisme cellulaire particulier (**Figure 63**).

Différents seconds messagers sont décrits chez les bactéries et l'exemple le plus connu est l'implication de l'AMP cyclique dans la répression catabolique (voir paragraphe IV.1.2.). Le di-GMPc a été découvert dans les années 1980 chez *Gluconocetobacter xylinus* comme un activateur allostérique de la cellulose synthétase BcsA permettant la mise en place d'une matrice cellulolitique à sa surface (Aloni *et al.*, 1982; Ross *et al.*, 1987). Depuis, cette



**Figure 64 : Biosynthèse et dégradation du di-GMPc.**

Le di-GMPc est synthétisé à partir de deux GTP grâce à une di-guanylate cyclase (DGC) à domaine GGDEF. Il est hydrolysé par une phosphodiesterases A (PDE-A) à domaine EAL en pGpG linéaire avant d'être pris en charge par une PDE-B à domaine HD-GYP qui catalyse une hydrolyse en donnant deux molécules de GMP (d'après Tamayo *et al.*, 2007).

molécule a été décrite comme jouant un rôle de second messenger aux effets pléiotropiques chez la plupart des bactéries.

#### **2.4.1. Biosynthèse et hydrolyse du di-GMPc**

La concentration intracellulaire en di-GMPc est sous le contrôle de deux types d'enzymes cytoplasmiques ou membranaires aux activités opposées, appelées di-guanylate cyclase (DGC) et phosphodiesterases (PDE). Les DGC permettent la synthèse du di-GMPc en associant deux molécules de guanosine-triphosphate (GTP) en di-GMPc, alors que les PDE hydrolysent la molécule de di-GMPc en deux guanosine-monophosphate (GMP). Les PDE de type A (PDE-A) clivent de façon irréversible le di-GMPc en une molécule linéaire, le pGpG, qui est alors pris en charge par une PDE de type B (PDE-B) pour être dégradé en deux molécules de GMP (**Figure 64**). Ces enzymes, tout d'abord identifiées chez *G. xylinus*, possèdent des domaines protéiques particuliers appelés GGDEF pour les DGC, EAL pour les PDE-A et HD-GYP pour les PDE-B. Les protéines comprenant ces domaines sont retrouvées dans la plupart des espèces bactériennes mais sont absentes chez les archéobactéries et les eucaryotes. Ces observations suggèrent que le di-GMPc est un second messenger spécifique des bactéries (Galperin *et al.*, 2001). Cependant le nombre de protéines à domaine GGDEF, EAL et HD-GYP varie selon les espèces bactériennes. Il existe également des protéines comportant plusieurs domaines EAL, HD-GYP et/ou GGDEF, multipliant les combinaisons de régulation de la concentration en di-GMPc. A titre d'exemple, *E. coli* code 13 protéines à domaine GGDEF, 11 à domaine EAL, 6 à domaines EAL/GGDEF mais pas de protéine à domaine HD-GYP ; *Pseudomonas aeruginosa* code 19 protéines à domaine GGDEF, 5 à domaine EAL, 3 à domaine HD-GYP, et 16 à domaines EAL/GGDEF; et *Vibrio cholerae* code 31 protéines à domaine GGDEF, 22 à domaine EAL, 9 à domaine HD-GYP, et 10 à domaines EAL/GGDEF.

#### **2.4.2. Mécanismes d'action**

##### **i. La perception des signaux**

La concentration intracellulaire en di-GMPc dépend des enzymes di-guanylate cyclase (DGC) et phosphodiesterases (PDE) décrites précédemment mais aussi de leurs spécificités d'action (Pour revue : (Hengge, 2009; Ryan *et al.*, 2006; Tamayo *et al.*, 2007)). La plupart des protéines à domaine EAL, GGDEF et/ou HD-GYP possèdent un autre domaine en N-terminal qui leur sert de domaine senseur, rappelant ainsi le domaine histidine kinase des protéines senseurs des systèmes à deux composants. La présence de ce type de domaine suggère que



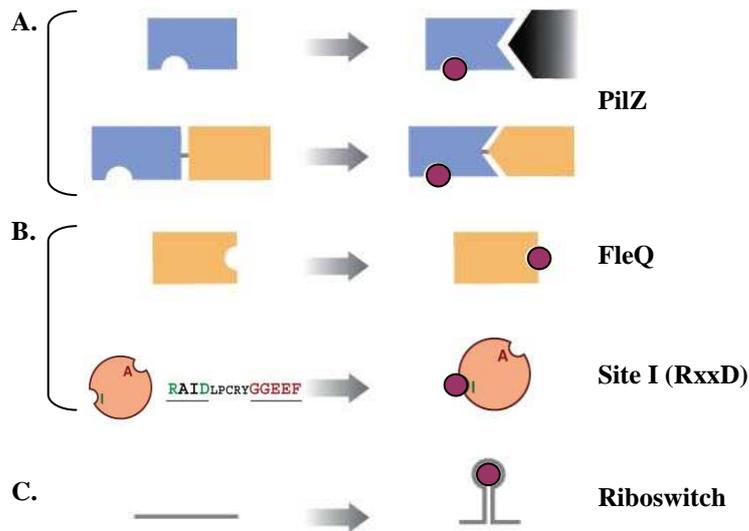
des signaux environnementaux et/ou cellulaires sont impliqués dans la régulation de la voie du di-GMPc. Certaines DGC ou PDE peuvent posséder un ou plusieurs domaine(s) transmembranaire(s) associé(s) au domaine senseur, ce qui permet à certaines bactéries à Gram négatif d'exposer des sites senseurs au niveau du périplasma. Plusieurs types de signaux environnementaux ou intracellulaires peuvent ainsi être perçus. Certains domaines sont spécifiques à un signal, par exemple le domaine **PAS** (photoactive yellow protein-like sensor domain) qui se lie à la flavine ou à l'hème permettant de signaler la présence de molécules d'oxygène ou les conditions redox. Les protéines à domaine **GAF** lient des mononucléotides cycliques et des protéines de faibles poids moléculaires, et celles à domaine **BLUF** (blue light using FAD), dépendant du FAD (flavin adenine dinucléotide), permettent de détecter la lumière bleue. Ces protéines à domaine BLUF sont présentes chez la plupart des bactéries et portent parfois un domaine EAL, comme c'est le cas notamment pour BlrP1 de *Klebsiella pneumoniae* et YcgF de *E. coli* (Barends *et al.*, 2009; Tschowri *et al.*, 2009).

Les DGC et les PDE peuvent également porter d'autres types de domaines caractéristiques de voies de transduction de signaux bactériens. Par exemple, le domaine **REC** est un domaine receveur des systèmes à deux composants. Il a été montré que la phosphorylation de ce domaine est nécessaire pour l'activité enzymatique des domaines EAL ou GGDEF associés, comme montré chez *Borrelia burgdorferi*, *Caulobacter crescentus* et *Vibrio cholerae* (Martinez-Wilson *et al.*, 2008; Ryjenkov *et al.*, 2005; Wassmann *et al.*, 2007).

Ainsi, il existerait un mécanisme par lequel un signal perçu permettrait une modulation directe de la concentration en second messager par la régulation des activités PDE et DGC. Pour conclure, certaines DGC ou PDE peuvent avoir plusieurs domaines senseurs, illustrant une nouvelle fois la complexité d'intégration des signaux et la flexibilité de la voie du di-GMPc.

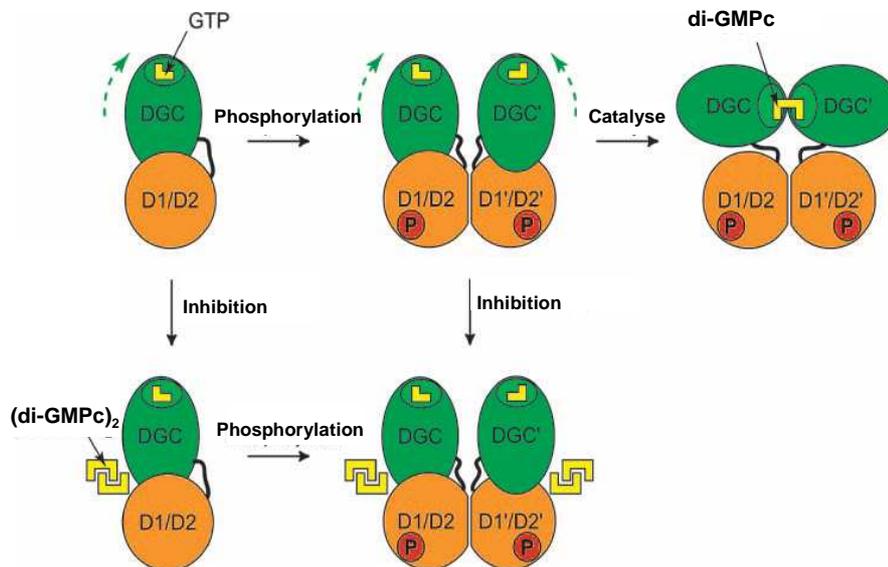
## **ii. Le transfert des signaux par la liaison à un effecteur**

Pour exercer ses fonctions, le di-GMPc doit fixer un effecteur afin d'en modifier la conformation et donc le fonctionnement. Les sites de fixation du di-GMPc sont variés, ce qui lui confère un large spectre d'action, et le plus étudié est le domaine **PilZ**. L'analyse structurale de la liaison du domaine PilZ avec le di-GMPc a montré que celle-ci entraînait un changement conformationnel de la protéine, justifiant ainsi la fonction de régulateur allostérique du di-GMPc (Benach *et al.*, 2007). La protéine à domaine PilZ peut porter elle-même l'activité effectrice, ou interagir par liaison protéine-protéine avec un effecteur. Le



**Figure 65 : Effecteurs putatifs du di-GMPc.**

**A.** Le di-GMPc (cercle rouge) peut se fixer au niveau du domaine de fixation du PilZ (bleu) et agir sur sa cible moléculaire (orange) associée ou consécutivement à une interaction protéine-protéine. **B.** Le di-GMPc peut interagir directement avec une cible métaboliquement active pouvant être une protéine régulatrice (exemple FleQ) ou des protéines à domaine GGDEF par la fixation du site I. **C.** Le di-GMPc peut s'associer au riboswitch (domaine GEMM) des ARNm pour réguler directement de façon positive ou négative la transcription (d'après Jenal et Malone, 2006).



**Figure 66 : Modèle d'autorégulation de la synthèse en di-GMPc: exemple de PleD chez *Caulobacter*.**

Le domaine catalytique DGC (vert) est lié au domaine D1/D2 (orange) tout en restant mobile. PleD est activé par la phosphorylation du domaine D1 qui induit une dimérisation de la protéine et permet la synthèse de di-GMPc à partir de deux GTP (jaune). Une inhibition allostérique se produit par la fixation de deux molécules de di-GMPc au site I immobilisant le site catabolique et inhibant sa propre synthèse (d'après Chan *et al.*, 2004).

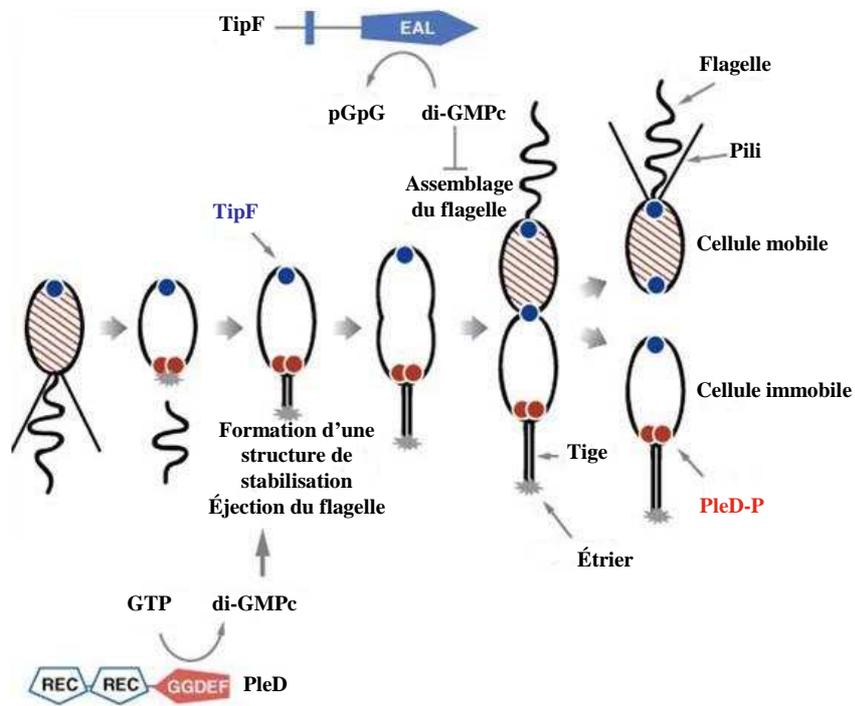
changement de conformation dû à la liaison du di-GMPc module donc l'activité effectrice de manière directe ou indirecte (**Figure 65A**). Il faut noter que les protéines effectrices peuvent comporter des domaines de type EAL, GGDEF ou HD-GYP permettant une auto-régulation de la concentration en di-GMPc. Chez *E. coli* il n'existe que deux protéines à domaine PilZ : une cellulose synthétase et la protéine YcgR servant de récepteur cellulaire au di-GMPc impliqué dans la régulation de la mobilité (Amikam and Galperin, 2006; Ko and Park, 2000).

Le di-GMPc peut aussi interagir directement avec la protéine cible métaboliquement active (**Figure 65B**). Par exemple chez *P. aeruginosa* il peut se lier directement au facteur de transcription FleQ et conduire à son inactivation (Hickman and Harwood, 2008). D'autres effecteurs à domaine GGDEF sont régulés négativement suite à la fixation du di-GMPc sur le site inhibiteur, **site I** (poche de fixation du di-GMP c), localisé proche du site A, site actif (motif GGDEF). C'est le cas pour la di-guanylate cyclase PleD qui, par la fixation de son propre produit, subit des modifications allostériques conduisant à son inactivation (**Figure 66**) (Chan *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), indiquant que l'auto-régulation de la concentration en di-GMPc est très fine au sein de la bactérie. Cependant il faut noter qu'il existe des protéines portant des sites I localisés en amont de sites A dégénérés, dans ce cas leur fonction reste mal connue.

Pour terminer, le di-GMPc est aussi un ligand pour des **riboswitchs (domaine GEMM)** qui sont des structures formées au niveau des régions 5' de certains ARN messagers, participant à la régulation de l'expression des gènes. La liaison allostérique du di-GMPc modifie la structure globale de l'ARN, ce qui influence positivement ou négativement la traduction et/ou la transcription (**Figure 65C**). Ceci a été démontré chez les eubactéries en général et ce passage depuis la forme « ARN libre » vers la forme « ARN associé au di-GMPc » permettrait de détecter les changements de concentration en di-GMPc afin d'adapter « le mode de vie » des bactéries (Kulshina *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Sudarsan *et al.*, 2008).

### **iii. Les cibles et la théorie du fractionnement spatio-temporel**

Le di-GMPc se fixe sur de nombreux récepteurs et cette diversité se reflète dans les cibles cellulaires et les mécanismes de régulation affectés. Le di-GMPc agit au niveau **transcriptionnel**, notamment par sa fixation au riboswitch, mais aussi par la régulation de facteurs de transcription comme par exemple FleQ (Hickman and Harwood, 2008). De plus, de nombreux exemples ont montré que le di-GMPc pouvait agir sur **l'activité enzymatique**. L'exemple le plus connu est celui de BcsA puisque la modification de l'activité cellulose

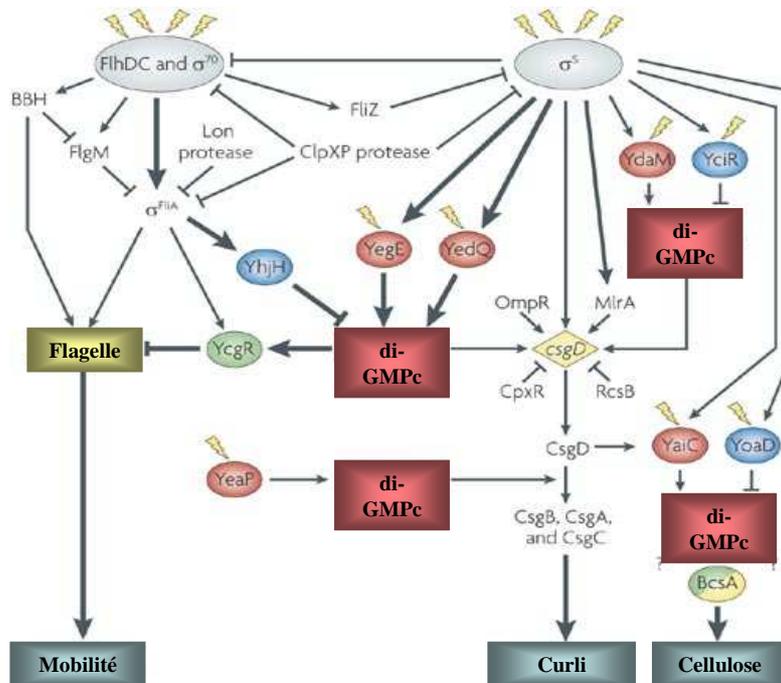


**Figure 67 : Fractionnement spatio-temporel de la concentration en di-GMPc.**

Exemple schématique de l'intégration de la voie du di-GMPc dans le cycle cellulaire de *C. crescentus* donnant naissance à deux bactéries filles: une mobile et une immobile. La protéine TipF à domaine EAL (bleu) est localisée à un pôle de la bactérie et la DGC PleD à domaine GGDEF (rouge) à l'autre pôle. La mise en place de flagelles dans la cellule mobile requiert l'action de TipF et donc un faible niveau en di-GMPc. En revanche, dans la cellule immobile, la perte de mobilité et la mise en place d'une structure de stabilisation (étrier et tige) nécessite une forte concentration en di-GMPc donc l'action de la protéine PleD (d'après Jenal et Malone, 2006).

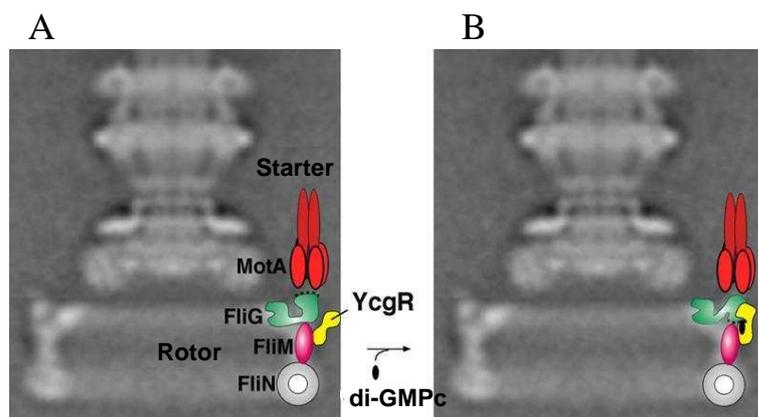
synthétase de cette protéine par le di-GMPc a permis la découverte de ce second messager (Aloni *et al.*, 1982; Ross *et al.*, 1987). Le di-GMPc agit également au niveau de **structures complexes** telles que le corps basal des flagelles. Chez *Caulobacter crescentus* et *E. coli*, la fixation du di-GMPc sur le domaine PilZ de la protéine DgrA ou de son homologue YcgR conduit à la formation d'un complexe qui interfère directement ou indirectement avec le moteur du flagelle et conduit à son inactivité (Christen *et al.*, 2007; Ko and Park, 2000). Pour terminer, le di-GMPc peut aussi intervenir indirectement sur **la dégradation protéolytique** de facteurs bactériens. En effet, chez *C. crescentus* la liaison du di-GMPc au site I de la protéine à domaine GGDEF PopA conduit à la libération du régulateur du cycle cellulaire CtrA. CtrA sera alors dégradé par la protéase ClpXP, permettant ainsi la progression du cycle cellulaire (Duerig *et al.*, 2009).

Les récepteurs du di-GMPc et les cibles des processus de régulation par ce second messager sont très variés, ce qui lui confère un rôle pléiotropique dans le métabolisme bactérien. Il semblerait que l'ensemble soit contrôlé par un phénomène de **séquestration temporelle et/ou spatiale** du second messager. En effet, les différentes DGC et PDE ne sont pas exprimées et/ou activées en même temps, il existe des spécificités de réponse à certains signaux comme décrit précédemment. Il a été montré que la concentration intracellulaire en di-GMPc varie en fonction de la phase de croissance bactérienne, elle est notamment très diminuée en fin de phase stationnaire chez *S. Typhimurium* (Simm *et al.*, 2009). De nombreux auteurs suggèrent l'existence d'une micro-compartmentation des concentrations en di-GMPc grâce à une localisation très spécifique des PDE et DGC au sein même de la bactérie. L'exemple le plus marquant est celui de la division cellulaire asymétrique de *C. crescentus* (**Figure 67**) (pour revue : (Jenal and Malone, 2006). L'expression polaire de la protéine à domaine GGDEF PleD conduit à une augmentation localisée de la concentration en di-GMPc qui permet la mise en place d'une structure de fixation dans une des bactéries filles. A l'autre pôle est recrutée la protéine à domaine EAL TipF qui par son activité PDE fait chuter localement la concentration en di-GMPc, entraînant notamment la mise en place d'une structure flagellaire rendant l'autre bactérie fille mobile. Cet exemple montre à quel point une régulation compartimentée de la concentration en second messager peut jouer un rôle important dans la physiologie bactérienne.



**Figure 68 : Voie de signalisation du di-GMPc chez *E. coli*.**

Durant la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire de croissance, *E. coli* inhibe l'expression des flagelles et induit celle des curli. En haut de la cascade de régulation se retrouvent différentes sous unités sigma de l'ARN polymérase en compétitions ainsi que FlhZ qui inhibe sigma<sup>S</sup>. Le niveau de régulation inférieur fait intervenir le di-GMPc pour la transition de la mobilité à l'immobilité. La concentration en di-GMPc est régulée de façon opposée par les DGCs à domaine GGDEF (YegE et YedQ) dépendante de sigma<sup>S</sup> et la PDE à domaine EAL YdhH dépendante du régulon flagellaire. Lorsque la synthèse des flagelles s'arrête, lors de l'entrée en phase stationnaire, la protéase ClpX dégrade le régulateur FlhDC ne permettant plus l'activation d'YdhH et donc une accumulation de di-GMPc. Ce second messager fixe alors son effecteur YcgR et inhibe la synthèse des flagelles. De plus, la transcription de *csgD* (Régulateur de l'expression des curli) est sous le contrôle de YegE et d'autres enzymes de la voie du di-GMPc comme YdaM et YciR. Pour terminer, la DGC YaiC sous le contrôle de CsgD est requise pour la production de cellulose et son effet est contrebalancé par YoaD (d'après Hengge, 2009).



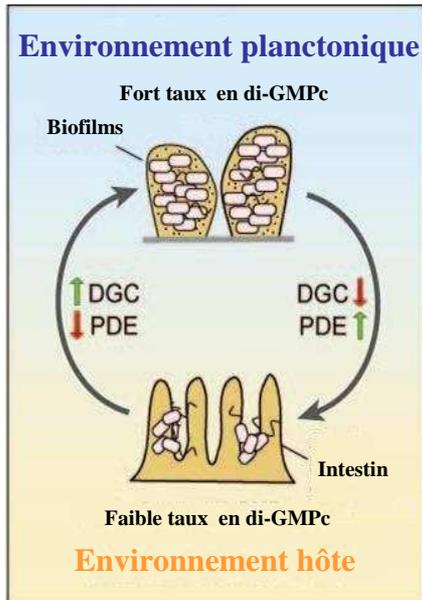
**Figure 69 : Modèle montrant le rôle de YcgR dans le contrôle de la mobilité.**

**A.** Représentation schématique du rotor (FliG (vert), FliM (rose), et FliN (gris)) et du complexe protéique du starter (rouge) du flagelle. YcgR (jaune) est représenté relié à FliM. La partie chargée du domaine C-terminal de FliG est le site d'interaction avec le complexe starter. **B.** La liaison du di-GMPc au domaine N-terminal de YcgR entraîne son repliement permettant sa fixation au domaine C-terminal de FliG. Cette interaction induit une réorientation du domaine C-terminal de FliG et donc un réarrangement protéique empêchant la liaison rotor/starter (d'après Paul *et al.*, 2010). Microscopie électronique : Brown *et al.*, 2007.

### 2.4.3. Exemples de régulations géniques dépendantes du di-GMPc chez des bacilles à Gram négatif

Il apparaît que la concentration en di-GMPc régule inversement la formation de biofilms ou « vie sédentaire » et la synthèse de flagelles ou « vie nomade » chez les bacilles à Gram négatif. Dans cette étude bibliographique, nous nous intéresserons dans un premier temps à l'implication de ce second messager chez *E. coli* où plusieurs couples d'enzymes de type PDE et DGC agissent de manière coordonnée sur la transition de la mobilité à l'immobilité en régulant de façon différentielle l'expression des flagelles et celles des curli ainsi que la synthèse de la cellulose (**Figure 68**) (Pour revue : Hengge, 2009, Tamayo *et al.*, 2007 et Cotter and Stibitz, 2007). Ce phénomène fait intervenir d'une part le régulateur de la voie flagellaire FliA contrôlant *yjH*, et d'autre part par le régulateur général de la réponse aux stress sigma S contrôlant *yegE* et *yedQ*. YjH par son activité PDE dégrade le di-GMPc et permet la mobilité bactérienne. En phase stationnaire de croissance, lorsque la voie sigmaS est activée, les enzymes de type DGC YegE et YedQ sont exprimées et synthétisent du di-GMPc qui se fixe alors au domaine PilZ d'YcgR et inhibe la mobilité (Girgis *et al.*, 2007; Pesavento *et al.*, 2008; Ryjenkov *et al.*, 2006). Ce mécanisme d'inhibition a récemment été décrit par Paul et coll. comme une action mécanique de « freinage » où le complexe di-GMPc/YcgR se fixe aux sous-unités FliM et FliG, ce qui entraîne le blocage du rotor flagellaire (**Figure 69**) (Paul *et al.* 2010). Ainsi, lorsqu'il y a accumulation de di-GMPc, la mobilité est réprimée mais en contre-partie il y a induction de l'expression des curli et de la synthèse de cellulose par activation transcriptionnelle du régulateur positif CsgD. Ce système coopère avec deux autres couples de protéines à domaines EAL/GGDEF (YdaM/YciR et YaiC/YoaD) qui contrôlent exclusivement l'expression des curli et la synthèse de cellulose sans agir sur la mobilité (Brombacher *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006). La concentration en second messager influe donc sur le mode de vie bactérien. En résumé, si elle est faible la bactérie est mobile, si elle est élevée la bactérie reste statique.

Le contrôle exercé au travers de la concentration en di-GMPc sur la transition entre deux états physiologiques est souvent observé chez les bactéries pathogènes comme *Vibrio cholerae*, *S. Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* chez qui le di-GMPc régule inversement la formation de biofilm et la virulence. Par exemple la variation de concentration en di-GMPc permet à *V. cholerae* de s'adapter à son environnement (**Figure 70**). En effet, chez son hôte la bactérie va capter des signaux activant le système VieSAB conduisant à l'expression de la PDE à domaine EAL VieA et donc à une dégradation du di-GMPc. Lorsque la concentration en di-GMPc est faible, il y a activation transcriptionnelle des gènes de virulence *ctxAB*

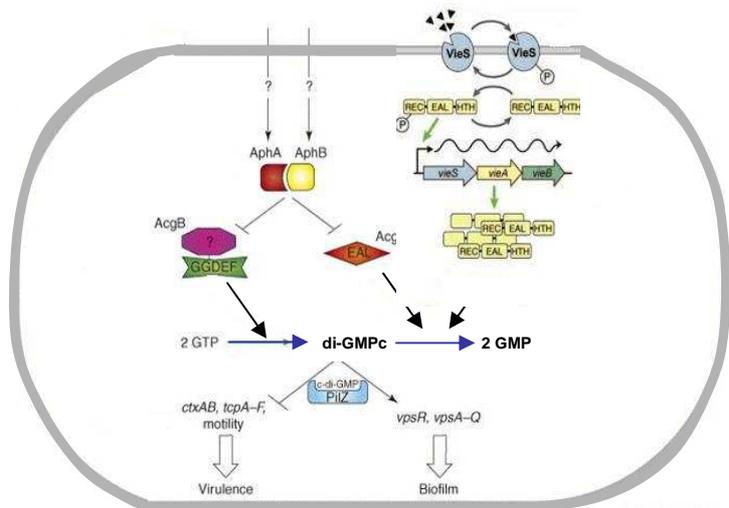


**Figure 70 : Modèle d'implication du di-GMPc dans l'adaptation de *V. cholerae* à son environnement.**

La variation de concentration en di-GMPc régulée par les PDEs et DGCs permet à la bactérie d'adapter son « mode de vie » à son environnement. Lorsque la concentration en di-GMPc est élevée la bactérie va survivre dans son réservoir en formant un biofilm. Chez l'hôte, lorsque le niveau en second messager est faible, la bactérie va exprimer ses différents facteurs de virulence (d'après Tamayo *et al.*, 2007).

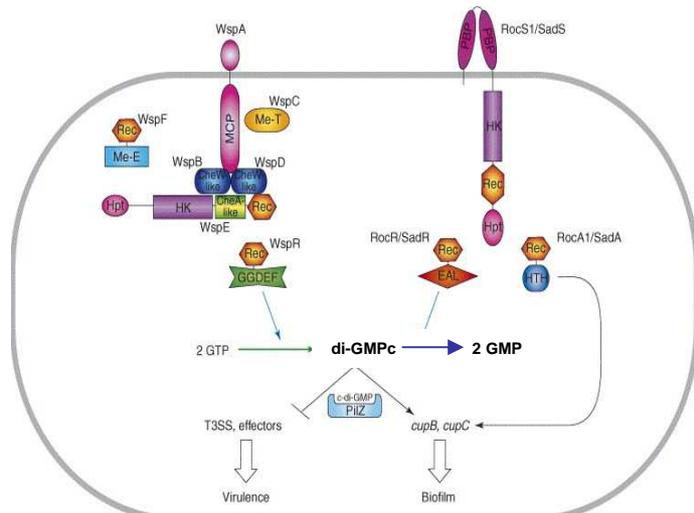
**Figure 71 : Modèle d'implication du di-GMPc dans la régulation des facteurs de virulence de *V. cholerae*.**

Lorsque la bactérie se retrouve chez son hôte, la perception de signaux (encore inconnu) conduit à la diminution de concentration en di-GMPc et à l'expression de facteurs de virulence (toxine cholérique *ctxAB*, pili *tcpA-F* et flagelles). Deux voies distinctes faisant intervenir le di-GMPc agissent parallèlement : le système AphA-B/ AcgA-B et vieSAB (d'après Cotter et Stibitz, 2007; Tamayo *et al.*, 2007).



**Figure 72 : Modèle d'implication du di-GMPc dans la régulation des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.**

Deux mécanismes de réponse à des signaux environnementaux agissent de façon opposé sur la régulation de la concentration en di-GMPc pour exercer un « switch » entre virulence (système de sécrétion de type III) et formation de biofilm (gènes *cup*). L'un d'eux fait intervenir le locus *wsp*, activant la protéine à domaine GGDEF WspR, et l'autre le système à deux composant *rocSRA*, activant le receveur à domaine EAL RocR (d'après Cotter et Stibitz, 2007).



(cholera toxin) et *tcpA-F* (toxin co-regulated pilus) et inhibition des gènes *vpsA-Q* (*Vibrio* polysaccharide synthesis) permettant la mise en place de biofilm (**Figure 71**) (Cotter and Stibitz, 2007). Récemment, il a été mis en évidence que la protéine VspT interagit directement avec le di-GMPc et joue alors le rôle de régulateur transcriptionnel agissant inversement sur la synthèse des biofilms et la mobilité (Krasteva *et al.*). Ce système n'est pas le seul système de régulation de la virulence faisant intervenir le di-GMPc chez *V. cholerae* puisqu'il a aussi été montré l'implication d'autres protéines à domaines EAL et GGDEF telles que AcgA et B contrôlées par le régulateur transcriptionnel AphA.

Un autre exemple bien décrit dans la littérature est celui de *P. aeruginosa*. Deux systèmes indépendants agissent sur la concentration en di-GMPc en réponse à des signaux environnementaux pour contrôler la transition entre l'expression de la virulence (mise en place du système de sécrétion de type III) et la formation de biofilm (expression des gènes *cup*) (**Figure 72**). L'un d'eux fait intervenir le locus *wsp* afin d'activer la protéine à domaine GGDEF WspR. Parallèlement, le système à deux composants *rocSRA* permet l'expression du gène *rocR* codant un receveur comportant aussi un domaine EAL (Cotter and Stibitz, 2007). D'autres protéines de *P. aeruginosa* régulant la concentration en second messenger sont impliquées dans la virulence, notamment les protéines à domaine HD-GYP (Ryan *et al.*, 2009) et la protéine à domaine EAL PvrR qui contrebalance l'activation des gènes *cup* par le régulateur transcriptionnel RcsB (Mikkelsen *et al.*, 2009).



# **TRAVAUX PERSONNELS**



## Présentation des résultats

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire avait pour objectif la compréhension des mécanismes permettant l'expression de la virulence des souches AIEC, à la fois en modèle cellulaire et en modèle murin de colite induite, afin d'identifier les facteurs bactériens et les facteurs de l'hôte impliqués dans la colonisation intestinale des AIEC et le développement de l'inflammation.

➤ Une première étude, partant de l'observation qu'un mutant n'exprimant plus de flagelles perd de façon concomitante sa capacité à synthétiser des pili de type 1, porte sur la co-régulation de l'expression de ces différentes structures de surface. Nous avons pu montrer que cette co-régulation complexe dépend du taux de di-GMP cyclique. En effet le régulateur FliA du régulon flagellaire active l'expression de la phosphodiesterase à domaine EAL YhjH. Cette enzyme est responsable de la dégradation du di-GMP cyclique. La diminution de la concentration intracellulaire de ce second messager bactérien entraîne notamment l'activation des gènes permettant la synthèse des pili de type 1.

➤ Une seconde étude présente le rôle des protéines histone-like dans la régulation de la virulence de la souche AIEC LF82 et indique que parmi celles-ci la protéine de type-histone Fis dont l'expression est diminuée au contact des cellules épithéliales intestinales en culture (I-407) joue un rôle clé. En effet au contact des cellules, l'expression de la recombinase FimE, permettant une inversion du promoteur de l'opéron *fim* du ON vers le OFF, n'est plus activée et ceci conduit à une surexpression des pili de type 1.

➤ Une dernière étude portant sur l'annotation et l'analyse du génome de la souche de référence AIEC LF82 a permis de mieux caractériser cette souche et de confirmer, par multiples approches (MLST, identification de CRISPR, comparaisons génétiques), son appartenance au groupe B2 comprenant la plupart de *E. coli* pathogènes. De plus cette annotation a permis de mettre en évidence l'existence de gènes spécifiques, de potentiels îlots de pathogénicité et de facteurs de virulence restant à caractériser pour mieux appréhender le rôle de ces souches dans la maladie de Crohn.



➤ **1. Le facteur flagellaire sigma FliA régule les capacités d'adhésion et d'invasion d'*Escherichia coli* associés à la maladie de Crohn via la voie dépendante du di-GMP cyclique.**

**Publication n°1**

Laurent Claret, **Sylvie Miquel**, Natacha Vieille, Dmitri A. Ryjenkov, Mark Gomelsky, and Arlette Darfeuille-Michaud.

**The Flagellar Sigma Factor FliA Regulates Adhesion and Invasion of Crohn Disease-associated *Escherichia coli* via a Cyclic Dimeric GMP- dependent Pathway**

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 282, NO. 46, pp. 33275–33283,  
November 16, 2007



## Introduction

Chez les patients atteints de MC, une prévalence élevée de souches de *E. coli* fortement associées à la muqueuse a été retrouvée au niveau iléal, pouvant représenter jusqu'à 100% de la flore totale aéro-anaérobie (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Ces bactéries nommées AIEC pour Adherent-Invasive *E. coli* présentent un fort pouvoir d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales en culture. De telles bactéries pathogènes ont été isolées au niveau iléal chez 36,4% de patients atteints de MC contre seulement 6,0% chez des sujets contrôles (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Il semblerait que ce pathovar de *E. coli* possède des caractéristiques lui permettant une très bonne adaptation au tractus intestinal.

Les flagelles, synthétisés par un grand nombre d'espèces bactériennes, sont responsables de la mobilité et par conséquent de la virulence de certaines bactéries pathogènes. En effet, la mobilité conférée par les flagelles est indispensable au pouvoir invasif de certains micro-organismes, tels que les *E. coli* entéropathogènes (Giron *et al.*, 2002), *Salmonella* serovars Typhimurium et Enteritidis (Dibb-Fuller *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2001), *Campylobacter jejunii* (Yao *et al.*, 1994) ou *Vibrio anguillarum* (Ormonde *et al.*, 2000). Cependant, le rôle des flagelles dans l'invasion n'est pas toujours restreint à la mobilité qu'ils confèrent aux bactéries. En effet, une étape de centrifugation permettant d'établir un contact étroit entre la bactérie et les cellules épithéliales, ne permet pas à un mutant non flagellé de *Pseudomonas aeruginosa* de pénétrer dans les cellules épithéliales en culture (Fleiszig *et al.*, 2001). Chez la souche AIEC LF82, les flagelles jouent un rôle important dans l'interaction des bactéries AIEC avec les cellules épithéliales par la mobilité qu'ils confèrent aux bactéries mais également en régulant l'expression des pili de type 1 (adhésine majeure des souches AIEC reconnaissant le récepteur CEACAM6 au niveau des entérocytes) et d'autres facteurs restant à identifier (Barnich *et al.*, 2003). De plus, les flagelles jouent un rôle important dans l'aggravation d'une colite induite au DSS (Carvalho *et al.*, 2008). En effet, La détection de flagelline par les récepteurs de l'immunité innée TLR-5 et IPAF induit la production de cytokines proinflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-6 (Carvalho *et al.*, 2008).

Des travaux antérieurs menés au laboratoire avaient mis en évidence l'existence de systèmes de régulation de la virulence chez les bactéries AIEC lors de l'étude du comportement de mutants de la souche AIEC LF82 dépourvus de flagelles. La délétion du gène *fliC*, codant la flagelline FliC, sous-unité structurale majeure des flagelles, entraîne une



diminution de l'expression de l'opéron *flhDC* mettant ainsi en évidence l'existence d'un rétro-contrôle négatif au sein de la voie flagellaire chez la souche AIEC LF82. L'objectif de cette première partie de mon travail de thèse a été d'identifier les différents intermédiaires impliqués dans la régulation coordonnée des flagelles et des pili de type 1 chez la souche AIEC LF82.



# The Flagellar Sigma Factor FliA Regulates Adhesion and Invasion of Crohn Disease-associated *Escherichia coli* via a Cyclic Dimeric GMP-dependent Pathway<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, April 2, 2007, and in revised form, July 24, 2007. Published, JBC Papers in Press, September 7, 2007, DOI 10.1074/jbc.M702800200

Laurent Claret<sup>†‡§1</sup>, Sylvie Miquel<sup>†§</sup>, Natacha Vieille<sup>‡</sup>, Dmitri A. Ryjenkov<sup>¶</sup>, Mark Gomelsky<sup>¶</sup>, and Arlette Darfeuille-Michaud<sup>†§</sup>

From the <sup>†</sup>Université Clermont 1, Pathogénie Bactérienne Intestinale, Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Sous Contrat 2018 (USC INRA 2018), Clermont-Ferrand F-63001, France, the <sup>§</sup>Institut Universitaire de Technologie en Génie Biologique, Aubière F-63172, France, and the <sup>¶</sup>Department of Molecular Biology, University of Wyoming, Laramie, Wyoming, 82071

The invasion of intestinal epithelial cells by the Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain LF82 depends on surface appendages, such as type 1 pili and flagella. The absence of flagella in the AIEC strain LF82 results in a concomitant loss of type 1 pili. Here, we show that flagellar regulators, transcriptional activator FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, and sigma factor FliA are involved in the coordination of flagellar and type 1 pili synthesis. In the deletion mutants lacking these regulators, type 1 pili synthesis, adhesion, and invasion were severely decreased. FliA expressed alone in *trans* was sufficient to restore these defects in both the LF82- $\Delta$ flhD and LF82- $\Delta$ fliA mutants. We related the loss of type 1 pili to the decreased expression of the FliA-dependent *yhjH* gene in the LF82- $\Delta$ fliA mutant. YhjH is an EAL domain phosphodiesterase involved in degradation of the bacterial second messenger cyclic dimeric GMP (c-di-GMP). Increased expression of either *yhjH* or an alternative c-di-GMP phosphodiesterase, *yahA*, partially restored type 1 pili synthesis, adhesion, and invasion in the LF82- $\Delta$ fliA mutant. Deletion of the GGDEF domain diguanylate cyclase gene, *yaiC*, involved in c-di-GMP synthesis in the LF82- $\Delta$ fliA mutant also partially restored these defects, whereas overexpression of the c-di-GMP receptor YcgR had the opposite effect. These findings show that in the AIEC strain LF82, FliA is a key regulatory component linking flagellar and type 1 pili synthesis and that its effect on type 1 pili is mediated, at least in part, via a c-di-GMP-dependent pathway.

Many virulent bacteria, including *Aeromonas caviae* (1), *Campylobacter jejuni* (2), *Clostridium difficile* (3), *Helicobacter*

*pylori* (4), *Legionella pneumophila* (5), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (6), and *Vibrio cholerae* (7), use flagellar motility to avoid unfavorable environments and to establish replication niches at different stages of infection. In *Enterobacteriaceae*, flagellar type III secretion and assembly are strictly dependent on the organization of a hierarchy that controls the sequential expression of structural and regulatory genes. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, the heterotetrameric transcription factor FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> (8) is positioned at the top of the flagellar expression hierarchy, where the decision to produce flagella is made (9, 10). The *flhDC* operon encoding FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> is transcribed from a class 1 flagellar promoter. FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, in turn, activates  $\sigma^{70}$ -dependent transcription from the class 2 flagellar promoters that drive expression of the structural subunits required for the hook-basal body structure and expression of regulatory subunits (10, 11). One of these regulatory subunits,  $\sigma^{28}$  or FliA, is encoded by the *fliAZ* operon. FliA can associate with the core RNA polymerase to drive transcription of the class 3 flagellar genes (12). The activity of FliA depends on its interaction with the cytoplasmic anti-sigma factor FlgM, which inhibits the FliA-RNA polymerase association until completion of the hook-basal body assembly, at which point the anti-sigma factor is secreted (13). It has been suggested that additional negative feedback loops exist to ensure that every stage of flagellar assembly is signaled prior to synthesis of the components for the next stage. This feedback control allows cells to avoid costly production of unnecessary flagellar subunits (14).

Global transcriptional profiling in *E. coli* (15), *S. typhimurium* (16), and *Yersinia enterocolitica* (17, 18) demonstrated that flagellar regulators FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA control numerous genes other than those involved in flagellar biogenesis. These flagellar regulators have been shown to affect the synthesis of virulence factors, directly and indirectly, such as secreted hemolysin in *Proteus mirabilis* (19), the type III secretion system-1 in *Salmonella* (20), the Lap phospholipase in *Y. enterocolitica* (21–23), an exoenzyme in *Xenorhabdus nematophila* (24, 25), an invasion factor in *C. jejuni* (26), and factors involved in the intracellular growth of *L. pneumophila* in amoebas and determinants for the cytotoxicity against macrophages (27, 28). Together, these findings indicate that coordinated regulation of motility and virulence factor synthesis is not limited to *Enterobacteriaceae*.

<sup>\*</sup> This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie (EA3844), INRA (USC-2018), grants from the Association F. Aupetit and Institut de Recherche des Maladies de l'Appareil Digestif (Laboratoire Astra France), and United States Department of Agriculture Cooperative State Research Education Extension Service Grant AD-417 via Agricultural Experimental Station Project WYO-414-07 (to M. G.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table 1.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Pathogénie Bactérienne Intestinale, Laboratoire de bactériologie, CBRV, 28 Place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France. Tel.: 33-4-73-17-79-97; Fax: 33-4-73-17-83-71; E-mail: laurent.claret@u-clermont1.fr.



**TABLE 1**

Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Strains</b>		
LF82	<i>E. coli</i> isolated from an ileal biopsy of a patient with CD	Ref. 54
LF82- $\Delta$ <i>fliC</i>	LF82 mutant deleted of <i>fliC</i> gene	Ref. 32
U306	<i>E. coli</i> K-12 mutant deleted of <i>flhD</i> gene, chloramphenicol <sup>f</sup>	Ref. 55
U309	<i>E. coli</i> K-12 mutant deleted of <i>fliA</i> gene, chloramphenicol <sup>f</sup>	Ref. 55
LF82- $\Delta$ <i>flhD</i>	LF82 mutant deleted of <i>flhD</i> gene from U306	This study
LF82- $\Delta$ <i>fliA</i>	LF82 mutant deleted of <i>fliA</i> gene from U309	This study
LF82- <i>fimA</i> :: Tn5 <i>phoA</i>	Tn5- <i>phoA</i> insertion into <i>fimA</i> of strain LF82	Ref. 31
LF82- $\Delta$ <i>fliZ</i>	LF82 mutant deleted of <i>fliZ</i> gene	This study
LF82- $\Delta$ <i>yaiC</i>	LF82 mutant deleted of <i>yaiC</i> gene	This study
LF82- $\Delta$ <i>fliADyaiC</i>	LF82 mutant deleted of <i>fliA</i> and <i>yaiC</i> genes	This study
LF82- $\Delta$ <i>ycgR</i>	LF82 mutant deleted of <i>ycgR</i> gene	This study
LF82- $\Delta$ <i>fliADycgR</i>	LF82 mutant deleted of <i>fliA</i> and <i>ycgR</i> genes	This study
LF82- $\Delta$ <i>BcsC</i>	LF82 mutant deleted of <i>BcsC</i> gene	This study
<b>Plasmids</b>		
pKOBEG	pBAD cloning vector harboring 1 phage <i>red<math>\gamma</math><math>\beta</math><math>\alpha</math></i> operon, chloramphenicol <sup>f</sup>	Ref. 36
pKD46	pBAD cloning vector harbouring 1 phage <i>red<math>\gamma</math><math>\beta</math><math>\alpha</math></i> operon, ampicillin <sup>f</sup>	Ref. 35
pKD4	Plasmid carrying a kanamycin resistance cassette	Ref. 35
pBAD18	<i>E. coli</i> cloning vector, ampicillin <sup>f</sup>	Ref. 56
pBAD <i>flhDC</i>	pBAD18 harboring the entire <i>flhDC</i> operon of LF82 <i>E. coli</i> , amplified with <i>flhDCFHind</i> and <i>flhDCRXba</i>	This study
pBAD <i>fliA</i>	pBAD18 harboring the entire <i>fliA</i> gene of LF82 <i>E. coli</i> , amplified with <i>fliAHind</i> and <i>fliARXba</i>	This study
pBAD <i>yhjH</i>	pBAD18 harboring the entire <i>yhjH</i> gene of LF82 <i>E. coli</i> , amplified with <i>yhjHEcoF</i> and <i>yhjHHindR</i>	This study
pBAD <i>yaiC</i>	pBAD18 harboring the entire <i>yaiC</i> gene of LF82 <i>E. coli</i> , amplified with <i>yaiCXbaF</i> and <i>yaiCHindR</i>	This study
pLITMUS28	Ampicillin <sup>f</sup> vector	NEB
pL <i>yahA</i> $\Omega$	pLITMUS28 harboring the <i>yahA</i> gene from MG1655 <i>E. coli</i>	Gomelsky
pUC19	<i>E. coli</i> cloning vector, <i>oriColE1</i> , ampicillin <sup>f</sup>	Biolabs
<i>ycgR</i>	pMS258 harboring the entire <i>ycgR</i> gene of <i>E. coli</i> K12 cloned in pUC19	Ref. 39
pORN104	Plasmid harboring the entire <i>fim</i> operon of K12 <i>E. coli</i> strain J96 cloned in pRN2010	Ref. 57
pRN2010	Cloning plasmid	Ref. 57

Our study concerns a new pathogenic group of *E. coli* associated with ileal lesions of Crohn disease (29, 30). The strains belonging to this pathovar, designated adherent-invasive *E. coli* (AIEC), are able to adhere to and to invade intestinal epithelial cells and replicate within macrophages (29). AIEC adhesion to and invasion depend on the type 1 pili that are involved in triggering membrane extensions in epithelial cells (31). However, the type 1 pili of AIEC reference strain LF82 are not able to confer invasiveness to a nonpathogenic *E. coli* strain K-12, which proves that the genetic background of AIEC is essential.

Flagella play important roles in the adhesion to and invasion of strain LF82 (32). The nonmotile aflagellar LF82- $\Delta$ *fliC* mutant shows a drastic down-regulation of type 1 pili synthesis, a decrease in adhesion and invasion abilities, and a feedback-induced decrease in the flagellar regulator *flhDC* mRNA levels. This demonstrates that, in strain LF82, as in other bacteria mentioned above, flagellar motility and other factors are coregulated. In this report, we gained insights into the coregulation of flagella, type 1 pili synthesis, adhesion, and invasion in strain LF82. We disrupted the *flhD* and *fliA* genes to test whether FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA are involved in the direct or indirect transcriptional regulation of genes encoding type 1 pili. We further show that FliA affects phase variation, which results in increased type 1 synthesis via a regulatory pathway involving a novel second messenger, cyclic dimeric GMP (c-di-GMP).<sup>2</sup>

**EXPERIMENTAL PROCEDURES**

**Bacterial Strains, Plasmids, and Cell Lines**—Strain AIEC LF82 was isolated from a chronic ileal lesion of a patient with Crohn disease and belongs to *E. coli* serotype O83:H1. It adheres to and invades HEp-2, Intestine-407, and Caco-2 cells

(29). *E. coli* strain JM109 was used as host strain for cloning experiments. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

Plasmid vector pBAD18 was used in cloning experiments. Bacteria were grown routinely in LB broth or on LB agar plates overnight at 37 °C. Antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin (50 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), and chloramphenicol (25 µg/ml).

Intestine-407 cells (derived from human intestinal embryonic jejunum and ileum) were purchased from Flow Laboratories, Inc. (McLean, VA). Cultured cells were maintained in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C in modified Eagle's medium (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Germany) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Seromed), 1% nonessential amino acids (Invitrogen), 1% L-glutamine (Invitrogen); 200 units of penicillin, 50 mg of streptomycin, and 0.25 mg of amphotericin B per liter; and 1% minimal essential medium vitamin mix X-100 (Invitrogen).

**Adhesion and Invasion Assays**—The bacterial invasion was performed using the gentamicin protection assay. Briefly, monolayers were seeded in 24-well tissue culture plates (Polylabo, Strasbourg, France) with 4 × 10<sup>5</sup> cells/well and incubated for 20 h. Monolayers were then infected in 1 ml of the cell culture medium without antibiotics and with heat-inactivated fetal calf serum at a multiplicity of infection of 10 bacteria per epithelial cell. The infected monolayers were centrifuged for 10 min at 1000 × g before the 3-h infection period at 37 °C and washed three times in phosphate-buffered saline (pH 7.2). The epithelial cells were then lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionized water. Samples were diluted and plated onto Mueller-Hinton agar plates to determine the number of colony-forming units corresponding to the total number of cell-associated bacteria (adherent and intracellular bacteria). To

<sup>2</sup> The abbreviation used is: c-di-GMP, cyclic dimeric GMP.



determine the number of intracellular bacteria, fresh cell culture medium containing 100  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin (Sigma) was added for 1 h to eliminate extracellular bacteria. Monolayers were then lysed with 1% Triton X-100. The bacteria were quantified as described above.

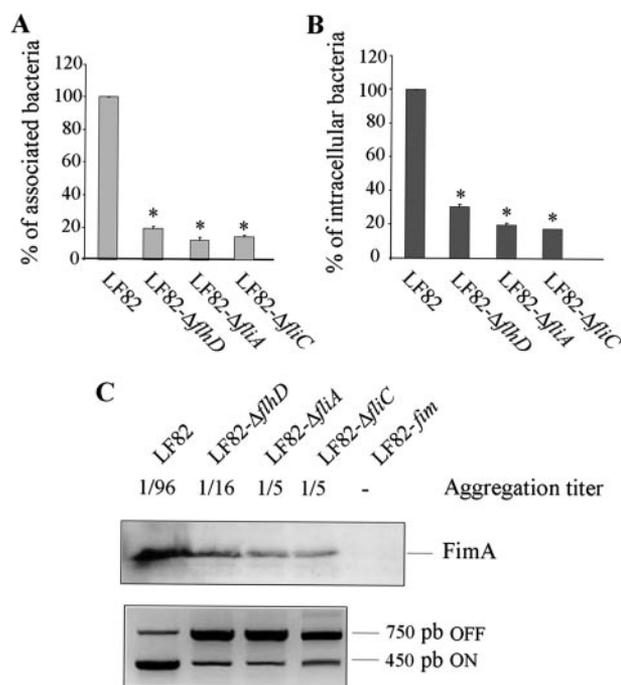
**Immunoblotting**—Bacteria were grown overnight at 37 °C in LB broth without agitation. 700  $\mu\text{l}$  of culture were centrifuged, and the pellet of bacteria was suspended in 100  $\mu\text{l}$  of SDS sample buffer. Western immunoblotting was performed according to the procedure of Towbin *et al.* (33) with minor modifications. The total protein extracts were heated for 5 min with 0.23% HCl, and proteins were resolved by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The membranes were blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin (Sigma) in Tris-buffered saline, 0.05% Tween (TBST) at room temperature for 2 h. The membranes were reacted with the rabbit antiserum raised against purified type 1 pili preparations, a generous gift from Karen Krogfelt, diluted in 1% (w/v) bovine serum albumin in TBST at room temperature for 2 h. Immunoreactants were detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G antibody (1:10,000), enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Biosciences) and autoradiography.

**Yeast Cell Aggregation Assay**—Commercial baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was suspended in phosphate-buffered saline (10 mg, dry weight/ml). *E. coli* strains were resuspended to an optical density of 0.6 at 620 nm in phosphate-buffered saline. Equal volumes of fixed yeast cell suspension and decreasing concentrations of *E. coli* suspension were mixed in a 96-well plate. Aggregation was monitored visually, and the titer was recorded as the last dilution of bacteria giving a positive aggregation reaction.

**Transmission Electron Microscopy**—Bacteria were grown overnight in Luria-Bertani broth without shaking and were fixed and negatively stained with 1% ammonium molybdate on carbon-Formvar copper grids. Gold immunolabeling was performed by the method of Levine *et al.* (34). A washed bacterial suspension was placed on carbon-Formvar copper grids. Excess liquid was removed, and the grids were placed face down on antiserum (1:1000) raised against purified type 1 pili for 15 min. After 10 washings, the grids were placed on a drop of gold-labeled goat anti-rabbit serum (Jansen Life Sciences Products, Olen, Belgium) for 15 min. After a further thorough washing, the grids were negatively stained with 1% ammonium molybdate for 1 min.

**DNA Manipulations, Hybridization, and PCR Experiments**—PCR conditions and all PCR primer sequences are listed in Table S1. DNA to be amplified was released from whole organisms by boiling. Bacteria were harvested from 1.5 ml of an overnight broth culture, suspended in 150  $\mu\text{l}$  of sterile water, and incubated at 100 °C for 20 min. After centrifugation of the lysate, 5  $\mu\text{l}$  of the supernatant were used in the PCR assays.

**Construction of Isogenic Mutants**—Isogenic mutants were generated using PCR products, as described by Datsenko *et al.* (35) and modified by Chaverroche *et al.* (36). The basic strategy was to replace a chromosomal sequence with a selectable antibiotic resistance gene (kanamycin or chloramphenicol) gener-

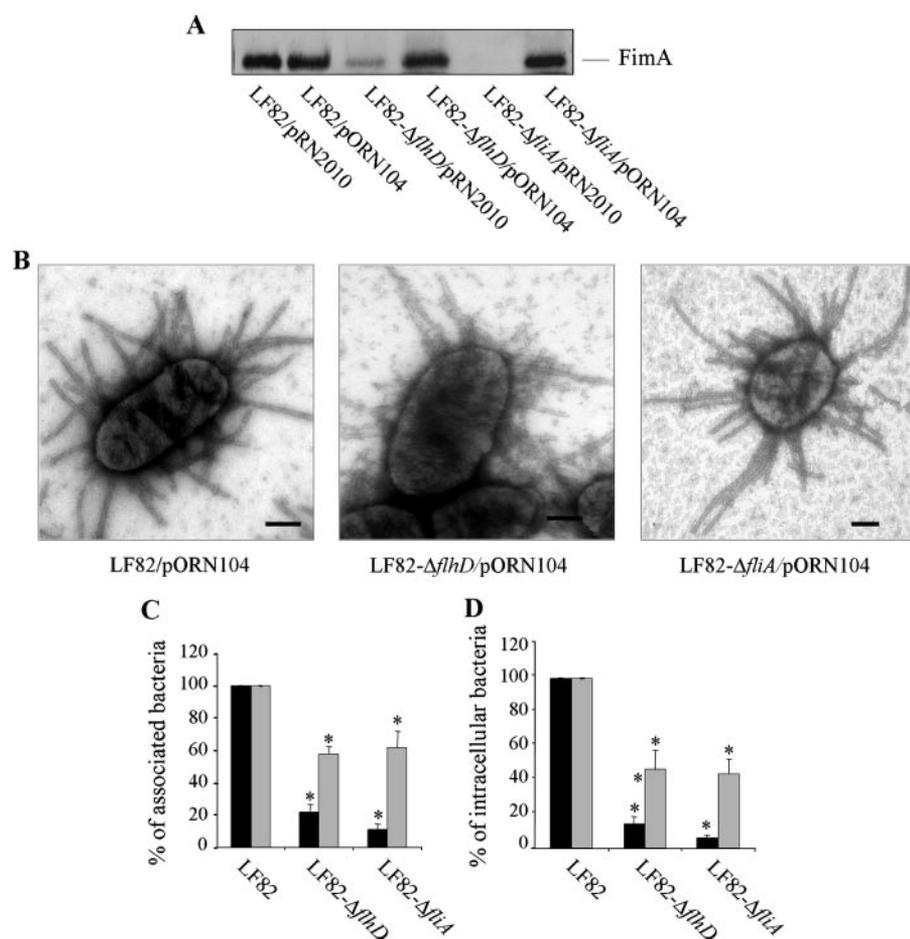


**FIGURE 1. Effects of *fliA*, *flhD*, or *fliC* disruptions on adhesion to (A) and invasion of (B) Intestine-407 cells and type 1 pili regulation (C).** Adhesion and invasion levels of AIEC strain LF82, LF82- $\Delta$ flhD, LF82- $\Delta$ fliA, and LF82- $\Delta$ fliC mutants were measured. Cell-associated bacteria were quantified after a 3-h infection period. Invasion was determined after gentamicin treatment for an additional 1 h. The mean number of cell-associated LF82 bacteria was  $4.2 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^5$  colony-forming units/well. The mean number of intracellular LF82 bacteria was  $3.2 \times 10^3 \pm 0.9 \times 10^3$  colony-forming units/well. Results are expressed as cell-associated (adherent + intracellular) or intracellular bacteria relative to those obtained for strain LF82, taken as 100%. Each value is the mean  $\pm$  S.E. of at least four separate experiments. C, determination of the type 1 pili yeast aggregation titer, evaluation of the amount of FimA subunit using Western blot and type 1 pili antiserum, and orientation of the *fim* operon invertible element in strain LF82, LF82- $\Delta$ flhD, LF82- $\Delta$ fliA, and LF82- $\Delta$ fliC mutants. Orientation was determined by PCR analysis, as described under "Experimental Procedures." A 450-bp product revealed ON orientation and 750-bp product OFF-orientation of the invertible element. \*,  $p < 0.05$ .

ated by PCR. This PCR product was generated by using primers with 50-nucleotide extensions that are homologous to regions adjacent to the target gene and template *E. coli* strain harboring the kanamycin resistance gene on the pKD4 plasmid. For the construction of *flhD* and *fliA* mutants in AIEC strain LF82, the chloramphenicol resistance cassette was amplified from *E. coli* K12 mutants carrying deletions. In addition, strain AIEC LF82 was transformed with pKOBEG or pKD46 plasmid, a plasmid that encoded Red proteins from phage  $\lambda$ , synthesized under the control of an L-arabinose-inducible promoter. This plasmid was maintained in bacteria at 30 °C with 25  $\mu\text{g/ml}$  chloramphenicol and was eliminated at 37 °C.

Strain LF82/pKOBEG or pKD46 was grown at 30 °C with 1 mM L-arabinose to induce Red expression. When  $A_{620 \text{ nm}}$  reached 0.6, the bacterial culture was incubated for 20 min at 42 °C to eliminate the plasmid. Bacteria were washed three times with 10% glycerol, and PCR products were electroporated. Isogenic mutants were selected on LB agar containing 50  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin or 25  $\mu\text{g/ml}$  chloramphenicol. Replacement of the gene by the kanamycin or chloramphenicol resistance cassette in isogenic mutant was confirmed by PCR.





**FIGURE 2. Type 1 pili synthesis (A), transmission electron microscope (TEM) examination of bacteria (B), adhesion (C), and invasion (D) abilities of AIEC strain LF82, LF82-ΔflhD, and LF82-ΔfliA mutants, transformed by pRN2010 empty vector (black bars) or pORN104 harboring the entire *fim* operon cloned in pRN2010 (gray bars).** Determination of the amount of FimA subunit using Western blot and type 1 pili antiserum. Selected images of individual bacteria stained using immunogold labeling with polyclonal antibodies raised against purified type 1 pili. The black scale bar indicates 500 nm. Adhesion and invasion were measured with intestinal epithelial cells Intestine-407. See the legend to Fig. 1. \*,  $p < 0.05$ .

**Transcomplementation Assays**—The genes were amplified by PCR (PerkinElmer Life Sciences thermal cycler) from AIEC LF82 genomic DNA (1–10 ng) using 2.5 units of Pfu DNA polymerase (Promega) and appropriate primers in Pfu DNA polymerase buffer containing a 200  $\mu\text{M}$  concentration of each deoxynucleoside triphosphate. The amplified DNAs were purified using a NucleoSpin extract kit (Machery-Nagel, Düren, Germany), digested with HindIII and XbaI or EcoRI, and ligated in cloning vector pBAD18.

**RNA Manipulations and Real Time Reverse Transcription-PCR**—Total RNA was extracted from bacteria and treated with DNase I (Roche Applied Science). The mRNA was reverse transcribed and amplified using gene-specific primers (Table S1 of supplemental materials). Real time reverse transcription-PCR was performed using a Light Cycler (Roche Applied Science), and quantification of the mRNA level or 16 S rRNA (as a control) was performed using RNA master SYBER Green 1 (Roche Applied Science) with 0.5  $\mu\text{g}$  of total RNA. Amplification of a single expected reverse transcription-PCR product was confirmed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

**Calcofluor Binding Assays**—5  $\mu\text{l}$  of an overnight culture suspended in water ( $A_{600}$  of 5) were spotted onto LB agar plates

without NaCl supplemented with calcofluor (fluorescence brightener 28; 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Plates were incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 48 h. The dye binding was analyzed over time.

**Statistical Analysis**—For analysis of the significance of differences in adhesion and invasion levels, Student's *t* test was used for comparison of two groups of data. All experiments were performed at least three times. A *p* value less than or equal to 0.05 was considered as statistically significant.

## RESULTS

**FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA Play Key Roles in Interactions of AIEC Strain LF82 with Intestinal Epithelial Cells**—To analyze the role of major flagella regulators FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA in the adhesion and invasion abilities of the AIEC strain LF82, we constructed mutants with deletions in the *flhD* or *fliA* genes. As expected, the LF82-Δ*flhD* and LF82-Δ*fliA* mutants were nonmotile (data not shown). We measured the adhesion and invasion levels of these flagellar mutants using an *in vitro* assay with Intestine-407 epithelial cells. Since the LF82-Δ*flhD* and LF82-Δ*fliA* mutants were nonmotile, we included a centrifugation step to bring bacterial and epithelial cells into close contact and thereby to

enable bacteria to initiate infection. Both mutants were strongly impaired in adhesion and invasion compared with the wild-type strain LF82. The adhesion and invasion levels of the LF82-Δ*flhD* mutant were significantly lower (19 and 30%, respectively) than of those of strain LF82. Similarly, the adhesion and invasion levels of LF82-Δ*fliA* were significantly lower (13 and 20%, respectively) than those of strain LF82 (Fig. 1, A and B). These results are consistent with our earlier observation that the LF82-Δ*fliC* mutant, which lacks flagellin, is impaired in adhesion and invasion abilities. They further indicate that, in strain LF82, the FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA regulators are instrumental in enabling bacteria to enter intestinal epithelial cells, irrespective of flagellar motility.

**Decreased Adhesion and Invasion of the Δ*flhD* and Δ*fliA* Mutants Is a Consequence of Lowered Levels of Type 1 Pili**—The decrease in the ability to adhere to and to invade epithelial cells has been observed in nonflagellated mutants of strain LF82 and was attributed to lower type 1 pili levels (32, 37). We therefore analyzed expression of type 1 pili in the LF82-Δ*flhD* and LF82-Δ*fliA* mutants by monitoring bacterial aggregation of yeast cells, which occurs as a result of pili binding to D-mannose residues located at the yeast surface. Both mutants were strongly impaired



in their ability to aggregate yeast cells compared with the wild type strain. We verified that this was a consequence of a decreased level of the FimA major subunit of type 1 pili by Western blot using a type 1 pili antiserum (Fig. 1C).

The regulation of type 1 pili expression is controlled by phase variation, which allows bacteria to switch between pilated and

nonpilated states by inverting a *fimS* DNA element located upstream of the *fim* operon. We used a PCR-based approach (38) to confirm that the deficiency in type 1 pili resulted from the shift of the DNA invertible element orientation toward the phase-OFF orientation (Fig. 1C).

To confirm the critical role of type 1 pili in the impaired adhesion and invasion of the LF82- $\Delta$ *flhD* and LF82- $\Delta$ *fliA* mutants, we transformed both mutants with plasmid pORN104, which contains the *fim* operon in vector pRN2010. The transformants expressed type 1 pili to levels close to those of strain LF82/pORN104, as shown by comparable reaction with the type 1 pili antiserum (Fig. 2A). Transmission electron microscope examination of gold immunolabeling of the LF82- $\Delta$ *fliA*/pORN104 and the LF82- $\Delta$ *flhD*/pORN104 transformants using anti-type 1 pili antibodies revealed that type 1 pili were properly assembled at the surface of bacteria even in the absence of flagella (Fig. 2B). The induced synthesis of type 1 pili partially restored adhesion and invasion levels to 57 and 44%, respectively, in LF82- $\Delta$ *flhD* and to 61 and 41%, respectively, in LF82- $\Delta$ *fliA*, compared with levels in LF82/pORN104 (Fig. 2, C and D). The incomplete restoration of adherence and invasiveness suggests that type 1 pili may not be the only adhesion/invasion determinant regulated by FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA.

The incomplete restoration of adherence and invasiveness suggests that type 1 pili may not be the only adhesion/invasion determinant regulated by FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA.

**FliA Restores Adhesion/Invasion Defects in both  $\Delta$ *fliA* and  $\Delta$ *flhD* Mutants**—In the flagellar gene hierarchy, expression levels of FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> intimately depend on the presence of FliA and vice versa (9, 10). To further clarify the involvement of FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA in the control of adhesion and invasion in strain LF82, the LF82- $\Delta$ *flhD* and LF82- $\Delta$ *fliA* mutants were transformed with plasmids pBAD*flhDC* and pBAD*fliA* expressing FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> and FliA, respectively. We ensured that adhesion, invasion, and motility of LF82- $\Delta$ *flhD* and LF82- $\Delta$ *fliA* were fully complemented with pBAD*flhDC* and pBAD*fliA*, respectively (Table 2; data not shown). The overexpressed *flhDC* operon had no effect on adhesion and invasion in the LF82- $\Delta$ *fliA* mutant. However, the overexpressed *fliA* gene fully restored the defects in the LF82- $\Delta$ *flhD* mutant (Table 2). These results indicate that, in addition to type 1 pili synthesis, the full invasiveness of AIEC strain LF82 is likely to be controlled through the FliA-dependent gene expression.

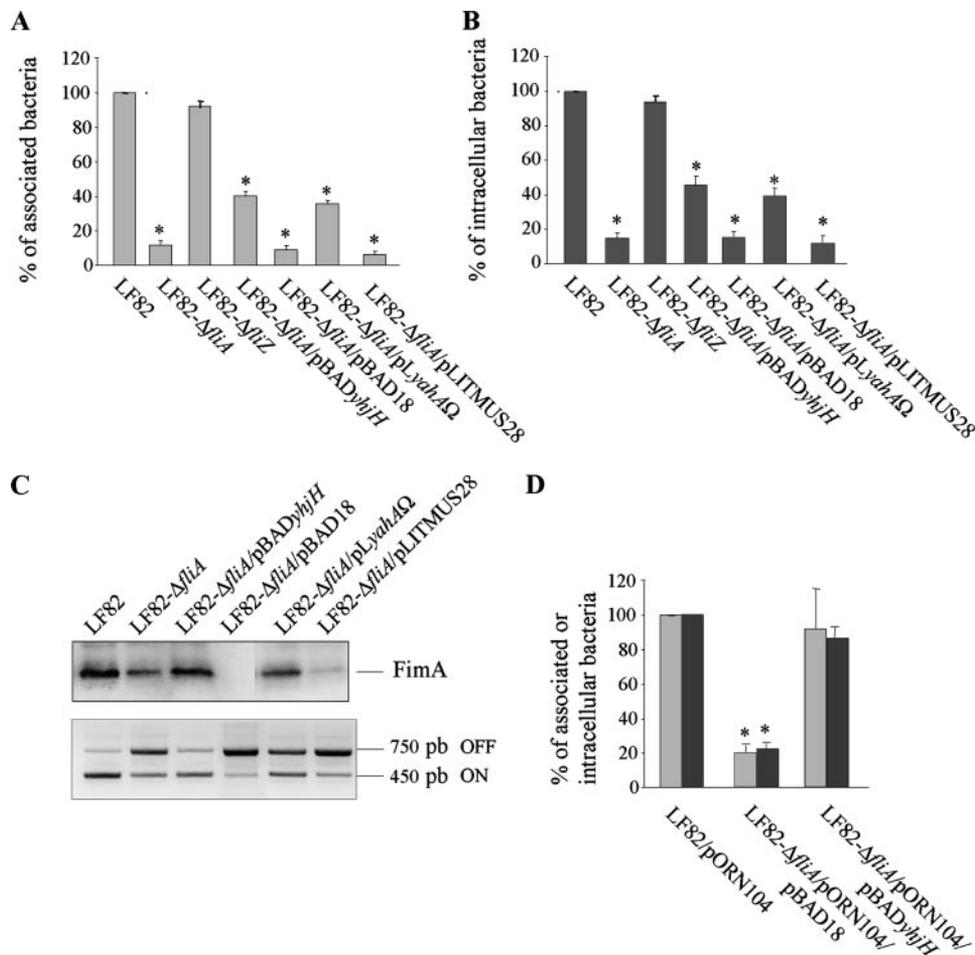
**Overexpression of the *yhjH* Gene Encoding an EAL Domain c-di-GMP Phosphodiesterase Alleviates**

**TABLE 2**  
Regulation of type 1 pili and adhesion and invasion abilities of AIEC strain LF82 compared with LF82- $\Delta$ *flhD* and LF82- $\Delta$ *fliA* mutants

Strain	Yeast aggregation <sup>a</sup>	Adhesion <sup>b</sup>	Invasion <sup>b</sup>
LF82	1/96	100	100
LF82- $\Delta$ <i>flhD</i>	1/16	21 ± 3	34 ± 6
LF82- $\Delta$ <i>flhD</i> /pBAD <i>flhDC</i>	1/96	95 ± 4	95 ± 2
LF82- $\Delta$ <i>flhD</i> /pBAD <i>fliA</i>	1/96	77 ± 15	80 ± 1
LF82- $\Delta$ <i>flhD</i> /pBAD18	1/12	18 ± 1	25 ± 7
LF82- $\Delta$ <i>fliA</i>	1/5	12 ± 5	17 ± 4
LF82- $\Delta$ <i>fliA</i> /pBAD <i>fliA</i>	1/96	99 ± 3	102 ± 7
LF82- $\Delta$ <i>fliA</i> /pBAD18	1/6	12 ± 3	17 ± 5
LF82- $\Delta$ <i>fliA</i> /pBAD <i>flhDC</i>	1/5	10 ± 5	19 ± 4

<sup>a</sup> Aggregation was monitored visually, and the titer was recorded as the last dilution giving a positive aggregation reaction.

<sup>b</sup> See Fig. 1 legend.



**FIGURE 3. Regulatory role of EAL domain proteins in the LF82- $\Delta$ *fliA* mutant.** Adhesion (A) and invasion (B) abilities of AIEC strain LF82, LF82- $\Delta$ *fliZ*, and LF82- $\Delta$ *fliA* mutants. The latter mutant was transformed by pBAD*yhjH*, pLITMUS28, or pBAD18 with intestinal epithelial cells Intestine-407. C, determination of the amount of FimA subunit using Western blot and type 1 pili antiserum and orientation of the *fim* operon invertible element in strain LF82, LF82- $\Delta$ *fliA* mutant, and  $\Delta$ *fliA* transformed with *yhjH*, pLITMUS28, or control empty vectors. D, adhesion (light gray bars) and invasion (dark gray bars) abilities of AIEC strain LF82/pORN104, LF82- $\Delta$ *fliA*/pORN104/pBAD18, and LF82- $\Delta$ *fliA*/pORN104/pBAD*yhjH* mutants with intestinal epithelial cells Intestine-407. See the legend to Fig. 1. \*,  $p < 0.05$ .



## FliA, c-di-GMP and Adherent-Invasive *E. coli*

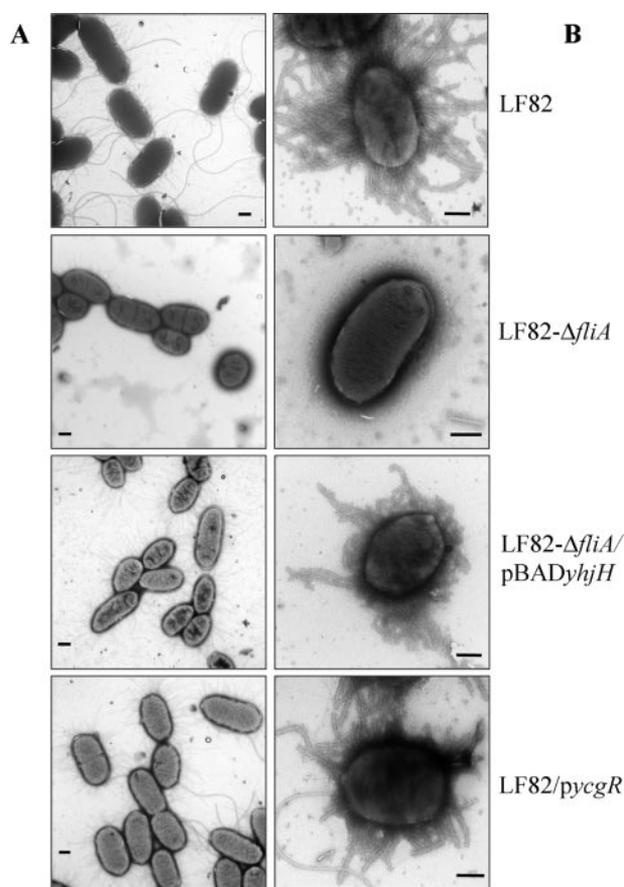
**the Adhesion/Invasion Defect in the  $\Delta fliA$  Mutant**—To identify putative mediators of the effect of FliA on the synthesis of type 1 pili in strain LF82, we investigated the involvement of two genes, *fliZ*, which belongs to the *fliAZ* operon, and *yjhH*, whose expression depends on FliA in *E. coli* K-12 and *S. typhimurium* (25, 39). FliZ exerts a control checkpoint between the synthesis of flagella and invasion factors in *S. typhimurium* (40). YjhH stimulates flagellar motility when it is overexpressed (39). YjhH belongs to a group of proteins carrying an EAL domain and functions as a phosphodiesterase of the second messenger c-di-GMP (41, 42).

A deletion mutant, LF82- $\Delta fliZ$ , was thus created, and the LF82- $\Delta fliA$  mutant was transformed with the pBAD $yjhH$  plasmid carrying the *yjhH* gene under an arabinose-inducible promoter. The adhesion and invasion levels of these strains were measured after a centrifugation step. The LF82- $\Delta fliZ$  mutant was not impaired in adhesion and invasion compared with the wild type (Fig. 3, A and B). Conversely, the transformation of LF82- $\Delta fliA$  mutant with pBAD $yjhH$  restored adhesion and invasion levels to 40 and 48%, respectively, of those of strain LF82. This restoration was due to increased type 1 pili synthesis, as verified by the increased accumulation of the FimA subunit and the shift in orientation of the DNA invertible element for type 1 pili toward the ON position (Fig. 3C). Restoration of piliation was confirmed by electron microscopic examination of strain LF82- $\Delta fliA$ /pBAD $yjhH$  (Fig. 4).

To further analyze whether higher expression of type 1 pili observed in LF82- $\Delta fliA$ /pBAD $yjhH$  was responsible for the partial restoration of adhesion and invasion, we investigated these parameters in LF82- $\Delta fliA$ /pBAD $yjhH$  transformed with pORN104. In this strain, we observed full restoration of adhesion and invasion (Fig. 3D). These results suggest that in strain LF82, FliA regulates type 1 pili expression and adhesion and invasion abilities by acting via the YjhH expression.

**The c-di-GMP Turnover Is Involved in the Adhesion and Invasion of AIEC Strain LF82**—Genetic analysis has provided firm evidence of the c-di-GMP phosphodiesterase activity of YjhH, yet its enzymatic activity has not been tested *in vitro*. To ascertain that c-di-GMP phosphodiesterase activity of YjhH affects adhesion and invasion, we transformed the LF82- $\Delta fliA$  mutant with a plasmid carrying the *E. coli* K-12 *yahA* gene encoding a well characterized c-di-GMP phosphodiesterase (43). We observed that, as with overexpression of *yjhH*, overexpression of *yahA* partially restored the adhesion/invasion defects and type 1 pili synthesis, as evidenced by the increased FimA subunit accumulation and the shift in orientation of the DNA invertible element for type 1 pili toward the ON position (Fig. 3, A–C).

To further explore the role of c-di-GMP in adhesion and invasion, we constructed two mutants, LF82- $\Delta yaiC$  and LF82- $\Delta fliA\Delta yaiC$ , each containing a deletion in the *yaiC* gene, which encodes a diguanylate cyclase involved in c-di-GMP synthesis (Fig. 5, A and B). The homolog of YaiC in *S. typhimurium* (41), AdrA, which shares 75% identity with YaiC, is one of the major diguanylate cyclases in this bacterium. We anticipated that the absence of YaiC would decrease c-di-GMP synthesis in the  $\Delta yaiC$  mutants, which may mimic the effect of increased c-di-GMP hydrolysis by overexpressed YjhH or YahA. In the genetic

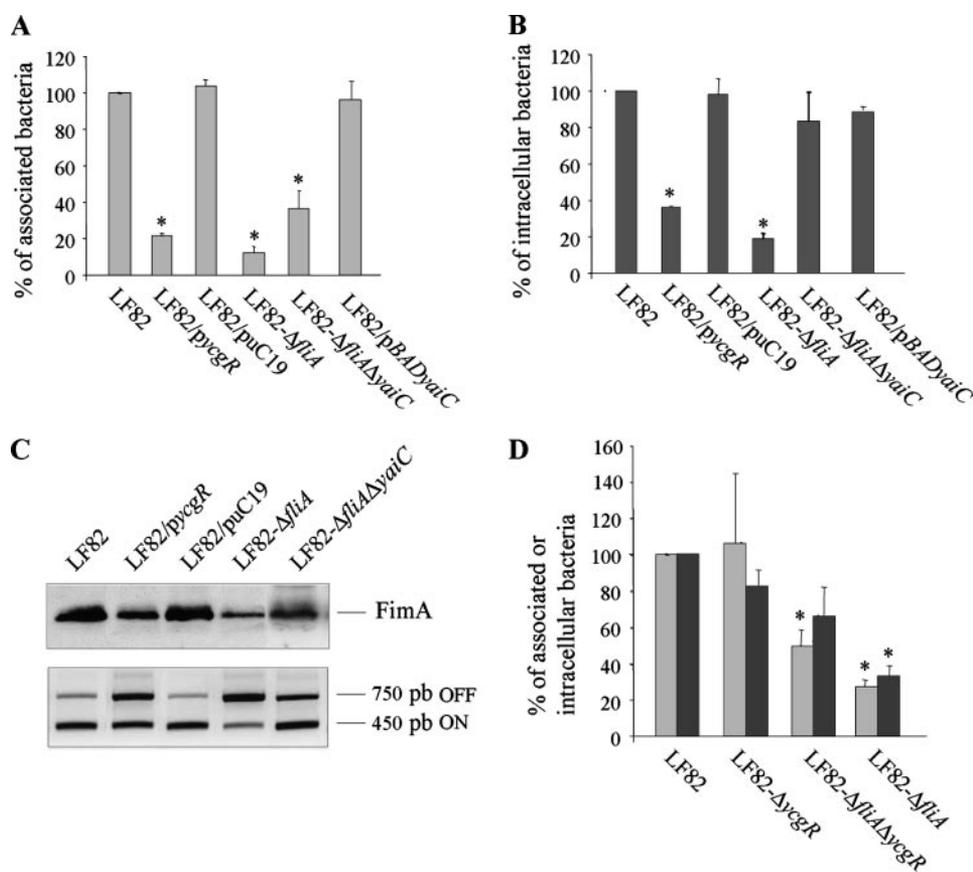


**FIGURE 4. Transmission electron microscope (TEM) examination of bacteria.** A, typical field of view of negatively stained bacteria; B, selected images of individual bacteria stained using immunogold labeling with polyclonal antibodies raised against purified type 1 pili. The black scale bar indicates 500 nm.

background of strain LF82, deletion of the *yaiC* gene did not affect adhesion and invasion (data not shown), and neither did *yaiC* overexpression (Fig. 5, A and B). Similarly, in the LF82- $\Delta fliA$  harboring pORN104, overexpression of *yaiC* did not decrease adhesion and invasion levels (Fig. 5D). However, deletion of *yaiC* in the genetic background of LF82- $\Delta fliA$  (where c-di-GMP levels may be elevated due to the lower expression of c-di-GMP phosphodiesterase YjhH) resulted in increased adhesion and invasion levels, reaching 37 and 83%, respectively, of those in strain LF82. This partial increase correlated with a shift in the orientation of the DNA invertible element toward the phase-ON position (Fig. 5C). It seems that a decrease in c-di-GMP levels caused either by an overexpression of a c-di-GMP phosphodiesterase or by a loss of a major diguanylate cyclase affects type 1 pili expression but only in the absence of FliA.

Cellulose biosynthesis in certain strains of *E. coli* and *S. typhimurium* strains is strongly up-regulated by c-di-GMP (41). Using calcofluor-binding assays, we observed that overexpression of YaiC in strain LF82 increased cellulose synthesis (data not shown), as reported elsewhere in *S. typhimurium* upon overexpression of the YaiC homolog AdrA (41). However, as shown above, this increased cellulose synthesis did not affect adhesion and invasion (Fig. 5, A and B). Further, the LF82- $\Delta bcsC$  mutant impaired in cellulose synthesis had adhesion and





**FIGURE 5. Regulatory role of the *yaiC* gene encoding a GGDEF domain protein and the *ycgR* gene encoding a PilZ domain protein in AIEC LF82 adhesion and invasion abilities.** Adhesion (A) and invasion (B) abilities of AIEC strain LF82, LF82- $\Delta$ fliA and LF82- $\Delta$ fliA $\Delta$ yaiC mutants, and AIEC strain LF82 transformed by *pycGR* or control empty vector with intestinal epithelial cells Intestine-407. C, determination of the amount of FimA subunit using Western blot and type 1 pili antiserum and orientation of the *fim* operon invertible element in the same strains. D, adhesion (light gray bars) and invasion (dark gray bars) abilities of AIEC strain LF82, LF82- $\Delta$ fliA, LF82- $\Delta$ ycgR, and LF82- $\Delta$ fliA $\Delta$ ycgR mutants with intestinal epithelial cells Intestine-407. See the legend to Fig. 1. \*,  $p < 0.05$ .

**TABLE 3**

Quantification of *yaiC*, *yhjH*, *yahA*, and *ycgR* expression in AIEC strain LF82 and *fliA* mutant strain

	mRNA levels relative to those of wild-type strain LF82 <sup>a</sup>	Domain
<i>yaiC</i>	0.8 $\pm$ 0.2	GGDEF
<i>yhjH</i>	111.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	EAL
<i>yahA</i>	1.2 $\pm$ 0.2	EAL
<i>ycgR</i>	14.3 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	PilZ

<sup>a</sup> -Fold decrease in mRNA levels relative to that of wild-type strain LF82 using real time reverse transcription-PCR. 16 S rRNA levels were measured as controls. Only experiments showing the same levels of 16 S rRNA for each sample were taken into account. Data are mean  $\pm$  S.E. of at least three separate experiments.

<sup>b</sup>  $p < 0.05$ .

invasion abilities similar to those of strain LF82 (data not shown). Together, these results show that cellulose is not involved in adhesion and invasion of the LF82 strain.

**The c-di-GMP Receptor YcgR Acts as an Inhibitor of Adhesion and Invasion in Strain LF82**—Recently, a PilZ protein domain was predicted (44) and verified (42) to function as a c-di-GMP receptor. The PilZ domain protein YcgR from *E. coli* was shown to bind c-di-GMP *in vitro* and affect flagellar motility *in vivo* (39, 42). The *ycgR* gene was also demonstrated to have the opposite effect on motility to that of the *yhjH* gene (39). However, the mechanism by which c-di-GMP affects flagellar motility is still uncertain. We constructed the LF82- $\Delta$ ycgR mutant

and observed that the absence of YcgR did not modify adhesion and invasion. We then explored the effect of overexpressed YcgR and observed that in strain LF82 carrying plasmid *pycGR*, the levels of type 1 pili were decreased (Figs. 4 and 5C). The adhesion and invasion levels of LF82/*pycGR* were significantly decreased, to 22 and 37%, respectively, of those of strain LF82 (Fig. 5C). Interestingly, analysis of the double mutant LF82- $\Delta$ fliA $\Delta$ ycgR indicated that, in the absence of YcgR, the FliA null mutant recovered its abilities to adhere to and to invade, reaching 49 and 67%, respectively, of those of the wild-type strain LF82 (Fig. 5D). However, we did not observe any further decrease in adhesion and invasion levels in the LF82- $\Delta$ fliA mutant that overexpressed YcgR (data not shown). This indicates that the effect of FliA on type 1 pili is mediated to a large extent via the negatively regulating YcgR/c-di-GMP pathway.

**FliA-dependent Control of Genes Involved in c-di-GMP Regulation**—Although it has been shown that FliA affects *yhjH* expression in *E. coli* K12 and *S. typhimurium* strains (16, 39), it was unclear

whether this holds true for strain LF82. According to the reverse transcription-PCR assays, the levels of *yhjH* mRNA were up to 111-fold higher in LF82 than in LF82- $\Delta$ fliA (Table 3). However, FliA did not affect the levels of *yahA* and *yaiC* transcripts. Interestingly, the *ycgR* transcript levels were much higher (14-fold) in LF82 than in LF82- $\Delta$ fliA. These results suggest that the role of FliA in c-di-GMP-dependent control over type 1 pili is complex; nevertheless, we have established a link between the flagellar hierarchy and type 1 pili synthesis.

## DISCUSSION

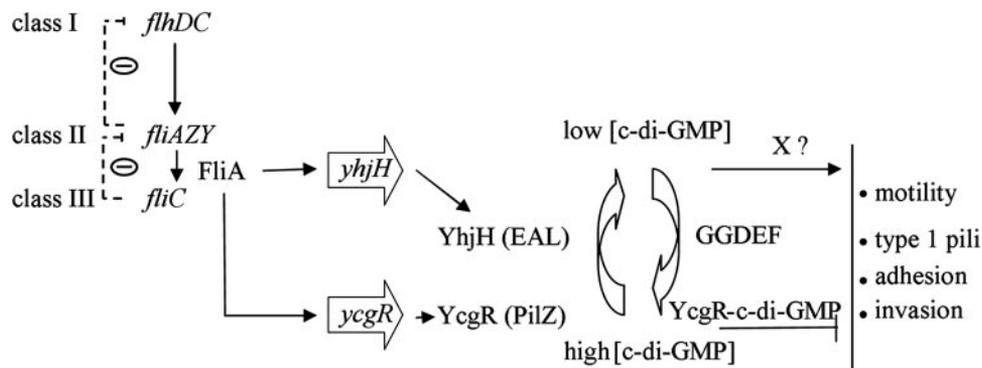
In this study, we uncovered a regulatory pathway linking flagellar motility and type 1 pili synthesis, which is required for efficient adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by the AIEC strain LF82 associated with Crohn disease. As a first step in deciphering this pathway, we used our earlier observation that, in strain LF82, a mutation in the flagellin gene *fliC* results in decreased expression of the *flhDC* operon, which encodes FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, master regulator of flagellar biogenesis, and concomitantly a loss of type 1 pili (32). In the present study, we found that the mutants deleted for the regulatory genes encoding the FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> transcriptional activator or the downstream sigma factor FliA were severely impaired in type 1 pili synthesis. This suggests that regulators of flagellar synthesis control type 1



pili synthesis in strain LF82. Hence, decreased FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> levels are likely to be responsible for the lack of type 1 pili in the  $\Delta fliC$  mutant. Forced contact between bacteria and host cells (through centrifugation), which bypasses the need for flagellar motility, and overexpression of type 1 pili did not fully restore the adhesion/invasion defects of the LF82- $\Delta flhD$  or LF82- $\Delta fliA$  mutants. This suggests that the range of virulence targets controlled by flagellar regulators in strain LF82 is not limited to type 1 pili.

The lack of FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> in AIEC strain LF82 was compensated for by the increased expression of the downstream sigma factor FliA. It is likely that the genes involved in type 1 pili synthesis and other adhesion/invasion factors are controlled at the transcription level by FliA. Although the involvement of FliA in the regulation of virulence determinants other than flagella has been described in several pathogenic bacteria (18, 25, 26, 28), these studies did not identify intermediate steps linking FliA to the regulation of virulence determinants. In our study, we identified the FliA-dependent *yjhH* gene as such a mediator. YjhH is an EAL domain c-di-GMP phosphodiesterase required for the breakdown of the novel second messenger c-di-GMP (41). We show that it is the c-di-GMP phosphodiesterase activity of YjhH, and not any other property of YjhH, that was critical, because we were able to replace YjhH with an alternative EAL domain, c-di-GMP phosphodiesterase YahA (43), or achieve the same phenotype by deleting the diguanylate cyclase gene *yaiC* (37). We demonstrate that overexpressed YaiC did not change the adhesion and invasion abilities of the LF82 strain, which indicates that physiological amounts of the diguanylate cyclase are sufficient for its activity. Thus, in strain LF82, lower c-di-GMP levels seem to stimulate type 1 pili synthesis.

We observed that increased type 1 pili synthesis occurred via the phase variation mechanism (*i.e.* the shift in the orientation of the DNA invertible element *fimS* toward the phase-ON orientation). The pathway connecting lower c-di-GMP levels to phase variation remains unknown. In addition to controlling *yjhH* expression, FliA in strain LF82 controls expression of the c-di-GMP receptor YcgR, a finding consistent with observations made in *E. coli* K-12 and *Chlamydia trachomatis* (45, 46). YcgR is a c-di-GMP receptor involved in motility control. We suggest that YcgR is a good candidate for sensing the changes in cellular c-di-GMP levels and negatively controlling type 1 pili synthesis, adhesion, and invasion. The marked reduction in type 1 pili synthesis induced by overexpression of YcgR in LF82 strain is consistent with this suggestion. This was further confirmed by the increased adhesion and invasion abilities of the LF82- $\Delta fliA$  mutant when a second deletion was made in *ycgR*. The downstream partners of the YcgR protein are unknown. We speculate that either YcgR or its downstream partner affects the phase inversion of *fimS* DNA element by regulating the expression and/or activities of the FimB and FimE inverta-



**FIGURE 6. Model for a c-di-GMP-dependent coordinate regulation of the synthesis of flagella, type 1 pili in AIEC LF82.** When the flagella cascade is activated, the accumulation of the FliA sigma factor leads to a concomitant strong induction of the *yjhH* and *ycgR* genes. The EAL domain YjhH degrades c-di-GMP to lower its local concentration and suppress the activity of a putative YcgR-c-di-GMP complex, finally leading to the synchronized activation of various adhesion and invasion factors of AIEC strain LF82. The FliA-induced YcgR protein could act in a feedback-like way to modulate the whole system by increasing the level of the YcgR-c-di-GMP complex when local c-di-GMP molecule concentration is high.

ses (47). We cannot exclude the possibility that the regulation of type 1 pili also involves a factor that affects pili export or assembly. Further, it is possible that additional, as yet unidentified, c-di-GMP-binding proteins act as regulatory intermediates between FliA and adhesion and invasion factors in strain LF82. This hypothesis is included in the model depicted in Fig. 6.

Recent studies have linked c-di-GMP to virulence in several pathogenic bacteria. In *S. typhimurium*, the c-di-GMP phosphodiesterase CdgR is involved in resistance to phagocyte oxidase and in the cytotoxic effect in macrophages (48). In *V. cholerae*, the c-di-GMP phosphodiesterase VieA regulates expression of the cholera toxin genes *ctxAB* (49), whereas the CdgC protein carrying the EAL and GGDEF domains is involved in the control of extracellular protein secretion and flagellar biosynthesis (50). In *Pseudomonas aeruginosa*, the biofilm and cytotoxicity phenotypes are mediated by different GGDEF and EAL domain proteins involved in c-di-GMP metabolism (51). More specifically, the c-di-GMP phosphodiesterase FimX is involved in the assembly of Tfp type IV pili, which are required for twitching motility, biofilm formation, and adherence of *Pseudomonas* (52). In addition, increased c-di-GMP levels in *S. typhimurium* are associated with increased curli synthesis (53). Our work revealed yet another virulence factor, type 1 pili, whose expression is regulated via a c-di-GMP-dependent pathway. We also present the first evidence, to our knowledge, that such a pathway can influence invasiveness in a pathogenic bacteria. The novel role of c-di-GMP in the control of type 1 pili expression and, as a consequence, in the adhesion and invasion abilities of strain LF82 is in agreement with the general notion that lower c-di-GMP levels promote virulence.

*Acknowledgments*—We are grateful to Maryvonne Moulin-Schouleir (Pathogénie Bactérienne, UR86, INRA, Nouzilly, France) for *E. coli* type 1 pili antibodies, Uri Alon for the *E. coli* K-12 U306 and U309 mutants, Paul Orndorff for the pORN104 and PRN2010 vectors, and Chankyu Park for the pMS258 plasmids. We also thank Christelle Drégneaux and Claire Szczepaniak (Centre d’Imagerie Cellulaire Santé, Université d’Auvergne, Clermont-Ferrand, France) for technical assistance with electron microscopy.



REFERENCES

1. Rabaan, A. A., Gryllos, I., Tomas, J. M., and Shaw, J. G. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 4257–4267
2. Grant, C. C., Konkol, M. E., Cieplak, W., Jr., and Tompkins, L. S. (1993) *Infect. Immun.* **61**, 1764–1771
3. Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H., and Karjalainen, T. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 7937–7940
4. Krakowka, S., Ringler, S. S., Eaton, K. A., Green, W. B., and Leunk, R. (1996) *Vet. Immunol. Immunopathol.* **52**, 159–173
5. Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B. C., Hacker, J., and Steinert, M. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 2116–2122
6. Liu, S. L., Ezaki, T., Miura, H., Matsui, K., and Yabuuchi, E. (1988) *Infect. Immun.* **56**, 1967–1973
7. Richardson, K. (1991) *Infect. Immun.* **59**, 2727–2736
8. Liu, X., and Matsumura, P. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 7345–7351
9. McCarter, L. L. (2006) *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 180–186
10. Chilcott, G. S., and Hughes, K. T. (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 694–708
11. Macnab, R. M. (1992) *Annu. Rev. Genet.* **26**, 131–158
12. Arnosti, D. N., and Chamberlin, M. J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 830–834
13. Chadsey, M. S., Karlinsey, J. E., and Hughes, K. T. (1998) *Genes Dev.* **12**, 3123–3136
14. Aldridge, P., and Hughes, K. T. (2002) *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 160–165
15. Pruss, B. M., Campbell, J. W., Van Dyk, T. K., Zhu, C., Kogan, Y., and Matsumura, P. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 534–543
16. Frye, J., Karlinsey, J. E., Felise, H. R., Marzolf, B., Dowidar, N., McClelland, M., and Hughes, K. T. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 2233–2243
17. Kapatral, V., Campbell, J. W., Minnich, S. A., Thomson, N. R., Matsumura, P., and Pruss, B. M. (2004) *Microbiology* **150**, 2289–2300
18. Horne, S. M., and Pruss, B. M. (2006) *Arch. Microbiol.* **185**, 115–126
19. Fraser, G. M., Claret, L., Furness, R., Gupta, S., and Hughes, C. (2002) *Microbiology* **148**, 2191–2201
20. Teplitski, M., Goodier, R. I., and Ahmer, B. M. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 7257–7265
21. Young, G. M., Smith, M. J., Minnich, S. A., and Miller, V. L. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 2823–2833
22. Schmiel, D. H., Young, G. M., and Miller, V. L. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 2314–2320
23. Bleves, S., Marenne, M. N., Detry, G., and Cornelis, G. R. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 3214–3223
24. Givaudan, A., and Lanois, A. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 107–115
25. Park, D., and Forst, S. (2006) *Mol. Microbiol.* **61**, 1397–1412
26. Goon, S., Ewing, C. P., Lorenzo, M., Pattarini, D., Majam, G., and Guerry, P. (2006) *Infect. Immun.* **74**, 769–772
27. Heuner, K., Dietrich, C., Skriwan, C., Steinert, M., and Hacker, J. (2002) *Infect. Immun.* **70**, 1604–1608
28. Molofsky, A. B., Shetron-Rama, L. M., and Swanson, M. S. (2005) *Infect. Immun.* **73**, 5720–5734
29. Boudeau, J., Glasser, A. L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999) *Infect. Immun.* **67**, 4499–4509
30. Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A. L., Barnich, N., Bringer, M. A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J. F. (2004) *Gastroenterology* **127**, 412–421
31. Boudeau, J., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 1272–1284
32. Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003) *Mol. Microbiol.* **48**, 781–794
33. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354
34. Levine, M. M., Ristaino, P., Marley, G., Smyth, C., Knutton, S., Boedeker, E., Black, R., Young, C., Clements, M. L., Cheney, C., and Patnaik, R. (1984) *Infect. Immun.* **44**, 409–420
35. Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–6645
36. Chaverroche, M. K., Ghigo, J. M., and d'Enfert, C. (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**, E97
37. Barnich, N., Bringer, M. A., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 2484–2493
38. Schwan, W. R., Seifert, H. S., and Duncan, J. L. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 2367–2375
39. Ko, M., and Park, C. (2000) *J. Mol. Biol.* **303**, 371–382
40. Lucas, R. L., Lostroh, C. P., DiRusso, C. C., Spector, M. P., Wanner, B. L., and Lee, C. A. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 1872–1882
41. Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., and Romling, U. (2004) *Mol. Microbiol.* **53**, 1123–1134
42. Ryjenkov, D. A., Simm, R., Romling, U., and Gomelsky, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 30310–30314
43. Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A., and Gomelsky, M. (2005) *J. Bacteriol.* **187**, 4774–4781
44. Amikam, D., and Galperin, M. Y. (2006) *Bioinformatics* **22**, 3–6
45. Yu, H. H., Kibler, D., and Tan, M. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 8206–8212
46. Shen, L., Feng, X., Yuan, Y., Luo, X., Hatch, T. P., Hughes, K. T., Liu, J. S., and Zhang, Y. X. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 7364–7377
47. Gally, D. L., Leathart, J., and Blomfield, I. C. (1996) *Mol. Microbiol.* **21**, 725–738
48. Hisert, K. B., MacCoss, M., Shiloh, M. U., Darwin, K. H., Singh, S., Jones, R. A., Ehrt, S., Zhang, Z., Gaffney, B. L., Gandotra, S., Holden, D. W., Murray, D., and Nathan, C. (2005) *Mol. Microbiol.* **56**, 1234–1245
49. Tamayo, R., Tischler, A. D., and Camilli, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 33324–33330
50. Lim, B., Beyhan, S., Meir, J., and Yildiz, F. H. (2006) *Mol. Microbiol.* **60**, 331–348
51. Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D. G., Neely, A. N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ausubel, F. M., and Lory, S. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2839–2844
52. Kazmierczak, B. I., Lebron, M. B., and Murray, T. S. (2006) *Mol. Microbiol.* **60**, 1026–1043
53. Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., and Romling, U. (2006) *Mol. Microbiol.* **60**, 602–616
54. Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J. F. (1998) *Gastroenterology* **115**, 1405–1413
55. Kalir, S., and Alon, U. (2004) *Cell* **117**, 713–720
56. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and Beckwith, J. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130
57. Orndorff, P. E., and Falkow, S. (1984) *J. Bacteriol.* **159**, 736–744



## Commentaire de la publication N°1 :

Afin d'identifier les différents intermédiaires permettant la synthèse coordonnée des flagelles et des pili de type 1 chez la souche AIEC LF82, des mutants invalidés dans les gènes codant les régulateurs du régulon flagellaire *flhD* et *fliA* ont été créés. De tels mutants présentent des capacités d'adhésion, d'invasion et d'expression des pili de type 1 très diminuées, par rapport à la souche sauvage, mais pouvant être complétées par une surexpression de FliA. Cependant une expression induite des pili de type 1 dans le mutant LF82- $\Delta$ *fliA* ne restaure pas totalement les capacités d'adhésion et d'invasion ce qui suggère que FliA régule l'expression des pili de type 1 et d'autres facteurs de virulence restant à identifier.

FliA, sous-unité  $\sigma^{28}$  de l'ARN polymérase, reconnaît une séquence ADN, spécifique représentée par le consensus TAAAGTTT-N11-GCCGATAA, au niveau de certains promoteurs et permet l'initiation de la transcription. Le génome de la souche AIEC LF82 étant disponible, avec l'aide du Docteur Ogi Tomoo de l'Université de Kyoto, nous avons identifié *in silico* 126 cibles potentielles du régulateur FliA (**Annexe 2**). Parmi les différents gènes identifiés sont retrouvés principalement des gènes impliqués dans la synthèse et la fonction des flagelles mais aussi des gènes aux fonctions inconnues ou non retrouvés chez un *E. coli* K-12 MG1655. Tous ces gènes représentent d'éventuels facteurs de virulence restant à caractériser. Cependant, il faut noter la présence de deux gènes impliqués dans la voie du second messager di-GMP cyclique : le gène codant la phosphodiesterase (PDE) à domaine EAL YhjH et celui codant le récepteur au di-GMPc à domaine PilZ YcgR. Des expériences de RT-qPCR ont permis de confirmer la régulation de ces gènes par FliA. De nombreux exemples dans la bibliographie montrent l'implication du di-GMPc dans la régulation de l'expression des flagelles et de structures fimbriales comme les curli chez *E. coli*. De plus le di-GMPc est impliqué dans la régulation de la virulence de nombreux pathogènes notamment *P. aeruginosa* et *V. cholerae*.

La surexpression de YhjH dans le mutant LF82- $\Delta$ *fliA* permet de restaurer l'expression des pili de type 1 au même titre que la surexpression d'une autre protéine à domaine EAL YahA. Ces résultats montrent que l'activité phosphodiesterase est impliquée dans le mécanisme de régulation de l'expression de pili de type 1, en entraînant une diminution globale ou locale de la concentration en di-GMPc. En effet, une mutation dans le gène codant la diguanylate cyclase (DGC) à domaine GGDEF YaiC, permettant la synthèse du di-GMPc, conduit

**Tableau 9 : Protéines à domaines EAL et/ou GGDEF retrouvées chez *E. coli* K-12 et comparaison avec la souche AIEC LF82.**

Protéine	Domaines	AIEC LF82	Activité potentielle
AdrA ou YaiC	GGDEF	+	DGC
Dos	EAL/GGDEF	+	PDE/DGC
Gmr	EAL/GGDEF	+	PDE/DGC
Rtn	EAL	+	PDE
TnpM	EAL	-	PDE
YahA	EAL	+	PDE
YcdT	GGDEF	+	DGC
YcgF	EAL	+	PDE
YcgG	EAL	-	PDE
YdaM	GGDEF	+	DGC
YddV	GGDEF	-	DGC
YdeH	GGDEF	+	DGC
YeaI	GGDEF	+	DGC
YeaJ	GGDEF	+	DGC
YeaP	GGDEF	+	DGC
YedQ	GGDEF	+	DGC
YeE	EAL/GGDEF	+	PDE/DGC
YfeA	EAL/GGDEF	+	PDE/DGC
YfgF	EAL	+	PDE
YfiN	GGDEF	+	DGC
YhdA	EAL/GGDEF	+	PDE/DGC
YhjH	EAL	+	PDE
YhjK	EAL/GGDEF	+	PDE/DGC
YjcC	EAL	+	PDE
YlaB	EAL	+	PDE
YliE	EAL	+	PDE
YliF	GGDEF	+	DGC
YnrF	GGDEF	+	DGC
YoaD	EAL	+	PDE
YuaB	EAL	-	PDE

En grisé, les protéines dont les gènes correspondant ne sont pas retrouvés dans le génome de la souche AIEC LF82.

également à une restauration du phénotype du mutant LF82- $\Delta$ *fliA*, renforçant notre argument en faveur de l'implication de la diminution de la concentration en di-GMPc dans la régulation de la virulence chez la souche AIEC LF82. Cependant, il serait nécessaire de réaliser des dosages de la molécule dans les différentes constructions pour valider l'hypothèse. Toutefois, une absence totale de régulation du taux de di-GMPc peut s'avérer sans aucune conséquence dans la virulence bactérienne. En effet, des études récentes ont montrées que chez *Salmonella enteritidis*, la création d'un mutant invalidé dans tous les gènes connus impliqués dans la synthèse du di-GMPc ne montre aucune implication de ce second messager dans la virulence (Solano *et al.*, 2009). Enfin, il existe différentes protéines à domaine EAL et/ou GGDEF identifiées dans le génome de la souche AIEC LF82 (**Tableau 9**). Il serait intéressant d'étudier le rôle et la spécificité de chacune d'elles dans la régulation des capacités d'adhésion et d'invasion des souches AIEC.

La concentration en di-GMPc serait un intermédiaire régulant la virulence de la souche AIEC LF82 et notamment la variation de phase à l'origine de l'expression des pili de type 1. Cependant le lien entre ce mécanisme et la concentration en di-GMPc reste mal connu. Un possible intermédiaire pourrait être la protéine à domaine PilZ YcgR qui a été identifiée comme récepteur au di-GMPc (Amikam and Galperin, 2006; Ko and Park, 2000) et interagirait avec le moteur flagellaire (Paul *et al.* 2010). Le gène codant cette protéine est sous la dépendance de FliA, il s'agirait donc d'un bon candidat pour détecter la concentration en di-GMPc et permettre un contrôle négatif de l'expression de pili de type 1. En effet, la surexpression de YcgR dans la souche AIEC LF82 induit une diminution de l'expression des pili de type 1. De plus, l'hypothèse est renforcée par le fait que la double mutation LF82- $\Delta$ *fliA*/ $\Delta$ *ycgR* restaure partiellement les capacités d'adhésion, d'invasion et d'expression des pili de type 1. YcgR serait le premier senseur de la concentration en di-GMPc et régulerait la variation de phase en agissant sur l'activité ou l'expression des invertases FimB et FimE ou sur la mise en place des différentes sous-unités composant les pili de type 1 à la membrane. Cette régulation dépendante de la concentration en di-GMPc représente un nouvel exemple de régulation de l'expression de gènes de virulence chez les bactéries pathogènes (Hisert *et al.*, 2005; Kader *et al.*, 2006; Kulasakara *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007; Tamayo *et al.*, 2005). Différents mécanismes peuvent être envisagés :

- Régulation directe *via* par YcgR fixant le di-GMPc
- Régulation par « riboswitch » dépendante de la concentration en di-GMPc.
- Implication d'intermédiaires inconnus.



La voie de signalisation impliquant le di-GMPc permet une expression de facteurs de virulence chez la souche AIEC LF82. Cependant, les signaux permettant son activation ne sont pas encore connus. Une étude menée par Rolhion et collaborateur avait permis de mettre en évidence l'activation spécifique de la voie  $\sigma^E$  en condition de forte osmolarité dans la souche AIEC LF82 en comparaison avec une souche de *E. coli* non pathogène (Rolhion *et al.*, 2007). Ainsi, de la même façon il pourrait exister une régulation spécifique chez les AIEC faisant intervenir le di-GMPc en fonction des conditions environnementales. Divers signaux pourraient être impliqués et particulièrement ceux retrouvés au niveau intestinal : l'osmolarité, le pH, la présence de sels biliaires mais également l'absence de lumière. En effet, certaines Di-guanylate cyclases ou phosphodiesterases peuvent posséder un ou plusieurs domaines transmembranaires exposant des sites senseurs au niveau périplasmique et pouvant ainsi percevoir des signaux environnementaux. Il existe notamment des protéines à domaine BLUF (blue light using FAD) capables de capter la lumière bleue. Dans le génome de la souche AIEC LF82 on retrouve la protéine YcgF à domaine EAL et BLUF déjà décrite chez *E. coli* comme pouvant moduler l'expression de gènes impliqué dans le formation de biofilm (Tschowri *et al.*, 2009).



**2. Rôle de la diminution du niveau d'expression de la protéine de type-histone Fis lors de l'interaction avec les cellules épithéliales intestinales dans la bactérie AIEC LF82 associée à la maladie de Crohn.**

**Publication n°2**

**Sylvie Miquel**, Laurent Claret, Richard Bonnet, Imen Dorboz, Nicolas Barnich, and Arlette Darfeuille-Michaud.

**Role of decreased levels of Fis histone-like protein in Crohn's disease-associated AIEC LF82 bacteria interacting with intestinal epithelial cells.**

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, p. 1832–1843 Vol. 192, No. 7

Avril 2010



## Introduction

L'existence de systèmes de régulation de la virulence chez les bactéries AIEC a été mise en évidence lors de l'étude du comportement de mutants de la souche AIEC LF82 dépourvus de flagelles. Dans la première partie de ce mémoire, nous avons montré que cette régulation est médiée par le facteur sigma FliA et fait intervenir la concentration intracellulaire en second messenger le di-GMPc (Claret *et al.*, 2007). De plus, le milieu intestinal pourrait constituer un signal clé dans le déclenchement de l'expression de gènes de virulence chez les souches AIEC associées à la MC. En effet, l'implication du système d'osmorégulation EnvZ/OmpR et de la voie  $\sigma^E$  a été mise en évidence dans la régulation de la virulence de la souche AIEC LF82 et ce système n'est pas mis en place chez une souche de type K-12. Ainsi les souches AIEC auraient mis en place un système permettant un avantage adaptatif pour coloniser une muqueuse intestinale (Rolhion *et al.*, 2007).

Outre ces systèmes de régulation spécifiques, nous avons abordé dans une deuxième partie de ma thèse l'analyse des régulateurs globaux que sont les protéines de type-histone interagissant directement avec l'ADN et interférant ainsi avec la transcription de nombreux gènes.



## Role of Decreased Levels of Fis Histone-Like Protein in Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive *Escherichia coli* LF82 Bacteria Interacting with Intestinal Epithelial Cells<sup>∇</sup>

Sylvie Miquel,<sup>1,2</sup> Laurent Claret,<sup>1,2,3</sup> Richard Bonnet,<sup>1,2,4</sup> Imen Dorboz,<sup>5</sup>  
Nicolas Barnich,<sup>1,2,3</sup> and Arlette Darfeuille-Michaud<sup>1,2,3\*</sup>

Clermont Université, Université d'Auvergne, JE 2526, F-63000 Clermont-Ferrand, France<sup>1</sup>; INRA, USC-2018, Clermont-Ferrand, France<sup>2</sup>; Institut Universitaire de Technologie, Université d'Auvergne, F-63172 Aubière, France<sup>3</sup>; Centre Hospitalier Universitaire, Bactériologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France<sup>4</sup>; and Clermont Université, Université d'Auvergne, GreD, UMR6247/UMR911 CNRS/Inserm, F-63000 Clermont-Ferrand, France<sup>5</sup>

Received 23 December 2009/Accepted 21 January 2010

**The interaction of Crohn's disease (CD)-associated adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain LF82 with intestinal epithelial cells depends on surface appendages, such as type 1 pili and flagella. Histone-like proteins operate as global regulators to control the expression of these virulence factors. We evaluated the role of histone-like proteins in AIEC reference strain LF82 during infection of intestinal epithelial cells, Intestine-407, and observed that the *fis* mRNA level was decreased. The role of Fis in AIEC LF82 was determined by studying the phenotype of an LF82 *fis*::Km mutant. This was the first mutant of strain LF82 that has been described thus far that is unable to express flagellin but still able to produce type 1 pili. The cyclic-di-GMP pathway linking flagella and type 1 pilus expression is not involved in Fis-mediated regulation, and we identified in the present study Fis-binding sites located upstream of the *fimE* gene and in the intergenic region between *fimB* and *nanC* of the *fim* operon encoding type 1 pili. The major consequence of decreased Fis expression in AIEC bacteria in contact with host cells is a direct downregulation of *fimE* expression, leading to the preferential ON phase of the *fimS* element. Thus, by maintaining type 1 pilus expression, AIEC bacteria, which interact with the gut mucosa, have greater ability to colonize and to induce inflammation in CD patients.**

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease occurring in individuals with a genetic predisposition in whom an environmental or infectious trigger causes an abnormal immune response (53). Several lines of evidence suggest that bacteria play a role in the onset and perpetuation of inflammatory bowel disease (IBD) (45). *Escherichia coli* has been assigned a putative role in CD. The bacteria are abnormally predominant in early and chronic ileal lesions of CD, and most *E. coli* strains isolated from the ileal mucosa of CD patients adhere to intestinal epithelial cells (17, 32). In addition to their ability to adhere, *E. coli* cells are able to invade intestinal epithelial cells and belong to the pathogenic group of *E. coli*, adherent-invasive *E. coli* (AIEC) (10). Many independent studies have reported the abnormal presence of AIEC bacteria associated with ileal mucosa of CD patients (16, 36, 37) owing to increased ileal expression of CEACAM6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6), which acts as a receptor for AIEC binding to the intestinal mucosa (6).

Various bacterial factors act in concert for full virulence of AIEC, including flagella, OmpC, and type 1 pili (5, 9, 13, 43). Experiments performed *in vitro* with cultured intestinal epithelial cells, *ex vivo* with human isolated enterocytes from CD patients, or *in vivo* using transgenic mice expressing human CEACAM receptors showed that type 1 pili play a key role in the ability of AIEC bacteria to adhere to and to invade intes-

tinal epithelial cells and to induce intestinal inflammation (6, 9, 11). Nucleotide sequences of *fim* genes revealed that strain LF82 produces variants of type 1 pili that differ from those of *E. coli* K-12. In the absence of type 1 pili, AIEC bacteria are no longer able to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. Similar loss of adhesion-invasion was observed in flagellum-negative mutants, following coregulation between flagella and type 1 pilus expression, which depends on the level of intracytoplasmic cyclic di-GMP (c-di-GMP) (5, 13). We previously reported that these type 1 pilus variants have to be expressed in the genetic background of strain LF82 in order to promote bacterial uptake since their expression in *E. coli* strain K-12 is not sufficient to confer invasiveness (9). The search for factors involved in the regulation of AIEC virulence led us to focus on the global regulators, histone-like proteins.

In addition to RNA polymerase and transcription factors, the chromosome of *E. coli* cells is bound by a battery of proteins, called histone-like proteins, involved in DNA repair, replication, protection, and folding. Many of these proteins can also act as global transcription factors that bind to the DNA with little or no sequence specificity and operate at a high level in the hierarchy; a relatively small number of DNA binding proteins influences the transcription of large numbers of genes (for a review, see reference 20). Variations in the concentration of these proteins play a part, along with other regulators, in fine-tuning the expression of many genes, including those involved in pathogenesis. Histone-like proteins are generally involved in various delicately balanced processes, and some antagonism between these effects exists. The histone-like proteins known to regulate bacterial virulence are the integration

\* Corresponding author. Mailing address: CBRV, 26 Place H. Dunant, JE 2526, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Phone: 33 4 73 17 79 97. Fax: 33 4 73 17 83 71. E-mail: arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 29 January 2010.



TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Source or reference
<b>Strains</b>		
AIEC LF82	<i>E. coli</i> isolated from an ileal biopsy of a patient with CD	17
K-12 <i>fis</i> ::Km	<i>E. coli</i> K-12 with a kanamycin resistance cassette in the <i>fis</i> gene	23
LF82 <i>fis</i> ::Km	LF82 isogenic mutant deleted of <i>fis</i> gene	This study
LF82 $\Delta$ <i>fliA</i>	LF82 isogenic mutant deleted of <i>fliA</i> gene	13
<b>Plasmids</b>		
pKOBEG	pBAD cloning vector harboring $\lambda$ phage <i>red</i> $\gamma$ $\beta$ $\alpha$ operon; chloramphenicol resistant	12
pKD4	Plasmid with a kanamycin resistance cassette	18
pBAD18	<i>E. coli</i> cloning vector; ampicillin resistant	24
pBAD30	<i>E. coli</i> cloning vector; ampicillin resistant	24
pBAD $\gamma$ <i>hjh</i>	pBAD18 harboring the entire <i>yhjH</i> gene of LF82 <i>E. coli</i>	13
pBAD $\gamma$ <i>fis</i>	pBAD30 harboring the entire <i>fis</i> gene of LF82 <i>E. coli</i> , amplified with <i>fis</i> EcoF and <i>fis</i> HindR primers	This study
pUC18	<i>E. coli</i> cloning vector; ampicillin resistant	NEB <sup>a</sup>

<sup>a</sup> New England Biolabs, Beverly, MA.

host factor (IHF), the histone-like dimeric HU protein, the histone-like nucleoid structuring protein (H-NS), the leucine-responsive regulatory protein (Lrp), and the factor for inversion stimulation (Fis) (19, 30, 35, 39). Fis binds to and bends DNA and associates as a homodimer on the DNA containing a consensus sequence (for a review, see reference 41). It is a regulator of transcription that can act positively or negatively, depending on the location of its binding site with respect to the target promoter. In many cases, the Fis protein can influence transcription by modulating promoter activity through its ability to affect the level of DNA supercoiling. The Fis protein acts as a modulator in the expression of virulence genes during intracellular growth in *Salmonella* (39) and acts as a negative regulator of curli expression in attaching and effacing *E. coli* (44). We show here that decreased levels of Fis in AIEC LF82 bacteria associated with intestinal epithelial cells result in loss of flagellum expression but continuance of type 1 pilus expression through *fimE*-dependent phase variation and independently of the c-di-GMP pathway.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and cell lines.** Strain LF82, which belongs to *E. coli* serotype O83:H1, was isolated from a chronic ileal lesion of a patient with CD. Strain LF82 is sensitive to most antibiotics but not to amoxicillin. It adhered to and invaded HEp-2, Intestine-407, and Caco-2 cells (10). *E. coli* strain JM109 was used as the host strain for cloning experiments. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

Plasmid vectors pBAD18 and pBAD30 Amp<sup>r</sup> were used in cloning experiments. Bacteria were grown routinely in Luria-Bertani (LB) broth or on LB agar plates (Institut Pasteur Production, Marnes-la-Coquette, France) overnight at 37°C. Antibiotics were added to the medium at the following concentrations: ampicillin, 50  $\mu$ g/ml; kanamycin, 50  $\mu$ g/ml; and chloramphenicol, 25  $\mu$ g/ml. Sialic acid was used at 0.1% (wt/vol) (Sigma).

Intestine-407 cells (derived from human intestinal embryonic jejunum and ileum) were purchased from Flow Laboratories, Inc., McLean, VA. Cultured cells were maintained in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in modified Eagle medium (Seromed; Biochrom KG, Berlin, Germany) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (PAA), 1% nonessential amino acids (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 1% L-glutamine (Life Technologies), 200 U of penicillin, 50 mg of streptomycin, and 0.25 mg of amphotericin B per liter and with 1% of minimal essential medium (MEM) vitamin mix X-100 (Life Technologies).

**Separation of plasmid topoisomers by gel electrophoresis.** AIEC LF82 was transformed by electroporation with the pUC18 multicopy plasmid and used to infect the intestinal epithelial cell line Intestine-407. Plasmid DNA was recov-

ered either from bacteria directly or from cells containing intracellular bacteria using a plasmid purification kit (Macherey-Nagel), and plasmids were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel containing 2.5  $\mu$ g/ml of chloroquine. Under these conditions topoisomers that are more supercoiled run faster in the gel than more relaxed topoisomers (26). Samples were transferred to a nylon membrane. A probe targeting the ampicillin resistance cassette on pUC18 was generated using a PCR digoxigenin (DIG) labeling kit (Roche) and the puc18f1 and puc18r1 primers (Table 2), hybridized on the blot, and detected using an anti-DIG antibody, which was visualized using CDP-star (Roche) to reveal the different topoisomers.

**DNA manipulations and PCR experiments.** PCR conditions and all PCR primer sequences are listed in Table 2. DNA to be amplified was released from whole organisms by boiling. Bacteria were harvested from 1.5 ml of an overnight broth culture, suspended in 150  $\mu$ l of sterile water, and incubated at 100°C for 10 min. After centrifugation of the lysate, 5  $\mu$ l of the supernatant was used in the PCR assays. Usually, 30 PCR cycles were performed. Amplification products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel.

**Western blot analysis.** Samples of bacteria were grown overnight at 37°C in LB broth without agitation. A total of 700  $\mu$ l of culture was centrifuged; the pellet of bacteria was suspended in 100  $\mu$ l of SDS sample buffer and heated for 5 min at 95°C, and equivalent amounts of protein extract were separated by SDS-PAGE (12 or 17% polyacrylamide). Proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes (Amersham International), and the membranes were immunoblotted for type 1 pili (rabbit antiserum raised against purified type 1 pilus preparations, diluted 1:7,500), and RNA polymerase alpha subunit (rabbit anti-alpha, 1:10,000). Immunoreactants were detected by autoradiography using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G antibody (1:10,000) and enhancing chemiluminescence (Amersham Biosciences).

**RNA manipulations and real-time RT-PCR.** Total RNAs from bacteria associated with epithelial Intestine-407 cells and from bacteria grown in MEM were extracted using a protocol adapted from Lucchini et al. (34). After treatment with DNase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) to eliminate contaminating DNA, total RNAs were reverse transcribed and amplified using specific primers (Table 2). Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed using an Eppendorf Replex, and quantification of the mRNA level or 16S rRNA (as a control) was performed using RNA Master SYBR Green 1 (Roche Diagnostics) with 0.25  $\mu$ g of total RNA. Amplification of a single expected RT-PCR product was confirmed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

**Construction of *fis* insertion mutant.** To construct *fis* insertion mutants in AIEC strain LF82, the resistance cassette was amplified from *E. coli* K-12 mutants carrying an insertion in the target gene. In addition, strain AIEC LF82 was transformed with pKOBEG plasmids, which encode Red proteins from phage  $\lambda$  under the control of an L-arabinose inducible promoter. Plasmids were maintained in bacteria at 30°C with 25  $\mu$ g/ml of chloramphenicol and killed at 42°C. Strain LF82/pKOBEG was grown at 30°C in the presence of 1 mM L-arabinose to induce Red expression. When the optical density at 620 nm (OD<sub>620</sub>) reached 0.6, the bacterial culture was incubated for 20 min at 42°C to eliminate the plasmid. Bacteria were washed three times with 10% glycerol, and PCR products were electroporated. Replacement of the gene by the kanamycin resistance cassette in mutants was confirmed by PCR.



TABLE 2. Oligonucleotides used and PCR product sizes

Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Use	Annealing temp (°C)
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	473	Kanamycin resistance cassette amplification	54
K2	GGTGCCCTGAATGAACTGCA			
KT	CAGTCATAGCCGAATTACCTT			
<i>hupBF</i> int	TTGATCGACAAGATTGCTGC	199	Localization verification of kanamycin resistance cassette	52
<i>hupBR</i> int	CGCGTCTTTCAGTGCTTTAC		RT-PCR amplification	
<i>hmsF</i> int	GAACAACATCCGTACTCTTC	334	RT-PCR amplification and	52
<i>hmsR</i> int	GATTACAGCTGGAGTACGGC			
<i>ihfA</i> int	TTGATAAGCTTGGGCTTAGC	248	RT-PCR amplification and	52
<i>ihfA</i> int	CGAAGCGTTTTGACCCGGC			
<i>fisF</i>	GAACAGCTGGAGGCGTTGGAG	438	LF82 <i>fis</i> ::Km insertion mutant construction	55
<i>fisR</i>	AATCAAGCATTTAGCTAACCTG			
<i>fisF</i> int	CGAACAACGCGTAAATTCTG	260	RT-PCR amplification and	52
<i>fisR</i> int	GCAGCGTACCACGGTTGATG		LF82 <i>fis</i> ::Km insertion mutant verification	
<i>lrpF</i> int	CAAGAAGCGCCCTGGCAAAG	467	RT-PCR amplification and	52
<i>lrpR</i> int	CCAGACGATTAAGCTGCTTG			
<i>puc18f1</i>	CCTATCTCAGCGATCTGTCT		Synthesis of pUC18 probe	55
<i>puc18r1</i>	GATGGCATGACAGTAAGAGA			
<i>yhjHF</i> int	GCGCCAGATTGAGGATCTTC	241	RT-PCR amplification	55
<i>yhjHR</i> int	GAAAGAAAACCAAGCCTTGTG			
<i>yaiCF</i> int	CTGGTGTTGATGGTGGTTTC	291	RT-PCR amplification	55
<i>yaiCR</i> int	GTTGCATCGCGATTATGCCG			
<i>yegRF</i> int	CCATGAGCAGTTCCTGAAAC	262	RT-PCR amplification	55
<i>yegRR</i> int	CTGCTGTAGTTGTTCAACAG			
<i>fliCF</i> int	TGGTGCTGCAACTGCTAACGC	212	RT-PCR amplification	55
<i>fliCR</i> int	TTATCGGCATATTTGCGCTAGC			
<i>csgDF</i> int	ACGCCTTGCAACCCATTGAC	160	RT-PCR amplification	55
<i>csgDR</i> int	GGCAGGATACTTTGAGCAGG			
<i>MICsgEF</i>	AGAACTACTGCATGTTTGACACGCATTGCA GCCTCCGAACAATTTTTTATGTAG	1573	LF82- <i>DcsgE</i> isogenic mutant construction	55
<i>MICsgER</i>	CCGGACACAAGCGGTTTCTGGGCAAACG ATAACCTCAGGCGATAAAGCCCATATGA ATATCCTCCTTAGTTC			
<i>csgEF</i>	AATCTTTTCAAGAAGATAGCCG	552	LF82- <i>DcsgE</i> isogenic mutant verification	55
<i>csgER</i>	CCAGCCCAACTTAATGGCG			
<i>csgEF</i> int	CTTAACGATTAATGAAAGGCC	208	LF82- <i>DcsgE</i> isogenic mutant verification	55
<i>csgER</i> int	ATCATGCGCCAAATCGCCCG			
<i>fisEcoF</i>	CCGGAATTCCCATTGAGGATGCCAGCGAAC	391	Cloning of the <i>fis</i> gene	55
<i>fisXbaR</i>	GCTCTAGAGCACCTGAATTAGTTCATGCCG			
<i>profimEF</i>	ACTTCGGGTGTGGTTATCTT	75	Synthesis of <i>fimE</i> promoter containing the Fis binding site	50
<i>profimER</i>	TTGAATGAATACCTATAGG			
<i>pronanCF</i>	TCGCGGTGCACCTTATACC	75	Synthesis of <i>nanC</i> promoter containing the Fis binding site	55
<i>pronanCR</i>	AATTGCAAATCTCGTTTTGT			
<i>Fis-nanC-F-FAM</i>	GGTCTCCTGTGAAAATTCTC	567	Footprinting assay containing the Fis binding site	55
<i>Fis-nanC R</i>	TGATGAGAATTATGATCAGC			
<i>Fis-fimE-F-FAM</i>	TAAGTTAACCATATCCATAC	582	Footprinting assay containing the Fis binding site	55
<i>Fis-fimE-R</i>	ACGTAACGGGTGAACGGTAG			
<i>fimEF</i> int	GGCATATCGGCATGGGATGC	168	RT-PCR amplification	50
<i>fimER</i> int	GAACGCTGGACCCAGGAACG			
<i>nanCF</i> int	GTAAGTGACATATCCATCCC	180	RT-PCR amplification	56
<i>nanCR</i> int	CATTTTAGCAGCAACGGCAC			
<i>fimBF</i> int	CCTGACCCATAGTGAAATCG	156	RT-PCR amplification	55
<i>fimBR</i> int	CTTTGCCTTAAGATCAATATC			
<i>FIME</i>	GCAGGCGGTTTGTACGGGG	750	Off-oriented invertible element	55
<i>INV</i>	GAGGTGATGTGAAATTAATTTAC			
<i>FIMA</i>	GATGCGGTACGAACCTGTCC	450	On-oriented invertible element	55
<i>INV</i>	GAGGTGATGTGAAATTAATTTAC			
16S 1	ATGACCAGCCACACTGGAAC	157	RT-PCR amplification	55
16S 2	CTTCTCCCGCTGAAAGTA			



**Transmission electron microscopy.** Bacteria were grown overnight in Luria-Bertani broth without shaking and were fixed and negatively stained with 1% ammonium molybdate on carbon-Formvar copper grids. Gold immunolabeling was performed as follows. A washed bacterial suspension was placed on carbon-Formvar copper grids. Excess liquid was removed, and the grids were placed face down on antiserum (1:1,000) raised against purified type 1 pili for 15 min. After 10 washings, the grids were placed on a drop of gold-labeled goat anti-rabbit serum (Jansen Life Sciences Products, Olen, Belgium) for 15 min. After a further thorough washing, the grids were negatively stained with 1% ammonium molybdate for 1 min.

**Bacterial growth and motility assay.** Each strain was tested for the ability to grow under static conditions in MEM at 37°C for 8 h. The experiment was monitored by measuring the OD<sub>620</sub>. For motility assays, bacteria were grown overnight at 37°C on LB broth, and 2 µl of this culture was inoculated onto 0.3% agar plates. The plates were incubated at 37°C for 10 h, and motility was assessed qualitatively by examining the circular swim formed by the growing motile bacterial cells.

**Yeast cell aggregation assay.** Commercial baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was suspended in phosphate-buffered-saline (PBS; 10 mg dry weight/ml). *E. coli* strains were resuspended to an optical density of 0.2 at 620 nm in PBS. Equal volumes of fixed yeast cell suspension and decreasing concentrations of *E. coli* suspension were used, and aggregation was monitored visually.

**Adhesion assays.** Monolayers were seeded in 24-well tissue culture plates (Polylabo, Strasbourg, France) with 4 × 10<sup>5</sup> cells/well and incubated for 20 h. Monolayers were then infected in 1 ml of the cell culture medium without antibiotics and with heat-inactivated fetal bovine serum at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per epithelial cell. After a 3-h incubation period at 37°C, monolayers were washed three times in PBS (pH 7.2). The epithelial cells were then lysed with 1% Triton X-100 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) in deionized water. Samples were diluted and plated onto Mueller-Hinton agar plates to determine the number of CFU corresponding to the total number of cell-associated bacteria (adherent and intracellular bacteria). The infected monolayers were centrifuged for 10 min at 1,000 × g before the 3-h infection period.

**Consensus elaboration.** The MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) software program (version 4.1.0) was used for the identification of motifs within 65 sequences (Table 3) previously reported to bind Fis protein (1, 25, 48, 51). MEME uses the method of Bailey et al. to identify likely motifs within the input set of sequences (2, 4). It produces a consensus sequence and a position-specific probability matrix, which has probabilities associated with each base at each position. A range of motif widths (≥15 nucleotides in length) and zero or one motif per sequence were specified in our queries.

We then applied the MAST program (version 4.0), using the motif weight matrix from the MEME program, to search for the motif in the *fim* operon as well as for a random sequence model based on the letter composition of the target sequence. The algorithm in MAST calculates position scores for the motif at each possible position within a sequence (3). These scores are translated into position *P* values, which represent the probability of a randomly selected position in a randomly generated sequence having a match score at least as large as that of the given position. The best (i.e., lowest) position *P* values are then adjusted to take into account the length of the sequence. Only the motif hits with a position-specific goodness-of-fit *P* value of less than 10<sup>-4</sup> were considered to identify putative Fis-binding sites (FBSs).

**Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).** DNA binding by the purified Fis protein was assayed by incubating the 75-bp DNA fragment that harbors a Fis-binding site in its center with increasing concentrations of Fis for 15 min in the presence of excess poly(dI-dC) double-stranded DNA to prevent nonspecific interactions. After separation of the products on a 12% native polyacrylamide gel, complexed and uncomplexed DNA fragments labeled with DNA DIG ddUTP by a terminal transferase enzyme fill-in reaction were visualized using an alkaline-phosphatase-coupled anti-DIG antibody (DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation; Roche).

**DNase I footprinting by an automated DNA sequencer.** Probes were generated by PCR with the primers Fis-*nanC*-F-FAM/Fis-*nanC*-R and Fis-*fimE*-F-FAM/Fis-*fimE*-R (where FAM is 6-carboxyfluorescein) (Table 2). The PCRs were performed for 30 cycles under the following conditions: 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 60 s. PCR products, FAM labeled at the 5' end, were purified using a NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) kit and quantified using an Eppendorf BioPhotometer. Each 10-µl reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 8% glycerol, 20 ng of FAM-labeled DNA fragment, and 0.45 nM purified Fis protein. After incubation at 25°C for 15 min, DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), freshly prepared by a 1/10

TABLE 3. The 65 sequences selected to define the motif corresponding to the FBSs

Sequence no.	Gene name or DNA region <sup>a</sup>	Position <i>P</i> value	FBS <sup>b</sup>
1	<i>fis5</i>	3.26e-06	ATT <b>GGTCAAAGTTTGCC</b> TTT
2	7	4.04e-06	TA <b>GGTCAAATTTGACC</b> TATA
3	<i>thru3</i>	1.36e-05	GTC <b>GCATAAAATGTGACC</b> AAT
4	<i>mu1</i> left end	1.62e-05	AAC <b>GACTAAAATTTGCAC</b> TAC
5	<i>nhd1</i>	1.94e-05	ATT <b>GTTTATTATTGAGC</b> GAA
6	<i>hin3</i> distal	2.28e-05	TGC <b>GGTCAAAATTTGCAC</b> TAG
7	<i>ndr</i>	3.18e-05	TATGCC <b>GTTCAAGAAATCGCC</b>
8	<i>rmb1</i>	3.72e-05	AAC <b>GGCAATAATTTGTTT</b> AGC
9	6	3.72e-05	TA <b>GATCAAATTTTGATC</b> TATA
10	<i>ndr4</i>	4.36e-05	CCC <b>GTTCAAGAAATCGCC</b> CGA
11	<i>thru1</i>	4.36e-05	GAT <b>GTTGAAAAGTGTGC</b> TAA
12	<i>hin2</i> proximal	5.07e-05	GGG <b>TGTCAACAATTTGACC</b> AAA
13	<i>tns1</i>	5.07e-05	GGG <b>GATCAAGATCTGATC</b> AAG
14	13	5.07e-05	TA <b>GCTTAAATTTTAAGC</b> TATA
15	<i>aldB4</i>	5.90e-05	ACT <b>GGCGAAGATTTGCCC</b> AGT
16	<i>fis2</i>	7.87e-05	AGT <b>GACTAAAATTTACAC</b> TCA
17	<i>cin2</i> distal	9.04e-05	AAA <b>GCGCAGGATGTGAGC</b> TAA
18	<i>prop1</i>	1.03e-04	AAA <b>GCTCATTAACTGCC</b> AAT
19	<i>aldB3</i>	1.03e-04	AGC <b>GGCTAACAAATTTGCC</b> AGC
20	<i>rmb3</i>	1.34e-04	ACC <b>GCGCAACATTTCAAC</b> AAA
21	<i>tyr3</i>	1.96e-04	TAC <b>GGATGAAAATTCAGC</b> AAC
22	<i>fis6</i>	2.21e-04	ATG <b>AGTTAAGAAATGACC</b> ATA
23	<i>fis</i>	2.21e-04	CTA <b>GTGCAAATTTGAGC</b> GCA
24	<i>nhd2</i>	2.49e-04	GTT <b>GCTGAAAAGATAGGC</b> GAC
25	<i>gin1</i> proximal	2.79e-04	GGG <b>TATCAACAATGACC</b> AGA
26	<i>tgt-sec1</i>	3.13e-04	TGA <b>GCTAAAATTTTATC</b> GAT
27	<i>hin1</i>	3.50e-04	AGC <b>GACTAAAATTTCTTC</b> TTA
28	<i>prop2</i>	3.50e-04	TCC <b>GGTTAAGGAATGTAC</b> AAT
29	<i>mu2</i> right end	3.91e-04	ATA <b>GTTTGGTATTAGCC</b> GCT
30	<i>tyr1</i>	3.91e-04	GGC <b>GATTAAGAAATAATC</b> GTT
31	<i>gin3</i>	4.36e-04	TTT <b>GAAGATAAATTAAGC</b> GGA
32	<i>gin2</i> distal	4.36e-04	TTT <b>GTGCGAGATGTGACC</b> AAA
33	<i>aldB1</i>	4.36e-04	GCT <b>GCGCGATAAATCGCC</b> ACA
34	<i>tgt-sec2</i>	5.39e-04	TTT <b>GGATGAAATATAATC</b> GAT
35	<i>fis1</i>	5.39e-04	TTT <b>CCCGATTATTTCAGC</b> AAA
36	<i>hin4</i>	5.98e-04	GCG <b>GACTGGGATTTGTTT</b> AGG
37	<i>ndr3</i>	5.98e-04	AAA <b>GATTAATAAGCCATC</b> TAT
38	<i>thru2</i>	5.98e-04	CAC <b>GATGAAGAACAAGCC</b> GAA
39	<i>oric1</i>	5.98e-04	ACA <b>ACTCAAAAATCGAAC</b> AAC
40	<i>rmb2</i>	7.32e-04	AAC <b>GCTCGAAAACACTGGC</b> AGT
41	<i>puc19 lacP</i>	8.08e-04	GGT <b>GCCTATTGAGTGAGC</b> TAA
42	<i>cin1</i> proximal	8.08e-04	GCG <b>TATCAACAATTAAGC</b> AAA
43	<i>hin5</i>	8.90e-04	AGT <b>GTTGATTAATTTGTC</b> CAT
44	<i>fis3</i>	8.90e-04	GTG <b>GTGCGATAATTAAGC</b> ATA
45	<i>lambda1 att</i>	9.80e-04	TTT <b>GCATGAAAACACAGC</b> TAC
46	<i>hns2</i>	1.08e-03	TTG <b>GGGTAGCAATAGAGC</b> CTT
47	<i>ndr1</i>	1.18e-03	ACC <b>GAATGAAAACAAGCC</b> ATT
48	<i>hns3</i>	1.30e-03	AGG <b>AAATCAAAATTTGTTT</b> TTT
49	<i>hns7</i>	1.56e-03	AAT <b>GATGAAAAGTAGAAC</b> AAG
50	<i>hns6</i>	1.86e-03	GAA <b>GACTGAAAGGTCGTC</b> AGG
51	<i>fis4</i>	1.86e-03	ATT <b>GCATTTAAAATGAGC</b> GTG
52	<i>hns4</i>	2.61e-03	TCT <b>TTTCATAAAAATTAGC</b> CAG
53	<i>oric2</i>	3.07e-03	TAA <b>GTATACAGATCGTGC</b> GAT
54	<i>cin3</i>	3.33e-03	CTG <b>GGTTAAAAGTTTAC</b> TCC
55	<i>aldB2</i>	3.61e-03	TGT <b>AATCATCATTTCCAC</b> AAC
56	<i>hns1</i>	4.22e-03	TAA <b>GTATTGAGATTACTAC</b> AAT
57	<i>cin4</i>	4.55e-03	GTC <b>GTATGGAAGTTAGAC</b> CGT
58	<i>hns5</i>	5.70e-03	TGA <b>GGTTAAAACCTCCTG</b> ATT
59	<i>lambda3 OLI</i>	5.70e-03	TGC <b>GGTGATAAATTTATCT</b> CTG
60	<i>hns5</i>	6.13e-03	AAC <b>GAATTAAGGTTAACC</b> AGT
61	<i>nhd3</i>	8.13e-03	AAT <b>GGTTATTAACATAGC</b> TCT
62	3	9.32e-03	TA <b>TCTCAAATTTTGAGA</b> TATA
63	<i>lambda2 OLI</i>	1.56e-02	TTC <b>ATATAAAAACATAC</b> AGA
64	<i>ndr2</i>	1.56e-02	ATT <b>GACCAACAATGATAC</b> ATC
65	<i>ndr5</i>	1.87e-02	GAA <b>GAGAAAATTTGTGTA</b> AAA

<sup>a</sup> As described by Shao et al. (48).

<sup>b</sup> The letters in bold indicate the bases included in the 15-residue FBS motif.

dilution, was added. After 5 min at 25°C, digestion was stopped by chilling the sample on ice and the addition of stop solution (0.3 M sodium acetate [NaAc] and 5 mM EDTA). DNA fragments were further purified using a NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) kit and analyzed using an ABI Prism 3100 Genetic



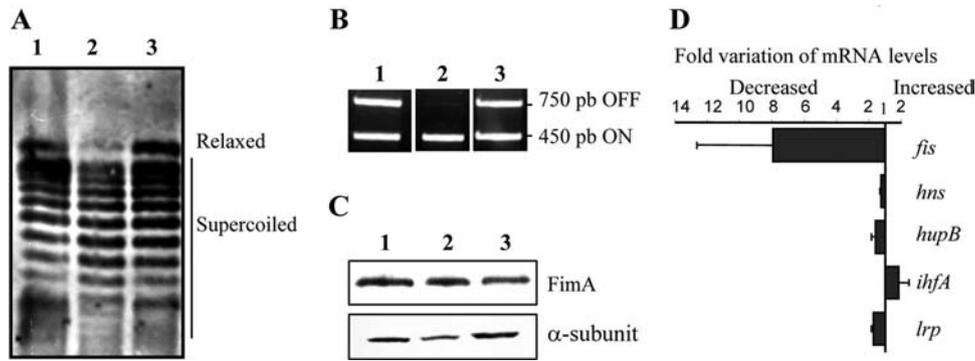


FIG. 1. DNA supercoiling, orientation of the *fimS* element, and quantification of *fis*, *hns*, *hupB*, *ihfA*, and *lrp* mRNA levels in AIEC LF82 associated with intestinal epithelial cells. (A) The wild-type strain harboring pUC18 reporter was used to infect Intestine-407 cells for 3 h or was grown in MEM or conditioned MEM. Plasmid DNA was separated by electrophoresis on 1% agarose gel containing 2.5  $\mu$ g/ml chloroquine, and topoisomers were detected by hybridization with DIG-labeled pUC18 probe. (B) Determination of the orientation of the *fim* operon invertible element in wild-type AIEC LF82 strain grown in MEM or in conditioned MEM for 3 h or after a 3-h infection period of Intestine-407 cells. A 450-bp product revealed ON orientation, and the 750-bp product revealed the OFF orientation of the invertible element. (C) Determination of the amount of the FimA subunit by Western blotting using antibodies raised against type 1 pili was performed. As a control, Western blot analysis was performed using antibodies raised against the  $\alpha$ -subunit of RNA polymerase. (D) mRNA levels of *fis*, *hns*, *hupB*, *ihfA*, and *lrp* genes encoding histone-like proteins in AIEC LF82 bacteria after a 3-h infection period of Intestine-407 cells relative to levels in AIEC LF82 bacteria grown for 3 h in MEM cell culture medium using real-time RT-PCR. As controls, 16S rRNA levels were measured. Only experiments showing the same levels of 16S rRNA for each sample were taken into account. Data represent means of at least three separate experiments; bars indicate standard errors of the means (SEM). Lanes 1, wild-type AIEC LF82 strain grown in MEM; lanes 2, AIEC LF82 after a 3-h infection period of Intestine-407 cells; lanes 3, AIEC LF82 grown in conditioned MEM for 3 h.

Analyzer (Applied Biosystems) capillary sequencer. A GeneScan 400HD ROX size standard (Applied Biosystems) ladder was used as an internal control.

**Statistical analysis.** To analyze the significance of differences between adhesion and invasion levels, a Student's *t* test was used for comparison of two groups of data. All experiments were made at least three times. A *P* value of less than or equal to 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**Expression of histone-like protein-encoding genes in cell-associated bacteria.** To explore the involvement of global regulators in the ability of AIEC bacteria to adhere to intestinal epithelial cells, we first compared the variations in DNA supercoiling in cell-associated bacteria and in bacteria cultured in cell culture medium. We compared changes in supercoiling levels of reporter plasmid pUC18 control DNA in Intestine-407 cell-associated LF82 bacteria and in bacteria grown in MEM or conditioned MEM. In cell-associated AIEC LF82 bacteria, the supercoiling levels of plasmid topoisomers were higher than those from AIEC LF82 bacteria grown in cell culture medium or conditioned medium (Fig. 1A). As type 1 pili are the major bacterial factors responsible for the ability of AIEC LF82 bacteria to adhere, we analyzed AIEC type 1 pilus expression in bacteria associated with intestinal epithelial cells. The regulation of type 1 pilus expression is controlled by a process called phase variation that allows bacteria to switch between piliated (ON) and nonpiliated (OFF) states by inverting an *fimS* DNA element located upstream of the *fim* operon. Thus, we analyzed the orientation of *fimS* using a PCR-based approach (47). In cell-associated AIEC bacteria, we observed a preferential ON-phase orientation, whereas in AIEC bacteria grown in cell culture medium alone or in conditioned cell culture medium approximately half of the bacteria in the population were in OFF phase (Fig. 1B). However, Western blot analysis did not reveal an increased level of FimA, the major subunit of type 1 pili, in cell-associated AIEC bacteria (Fig.

1C), which is certainly due to the fact that LF82 bacteria grown in MEM were highly piliated and any increase in piliation was difficult to measure. Type 1 pilus expression depends on DNA relaxation in *E. coli* (15), and histone-like proteins participate in the organization of the nucleoid by affecting DNA supercoiling (50). We therefore measured the levels of *hupB*, *ihfA*, *fis*, *hns*, and *lrp* mRNAs, encoding HU $\beta$ , IHF $\alpha$ , Fis, H-NS, and Lrp proteins, respectively, by RT-PCR in LF82 bacteria after a 3-h infection period of Intestine-407 epithelial cells or after 3 h of bacterial growth in MEM (Fig. 1D). The levels of mRNA encoding H-NS, HU $\beta$ , IHF $\alpha$ , and Lrp histone-like proteins were not significantly different between cell-associated AIEC LF82 bacteria and bacteria grown in MEM, indicating that these histone-like proteins were unchanged during the infection process. In contrast, the *fis* mRNA level was  $7.9 \pm 4.7$ -fold decreased in bacteria interacting with Intestine-407 cells, but due to a large dispersion of the values (ranging from 1.3- to 31.1-fold), only a trend toward significance was observed (*P* = 0.09). Thus, these findings suggest that decreased levels of Fis in AIEC LF82 bacteria in contact with intestinal epithelial cells could be responsible for variations in DNA supercoiling and thus for the preferential ON-phase orientation of type 1 pilus expression.

**Phenotype of AIEC LF82 Fis-negative mutant.** In order to evaluate the role of Fis histone-like protein in the ability of AIEC strain LF82 to adhere to Intestine-407 cells, an insertion mutant interrupted in the *fis* gene was constructed. Growth curves during an 8-h period in MEM of the Fis histone-like protein-negative mutant were similar to those of wild-type strain LF82 (data not shown). Analysis of the LF82 *fis*::Km mutant phenotype indicated that it was nonmotile (data not shown) and did not express FliC, and no flagella were observed in the LF82 *fis*::Km mutant by electron microscopy examination (Fig. 2A). Immunogold labeling assays using polyclonal



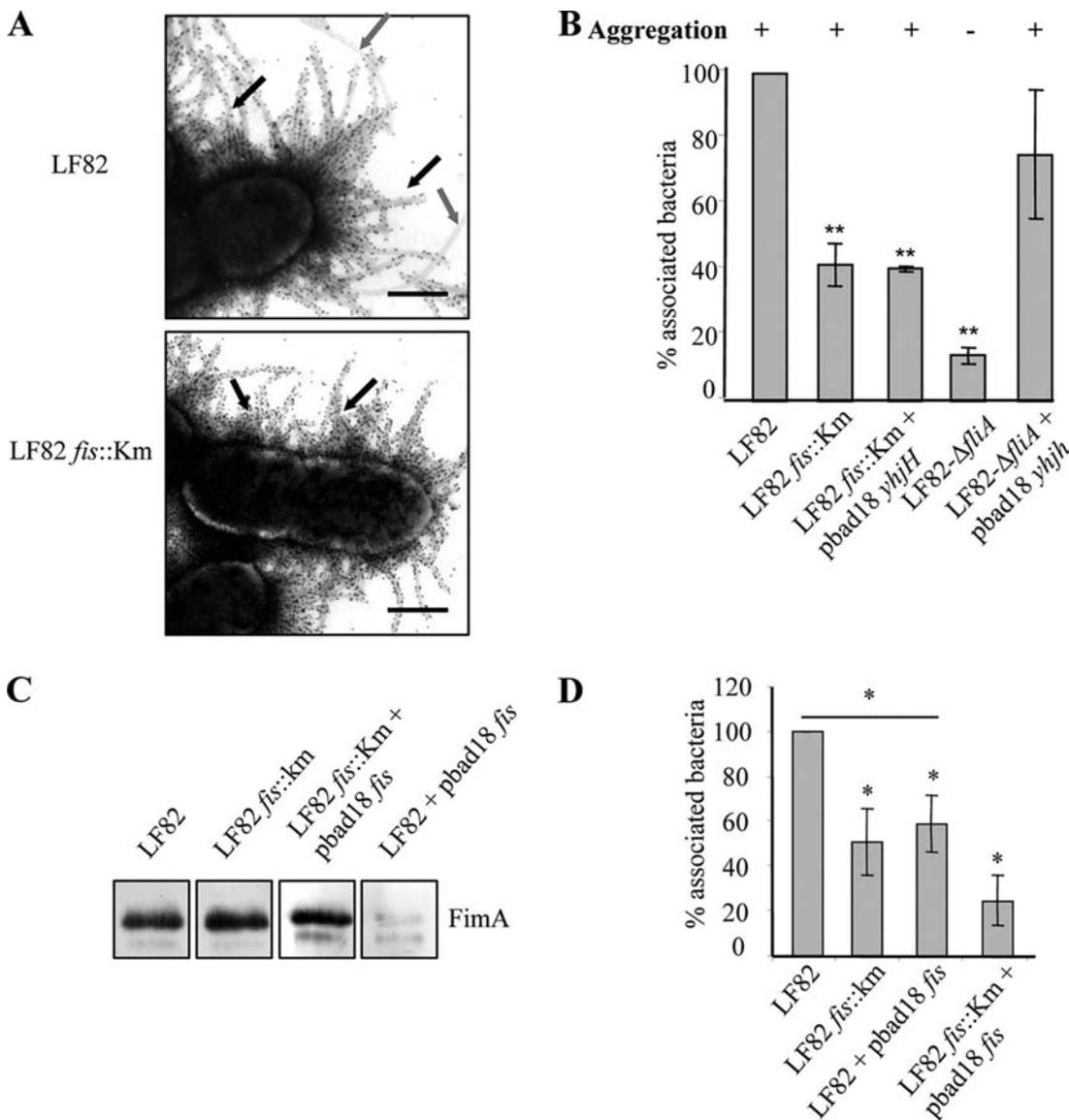


FIG. 2. Type 1 pilus expression and adhesion ability of LF82 wild-type strain and LF82 *fis::Km* mutant with induced YjhH and Fis expression. (A) Transmission electron microscopy (TEM) examination of bacteria stained using immunogold labeling with antibodies raised against purified type 1 pili (black arrow). Flagella (gray arrow) were observed only on the surface of wild-type bacteria. The black scale bar represents 500 nm. (B) In LF82  $\Delta$ *fliA* and LF82 *fis::Km* mutants harboring the pBAD $yjhH$  construct, expression of YjhH protein was induced using 0.1% arabinose. Intestine-407 cell-associated bacteria were quantified after centrifugation and a 3-h infection period. The mean number of cell-associated LF82 bacteria was  $7.2 \times 10^6 \pm 3.9 \times 10^5$  CFU. Results are expressed as cell-associated (adherent plus intracellular) bacteria relative to those obtained for strain LF82, taken as 100%. Each value is the mean  $\pm$  SEM of at least four separate experiments. The expression of functional type 1 pili was evaluated by determination of the yeast aggregation. (C) Determination of the amount of FimA subunit by Western blotting using antibodies raised against type 1 pili. (D) Overexpression of Fis was induced in LF82 *fis::Km* and the wild-type strain harboring pBAD*fis* construct with 0.1% arabinose. Intestine-407 cell-associated bacteria were quantified after centrifugation and a 3-h infection period. The mean number of cell-associated LF82 bacteria was  $7.8 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^5$  CFU. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

antibody raised against purified type 1 pili revealed that the Fis-negative mutant produced amounts of type 1 pili similar to those of the wild-type strain (Fig. 2A). Unexpectedly, a significant decrease in adhesion was observed for the LF82 *fis::Km* mutant, with residual adhesion of 41.6% (Fig. 2B). The decrease in the ability of the LF82 *fis::Km* mutant to adhere was type 1 pilus independent since the LF82 *fis::Km* mutant still expressed functional type 1 pili on the bacterial surface, as assessed by the ability of the bacteria to aggregate yeast cells

via binding to D-mannose residues located on the yeast surface (Fig. 2B). We previously reported that nonflagellated LF82 bacteria were unable to produce type 1 pili (5) and that the intracellular level of cyclic di-GMP is involved in the coregulation between flagella and type 1 pilus expression in AIEC strain LF82 (13). Data reported here indicate that this coregulation is impaired in the LF82 *fis::Km* mutant and suggest that the Fis protein could regulate an unidentified adhesion factor. This is not curli fimbriae, whose expression depends on the



TABLE 4. Quantification of *yaiC*, *yhjH*, *ycgR*, and *fliC* expression in AIEC strain LF82 and *fis* mutant strain

Gene	Decrease in mRNA <sup>a</sup>	Function
<i>fliC</i>	1776.72 ± 0.01*	Flagellin protein
<i>yaiC</i>	1.74 ± 0.19	Cyclase
<i>yhjH</i>	22.37 ± 0.04*	Phosphodiesterase
<i>ycgR</i>	8.03 ± 0.07*	c-di-GMP receptor
<i>csuD</i>	1.11 ± 0.23	Activator of curli

<sup>a</sup> Fold decrease in mRNA levels in the LF82 *fis*::Km mutant strain relative to that of wild-type strain LF82 using real-time reverse transcription-PCR. 16S rRNA levels were measured as controls. Only experiments showing the same levels of 16S rRNA for each sample were taken into account. Data are mean ± standard error of at least three separate experiments. \*,  $P < 0.01$ .

intracellular level of cyclic di-GMP since an AIEC LF82  $\Delta$ *csuGE* negative mutant presented no defect in its adhesion ability (data not shown), and no difference in *csuD* mRNA level was observed between the *fis* mutant and wild-type strain LF82 (Table 4).

To evaluate whether the c-di-GMP pathway could be involved in the impaired ability of the LF82 *fis*::Km mutant to adhere, we measured mRNA levels in the LF82 *fis*::Km mutant of genes *yhjH* encoding the EAL domain phosphodiesterase YhjH, *yaiC* encoding the GGDEF domain diguanylate cyclase YaiC, and *ycgR* encoding the c-di-GMP specific receptor YcgR in the LF82 *fis*::Km mutant and in wild-type strain LF82. The *yaiC* mRNA level was not modified in the LF82 *fis*::Km mutant (Table 4). Conversely, those of *yhjH* and *ycgR* were 22.3-fold and 8.0-fold lower, respectively, in the LF82 *fis*::Km mutant than in wild-type strain LF82. These decreases were similar to those observed in the LF82  $\Delta$ *fliA* isogenic mutant (13). Thus, we induced expression of the phosphodiesterase YhjH in the LF82 *fis*::Km mutant to decrease the intracellular concentration of c-di-GMP. The pBAD $yhjH$  plasmid carrying the *yhjH* gene under an arabinose-inducible promoter was therefore

transformed into the LF82 *fis*::Km mutant (Fig. 2B). Similar experiments were performed with the LF82  $\Delta$ *fliA* mutant as a control to confirm that overexpression of YhjH restored its ability to interact with Intestine-407 cells (Fig. 2B). The induced expression of YhjH in the LF82 *fis*::Km mutant did not restore its ability to adhere, which suggests that there could exist an as yet unidentified adhesive factor whose expression is decreased in an AIEC LF82 *fis*-negative mutant independently of the intracellular concentration of c-di-GMP.

To further understand why the LF82 *fis*::Km mutant, which did not express flagella, did not behave like the LF82  $\Delta$ *fliA* mutant with regard to type 1 pilus expression, we investigated whether Fis could have a direct role in the expression of these fimbriae. We induced overexpression of Fis in the AIEC LF82 wild-type strain and observed impaired FimA expression (Fig. 2C) and, consequently, significantly decreased adhesion ability (Fig. 2D). Of note, overexpression of the Fis protein in the LF82 *fis*::Km mutant induced an even greater decrease in adhesion. Together, these results indicated that there could exist in AIEC strain LF82 two mechanisms that regulate the ability of LF82 bacteria to adhere to intestinal epithelial cells and that involve different Fis concentrations.

**Regulation of AIEC strain LF82 type 1 pilus expression by the Fis histone-like protein.** We therefore searched for motifs in Fis-binding sites (FBSs) using the MEME program. This analysis identified a 15-residue motif (5'-GGTCAAAAATG ACC-3') as the best possible FBS. Position *P* values of FBSs varied between  $3.26 \times 10^{-6}$  and  $1.87 \times 10^{-2}$  because of the low specificity of Fis-DNA interactions. The information content diagram provides information on which positions in the motif are the most highly conserved (Fig. 3A). We then used the MAST program to search for the presence of the motifs in the regulatory regions of the *fim* operon and in random sequences. One motif was observed 58 bp upstream of the *fimE* gene, encoding the FimE recombinase, which catalyzes the

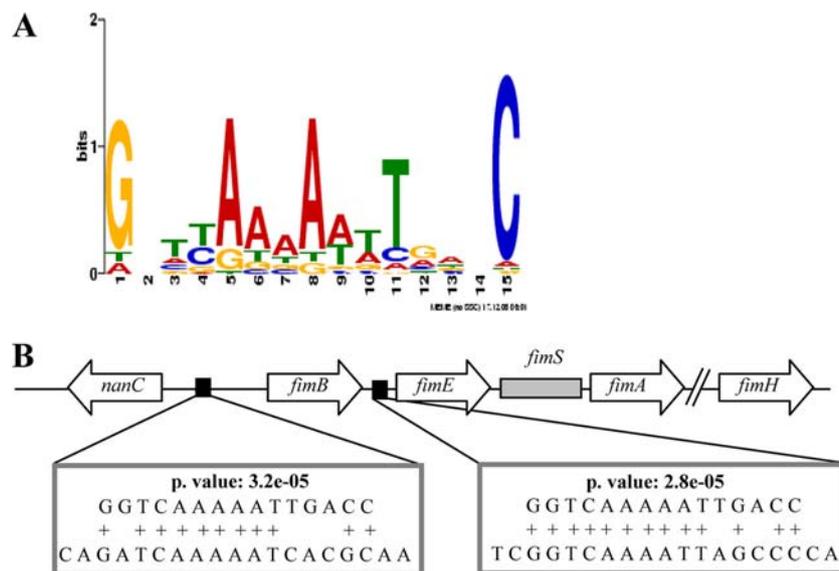


FIG. 3. Identification of specific FBSs in the *fim* operon. (A) Sequence logo generated from 65 Fis-defined FBSs and their complements displays the relative functional contribution of bases within the 15-bp core sequence of the Fis-binding site. Each column (position) in a motif can be characterized by the amount of information it contains (measured in bits). Highly conserved positions in the motif have high information content; positions where all letters are equally likely have low information content. (B) Location of putative identified FBS in regulatory regions of *fim* operon.



ON-to-OFF inversion of the *fimS* DNA element; the other motif was detected in the intergenic region between the *nanC* gene (440 bp upstream), encoding the *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid) outer membrane channel protein, and the *fimB* gene (1,009 bp upstream), encoding the FimB recombinase which catalyzes both ON-to-OFF and OFF-to-ON inversions (Fig. 3B). Their position-specific goodness-of-fit *P* values were  $2.8 \times 10^{-5}$  and  $3.2 \times 10^{-5}$  for DNA sequence upstream of *fimE* and *nanC-fimB*, respectively. Among the 15 residues of the motif, only two mismatches were observed in comparison with the best possible FBS for the sequence upstream of *fimE*, and four mismatches were observed for the sequence in the intergenic region *nanC-fimB*. Of note, no putative FBS was found 1 kb upstream of the start codon of the other identified genes involved in adhesion and invasion of AIEC LF82, such as the *yfgI*, *ompC*, and *nlpI* genes, indicating that among the genes previously described in AIEC LF82 bacteria, only type 1 pilus expression could be regulated by Fis.

To confirm that the Fis protein is able to specifically bind DNA upstream of *fimE* and *nanC-fimB* and thus directly control their expression, EMSAs were performed using various Fis concentrations with a 75-bp DIG-labeled DNA fragment harboring putative FBSs. The purified Fis protein was able to bind specifically to the *fimE* promoter and in the intergenic *nanC-fimB* region, forming two complexes with low Fis protein concentrations (between 0.02 and 0.22 nM), and a 100-fold excess of non-labeled DNA competitor abrogated the shift (Fig. 4A and B). The two FBSs identified in the type 1 pilus regulatory region were bound with an affinity that was similar to that of Fis for its high-affinity binding sites (48) and required Fis concentrations of 0.033 nM to achieve more than 50% binding. As a control, Fis protein at concentrations similar to those used in the shift assays was unable to bind with similar affinity to an unrelated DNA sequence that did not harbor an FBS (Fig. 4C). DNase I footprinting with 0.45 nM purified Fis protein using 5'-FAM PCR products harboring the predicted FBS in a central position (567 bp for the intergenic region *nanC-fimB* and 582 bp in the region located upstream of *fimE*) was performed using a capillary DNA sequencer. The results revealed that Fis protein bound to FBS-predicted sequences, 5'-GATCAAAAATCAGCG-3' in the intergenic *nanC-fimB* region and 5'-GGGCTAATTTTGACC-3' in the region upstream of *fimE* (Fig. 5), confirming that the FBSs upstream of *fimE* and *nanC-fimB* were able to specifically bind Fis.

**Fis positively controls *fimE* expression but negatively controls that of *nanC*.** In order to verify that Fis could directly regulate the expression of genes encoding NanC and the two recombinases FimE and FimB, *fimE*, *fimB*, and *nanC* mRNA levels were measured in the LF82 *fis::Km* mutant and in wild-type strain LF82. Concerning *fimB*, only a 1.5-fold decrease in mRNA level was observed between the LF82 *fis::Km* mutant and wild-type strain LF82 (Fig. 6A). The *fimE* mRNA level was 2.7-fold lower in LF82 *fis::Km* mutant than in the LF82 wild-type strain. In contrast, the *nanC* mRNA level was increased 9.7-fold in the LF82 *fis::Km* mutant compared to wild-type strain LF82. We can speculate that in the wild-type strain LF82, Fis activates *fimE* expression and represses *nanC* expression. Western blot analysis using anti-type 1 pilus antibodies indicated similar levels of FimA proteins in wild-type LF82 bacteria and in the *fis*-negative mutant in the presence or

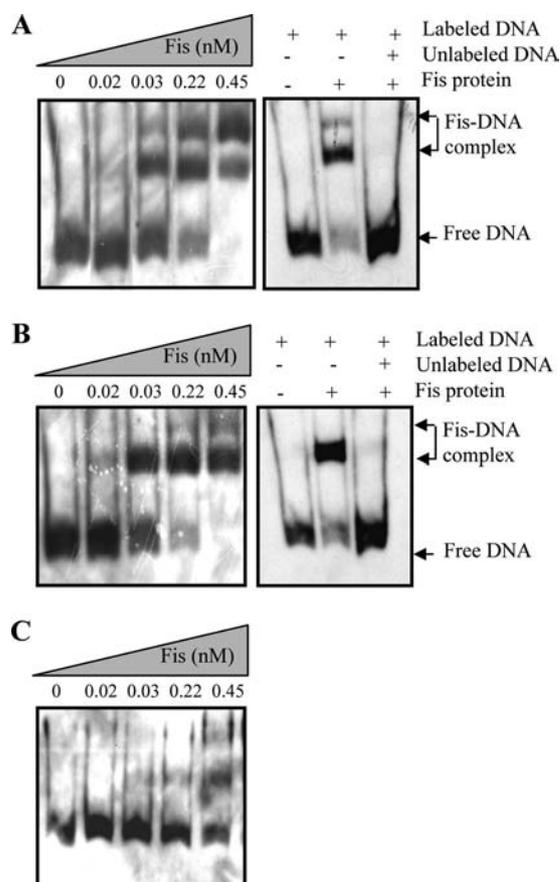


FIG. 4. Validation of putative FBS by EMSA. Binding of purified Fis to the 75-bp labeled DNA fragments and with an excess of unlabeled DNA bearing the *fimE* promoter (A), intergenic *nanC-fimB* region (B), or an unrelated DNA sequence (C). The DNA fragments were incubated with increasing concentrations of Fis or with 0.045 nM Fis in the presence of 1,000-fold excess of nonspecific competitor poly(dI-dC). The protein was incubated with the DNA for 15 min at room temperature, and samples were analyzed on a native 12% polyacrylamide gel.

absence of sialic acid (Fig. 6B). In addition, predominant ON-phase variation was observed in the *fis* mutant independently of sialic acid (Fig. 6C) and could be directly attributable to decreased FimE levels. In order to evaluate whether Fis interacts in the sialic acid-mediated activation of the *fim* operon, *nanC* mRNA levels were measured in the absence or presence of 0.1% of sialic acid in the LF82 *fis::Km* mutant and in wild-type strain LF82 during exponential growth phase. The expression of the *nanC* gene was increased 99.9- and 199.7-fold by sialic acid in the wild-type strain and the LF82 *fis::Km* mutant, respectively, indicating significantly increased expression of *nanC* in the *fis* mutant compared to that of the wild-type strain ( $P = 0.01$ ) (Fig. 6D). In the LF82 *fis::Km* mutant, the absence of repression by Fis and the activation by sialic acid act in a synergic manner on the expression of *nanC*. As the membrane channel protein NanC, which allows sialic acid entry, regulates *fimB* expression through the regulators NanR and NagC (14), we measured *fimB* expression in the presence or absence of 0.1% sialic acid in the LF82 *fis::Km* mutant and in wild-type strain LF82. With regard to the absence of sialic acid, the *fimB*



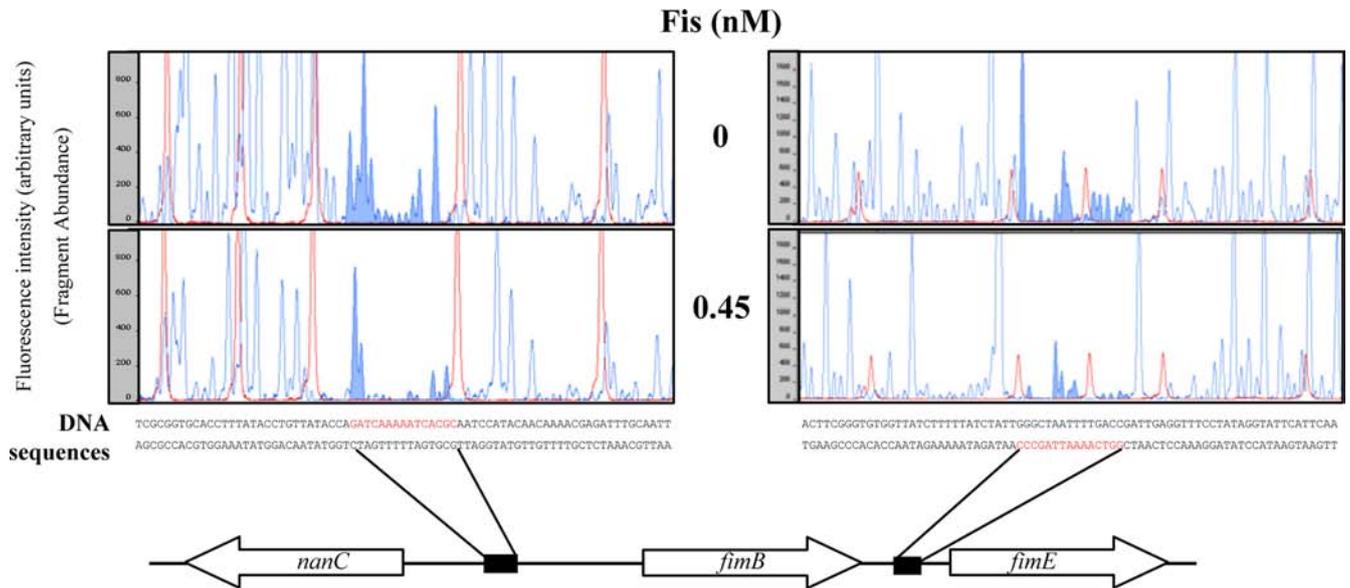


FIG. 5. DNase I footprinting using an automated capillary sequencer in the *fim* regulatory regions. Electropherograms showed a protection pattern of the *fimE* (left panel) and *nanC-fimB* (right panel) promoters after digestion with DNase I following incubation in the presence (bottom panel) or absence (top panel) of Fis (0.45 nM). Corresponding DNA sequences are given below the electropherograms and focus on the region corresponding to the *in silico* identified FBS (blue peaks). Red peaks represent the DNA ladder.

mRNA levels were 1.7- and 17.5-fold lower in the wild-type strain and the LF82 *fis::Km* mutant, respectively, in the presence of sialic acid (Fig. 6D). Thus, Fis via regulation of FimE expression could have a more dominant role than the effect of sialic acid on the regulation of type 1 pilus phase variation.

## DISCUSSION

It is well established that the histone-like proteins operate as global regulators to control the expression of numerous genes, including virulence genes (21). The transcriptional adaptation of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) was evaluated by comparing DNA supercoiling in bacteria associated with intestinal epithelial cells and in bacteria grown in cell culture medium. Direct contact between bacteria and cells led to an increase in bacteria DNA supercoiling. In addition, in cell-associated AIEC bacteria, a preferential ON-phase orientation of the *fimS* invertible element controlling type 1 pilus expression was observed. The investigation of histone-like protein expression in cell-associated AIEC LF82 bacteria showed that the *fis* mRNA level was much lower during interaction with intestinal epithelial cells than in bacteria grown in cell culture medium (MEM). This suggests that Fis plays a key role during infection that could be linked to DNA supercoiling observed in cell-associated bacteria. Fis has been reported to play a role in DNA relaxation (20, 50), and modification of *fis* expression has been observed during cell infection by *Enterobacteriaceae*. Downregulation of *fis* expression in AIEC during infection of epithelial cells was reminiscent of that observed in *Shigella* (34). In contrast, upregulation of Fis correlates with increased invasion of epithelial Caco-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (40).

Type 1 pili are filamentous appendages produced by many species of enteric bacteria. They promote attachment to a

variety of eukaryotic cells by a process inhibited by D-mannose. We previously demonstrated that type 1 pili play a key role in the ability of AIEC bacteria to adhere to and to invade intestinal epithelial cells (6, 9) and that in an AIEC genetic background, a *fliA* mutation that abolishes the biogenesis of flagella leads to a loss of type 1 pilus expression through the intracellular concentration of the c-di-GMP secondary messenger (13). The phenotype determination of the LF82 *fis::Km* negative mutant revealed that it is nonmotile. This could result from a negative feedback into the class III gene since we observed a downregulation of *fliC* gene expression. Interestingly, the lack of motility in the LF82 *fis::Km* negative mutant is not associated with a type 1 pilus defect. This is the first example of a flagellum-defective mutant in AIEC strain LF82 that does not show a loss of type 1 pilus expression (5, 43). We demonstrated in the present study that the Fis regulation bypassed the c-di-GMP pathway to control type 1 pilus expression since the overexpression of *yhjH* in the *fis* mutant did not restore the adhesion level.

The transcription of the *fim* operon encoding type 1 pili depends on the invertible 314-bp DNA element (the *fimS* switch), which is located upstream of the *fim* operon and which contains the *fim* promoter. In *E. coli*, the orientation of *fimS* is determined by the influence of two upstream, *trans*-acting gene products, FimB and FimE, that function as site-specific recombinases (31). FimB mediates inversion of the invertible element *fimS* in both directions, whereas FimE rearranges DNA in the OFF position (38). Efficient inversion of *fimS* by FimB and FimE recombinases requires the histone-like proteins Lrp, IHF, and H-NS, which induce sharp bends in DNA and DNA relaxation (8, 15, 29, 47, 49). In the present study, we observed a very high proportion of bacteria in the ON phase in the LF82 *fis::Km* mutant, and impaired type 1 pilus expression in wild-type AIEC overexpressing Fis was observed, indicating that Fis







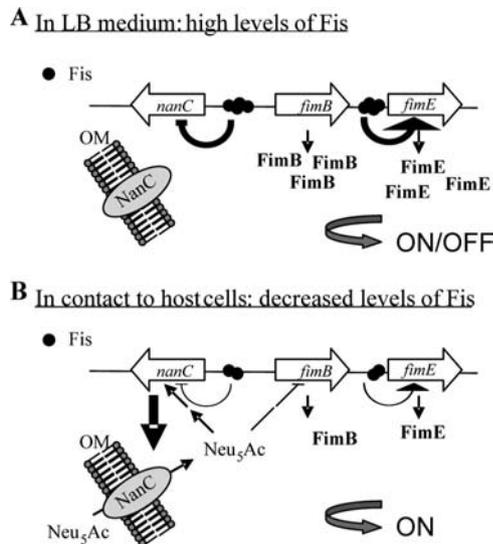


FIG. 7. Model of regulation of type 1 pilus expression in AIEC strain LF82 grown in cell culture medium (MEM) or in contact with intestinal epithelial cells. (A) In MEM, AIEC LF82 bacteria expressed high levels of Fis, leading to a repression of *nanC* and activation of *fimE* expression. As a consequence, there is equilibrium between the expression of the two recombinases FimE and FimB, and the population of AIEC LF82 bacteria in MEM is equally distributed among the ON and the OFF phases. (B) AIEC LF82 bacteria in contact with intestinal epithelial cells exhibited decreased Fis expression, leading to Fis-dependent decreased activation of *fimE*, and nullified inhibition of *nanC*, encoding NanC, the *N*-acetylneuraminic acid (Neu<sub>5</sub>Ac) outer membrane channel, which allows entry of this amino sugar into bacteria. As a consequence, in addition to decreased levels of the recombinase FimE, FimB expression is decreased. Consequently, AIEC LF82 bacteria associated with intestinal epithelial cells are highly piliated due to the predominant ON phase of the *fim* promoter. OM, outer membrane.

Understanding the mechanism of regulation of type 1 pilus phase variation provides insights into how AIEC bacteria coordinate the expression of cell surface factors during infection. Under conditions encountered by bacteria in the gastrointestinal tract, it has been speculated that AIEC bacteria are hyperflagellated by activation of the  $\sigma^E$  regulatory pathway (43). This allows AIEC bacteria to move through the mucus layer and to reach the surface of the gut epithelium. In the present study, when the bacteria reached the intestinal epithelial cell surface, we observed a decrease in *fis* expression in AIEC LF82 and consequently a decrease in flagellum expression. As a consequence of Fis downregulation, the population of AIEC LF82 bacteria associated with intestinal epithelial cells was predominantly in the ON phase. Since AIEC bacteria strongly adhere via type 1 pili to the CEACAM6 molecule, which is overexpressed in the ileal mucosa of CD patients (6, 11), such changes in gene expression in cell-associated bacteria may enhance bacterial colonization and, hence, inflammation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie (JE2526), by the Institut National de Recherche Agronomique (USC 2018), and by grants from the Association F. Aupetit (AFA), Institut de Recherche des Maladies de l'Appareil Digestif (IRMAD, Laboratoire Astra France), and European Commission through FP7 IBDase project and ERA-NET Pathogenomics.

We thank Reid Johnson for generously supplying purified Fis protein. We thank Karen Krogfelt and the World Health Organization International *Escherichia coli* Centre (Copenhagen, Denmark) for *E. coli* type 1 pilus antibodies and Annie Kolb (Unité des Régulations Transcriptionnelles, Département de Microbiologie Fondamentale et Médicale, Institut Pasteur, Paris, France) for the  $\alpha$ -subunit of RNA polymerase antibodies. We thank Josette Rouvière Yaniv for the K-12 *fis::Km* mutant. We also thank Christelle Blavignac and Claire Sczepaniak (CICS, Université d'Auvergne, France) for technical assistance with electron microscopy.

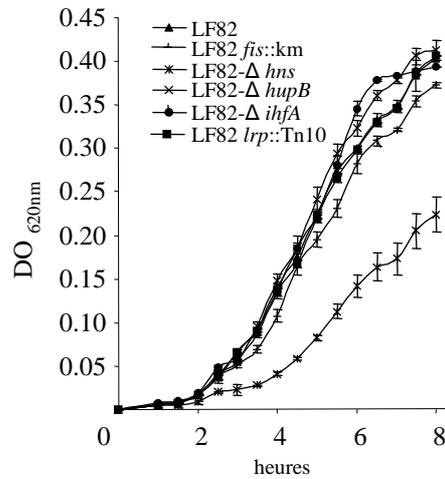
We have no conflicting financial interests.

#### REFERENCES

- Augustin, L. B., B. A. Jacobson, and J. A. Fuchs. 1994. *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J. Bacteriol.* **176**:378–387.
- Bailey, T. L., and C. Elkan. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **2**:28–36.
- Bailey, T. L., and M. Gribskov. 1998. Combining evidence using *P*-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* **14**:48–54.
- Bailey, T. L., N. Williams, C. Misleh, and W. W. Li. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* **34**:W369–W373.
- Barnich, N., J. Boudeau, L. Claret, and A. Darfeuille-Michaud. 2003. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* **48**:781–794.
- Barnich, N., F. A. Carvalho, A. L. Glasser, C. Darcha, P. Jantschkeff, M. Allez, H. Peeters, G. Bommelaer, P. Desreumaux, J. F. Colombel, and A. Darfeuille-Michaud. 2007. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* **117**:1566–1574.
- Betermier, M., D. J. Galas, and M. Chandler. 1994. Interaction of Fis protein with DNA: bending and specificity of binding. *Biochimie* **76**:958–967.
- Blomfield, I. C., D. H. Kulasekara, and B. I. Eisenstein. 1997. Integration host factor stimulates both FimB- and FimE-mediated site-specific DNA inversion that controls phase variation of type 1 fimbriae expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **23**:705–717.
- Boudeau, J., N. Barnich, and A. Darfeuille-Michaud. 2001. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **39**:1272–1284.
- Boudeau, J., A. L. Glasser, E. Masseret, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud. 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* **67**:4499–4509.
- Carvalho, F., N. Barnich, A. Sivignon, C. Darcha, C. Chan, C. Stanners, and A. Darfeuille-Michaud. 2009. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* doi:10.1084/jem.20090741.
- Chaveroche, M. K., J. M. Ghigo, and C. d'Enfert. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**:E97.
- Claret, L., S. Miquel, N. Vieille, D. A. Ryjenkov, M. Gomelsky, and A. Darfeuille-Michaud. 2007. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **282**:33275–33283.
- Condemine, G., C. Berrier, J. Plumbridge, and A. Ghazi. 2005. Function and expression of an *N*-acetylneuraminic acid-inducible outer membrane channel in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:1959–1965.
- Corcoran, C. P., and C. J. Dorman. 2009. DNA relaxation-dependent phase biasing of the *fim* genetic switch in *Escherichia coli* depends on the interplay of H-NS, IHF and LRP. *Mol. Microbiol.* **74**:1071–1082.
- Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie, and J. F. Colombel. 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**:412–421.
- Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, N. Barnich, E. Lederman, P. Di Martino, P. Desreumaux, L. Gambiez, B. Joly, A. Cortot, and J. F. Colombel. 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**:1405–1413.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:6640–6645.
- Dorman, C. J. 2007. H-NS, the genome sentinel. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:157–161.
- Dorman, C. J. 2009. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv. Appl. Microbiol.* **67**:47–64.
- Dorman, C. J., and P. Deighan. 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**:179–184.
- El-Labany, S., B. K. Sohanpal, M. Lahooti, R. Akerman, and I. C. Blomfield.

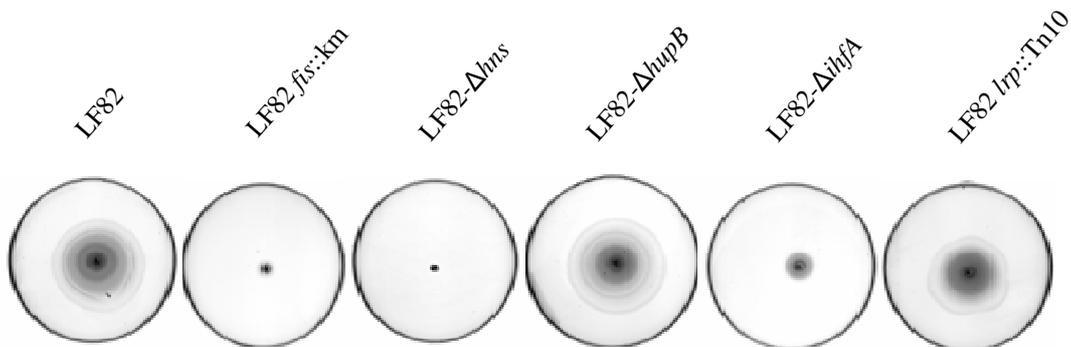


2003. Distant cis-active sequences and sialic acid control the expression of *fimB* in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **49**:1109–1118.
23. Gonzalez-Gil, G., P. Bringmann, and R. Kahmann. 1996. FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **22**:21–29.
24. Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121–4130.
25. Hengen, P. N., S. L. Bartram, L. E. Stewart, and T. D. Schneider. 1997. Information analysis of Fis binding sites. *Nucleic Acids Res.* **25**:4994–5002.
26. Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, and E. Bremer. 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. Typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569–584.
27. Holden, N., I. C. Blomfield, B. E. Uhlin, M. Totsika, D. H. Kulasekara, and D. L. Gally. 2007. Comparative analysis of FimB and FimE recombinase activity. *Microbiology* **153**:4138–4149.
28. Keane, O. M., and C. J. Dorman. 2003. The *gyr* genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by the factor for inversion stimulation, Fis. *Mol. Genet Genomics* **270**:56–65.
29. Kelly, A., C. Conway, T. Ó Cróinín, S. G. Smith, and C. J. Dorman. 2006. DNA supercoiling and the Lrp protein determine the directionality of *fim* switch DNA inversion in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **188**:5356–5363.
30. Kelly, A., M. D. Goldberg, R. K. Carroll, V. Danino, J. C. Hinton, and C. J. Dorman. 2004. A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **150**:2037–2053.
31. Klemm, P. 1986. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **5**:1389–1393.
32. Kotlowski, R., C. N. Bernstein, S. Sepeshri, and D. O. Krause. 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**:669–675.
33. Lee, F. K., C. Morris, and J. Hackett. 2006. The *Salmonella enterica* serovar Typhi Vi capsule and self-association pili share controls on expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**:41–46.
34. Lucchini, S., H. Liu, Q. Jin, J. C. Hinton, and J. Yu. 2005. Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect. Immun.* **73**:88–102.
35. Mangan, M. W., S. Lucchini, V. Danino, T. Ó Cróinín, J. C. Hinton, and C. J. Dorman. 2006. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **59**:1831–1847.
36. Martin, H. M., B. J. Campbell, C. A. Hart, C. Mpofu, M. Nayar, R. Singh, H. Englyst, H. F. Williams, and J. M. Rhodes. 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**:80–93.
37. Martinez-Medina, M., X. Aldeguer, M. Lopez-Siles, F. Gonzalez-Huix, C. Lopez-Oliu, G. Dahbi, J. E. Blanco, J. Blanco, L. J. Garcia-Gil, and A. Darfeuille-Michaud. 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**:872–882.
38. McClain, M. S., I. C. Blomfield, and B. I. Eisenstein. 1991. Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:5308–5314.
39. Ó Cróinín, T., R. K. Carroll, A. Kelly, and C. J. Dorman. 2006. Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **62**:869–882.
40. Ó Cróinín, T., and C. J. Dorman. 2007. Expression of the Fis protein is sustained in late-exponential- and stationary-phase cultures of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium grown in the absence of aeration. *Mol. Microbiol.* **66**:237–251.
41. Pan, C. Q., S. E. Finkel, S. E. Cramton, J. A. Feng, D. S. Sigman, and R. C. Johnson. 1996. Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. *J. Mol. Biol.* **264**:675–695.
42. Ricci, G., A. D'Ambrosi, D. Resca, M. Masotti, and V. Alvisi. 1995. Comparison of serum total sialic acid, C-reactive protein,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein and  $\beta_2$ -microglobulin in patients with non-malignant bowel diseases. *Biomed. Pharmacother.* **49**:259–262.
43. Rolhion, N., F. A. Carvalho, and A. Darfeuille-Michaud. 2007. OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol. Microbiol.* **63**:1684–1700.
44. Saldana, Z., J. Xicohtencatl-Cortes, F. Avelino, A. D. Phillips, J. B. Kaper, J. L. Puente, and J. A. Giron. 2009. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ. Microbiol.* **11**:992–1006.
45. Sartor, R. B. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134**:577–594.
46. Schneider, R., A. Travers, and G. Muskhelishvili. 2000. The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol. Microbiol.* **38**:167–175.
47. Schwan, W. R., J. L. Lee, F. A. Lenard, B. T. Matthews, and M. T. Beck. 2002. Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **70**:1391–1402.
48. Shao, Y., L. S. Feldman-Cohen, and R. Osuna. 2008. Functional characterization of the *Escherichia coli* Fis-DNA binding sequence. *J. Mol. Biol.* **376**:771–785.
49. Sohanpal, B. K., S. Friar, J. Roobol, J. A. Plumbridge, and I. C. Blomfield. 2007. Multiple co-regulatory elements and IHF are necessary for the control of *fimB* expression in response to sialic acid and *N*-acetylglucosamine in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **63**:1223–1236.
50. Thanbichler, M., S. C. Wang, and L. Shapiro. 2005. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *J. Cell Biochem.* **96**:506–521.
51. Tzou, W. S., and M. J. Hwang. 1999. Modeling helix-turn-helix protein-induced DNA bending with knowledge-based distance restraints. *Biophys. J.* **77**:1191–1205.
52. Weinstein-Fischer, D., and S. Altuvia. 2007. Differential regulation of *Escherichia coli* topoisomerase I by Fis. *Mol. Microbiol.* **63**:1131–1144.
53. Xavier, R. J., and D. K. Podolsky. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**:427–434.



**Figure 73 : Courbes de croissance des mutants invalidés dans les gènes codant les protéines de type-histone *fis*, *hns*, *hupB*, *ihfA* et *lrp* et de la souche sauvage LF82.**

Croissance réalisée en milieu de culture acellulaire (MEM) pendant 8h en conditions statiques. Les résultats de trois expériences indépendantes sont exprimés en moyenne + SEM. DO<sub>620nm</sub>, densité optique à 620 nm.



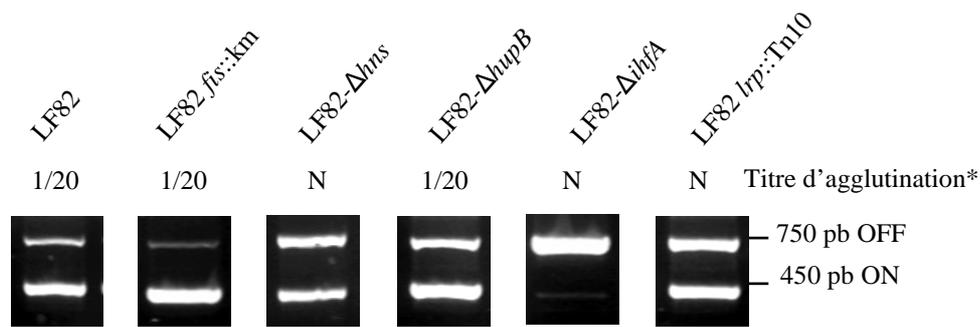
**Figure 74 : Analyse de la mobilité des mutants de délétion ou d'insertion dans les gènes codant des protéines de type histone de la souche AIEC LF82.**

Test de mobilité en gélose molle LB + 0,3% d'agar après 16 heures d'incubation à 37°C. La présence d'un halo de croissance autour du point d'inoculation central rend compte de la mobilité donc de la présence de flagelles fonctionnels.

## Commentaire de la publication N°2 :

Une modification de l'état d'enroulement de l'ADN de la souche AIEC LF82 a pu être observée lorsque les bactéries sont en contact avec les cellules épithéliales intestinales. Généralement, les protéines nécessaires à la structure du nucléoïde et à sa compaction sont les protéines de type-histone Fis, HU, H-NS, IHF et Lrp. Ces protéines peuvent moduler la transcription de certains gènes soit par une action structurale sur l'ADN soit en jouant le rôle de facteur de transcription. De nombreuses études montrent l'implication des protéines de type-histone dans la régulation de facteurs de virulence (Pour revue : (Dorman and Deighan, 2003)). Ainsi un rôle majeur de ces régulateurs globaux dans la capacité d'adhésion de la souche AIEC LF82 a été étudié. Afin d'évaluer leur implication dans les capacités d'adhésion et d'invasion de la souche AIEC de référence LF82, différents mutants invalidés dans les gènes *fis*, *hupB*, *hns*, *ihfA*, et *lrp* ont été créés. Dans un premier temps, la croissance des différents mutants a été suivie pendant 8h dans un milieu de culture acellulaire (**Figure 73**). Aucune différence n'a pu être observée par rapport à la souche sauvage à l'exception du mutant LF82- $\Delta$ *hns* dont les capacités de croissance sont affectées.

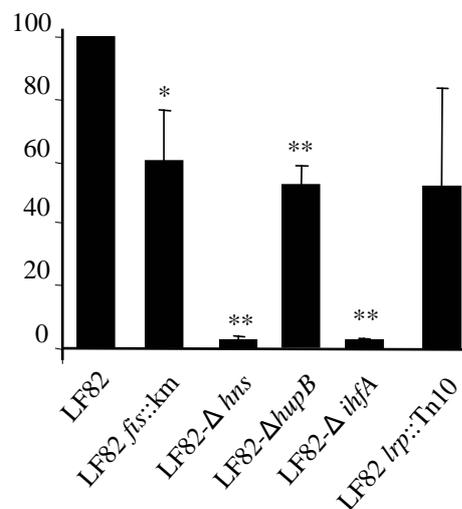
Il a préalablement été montré que les flagelles et les pili de type 1 jouent un rôle essentiel dans la capacité de la souche AIEC LF82 à interagir avec les cellules épithéliales intestinales (Barnich *et al.*, 2003; Boudeau *et al.*, 2001). Ainsi le phénotype des mutants LF82 *fis*::Km, LF82- $\Delta$ *hns*, LF82 *hupB*::Km, LF82- $\Delta$ *ihfA*, et LF82 *lrp*::Tn10 vis-à-vis de ces deux structures de surface a été analysé. L'expression de flagelles fonctionnels, conférant la mobilité, a été testé sur gélose semi-solide pour les différents mutants (**Figure 74**). Les mutants LF82- $\Delta$ *ihfA*, LF82 *hupB*::Km et LF82 *lrp*::Tn10 ont une mobilité réduite par rapport à celle de la souche AIEC LF82. Les mutants LF82- $\Delta$ *hns* et LF82 *fis*::Km sont totalement immobiles et ne possèdent donc pas de flagelle fonctionnel. Nous avons préalablement démontré que chez la souche AIEC LF82, une mutation induisant l'absence de flagelle conduit à une baisse de la synthèse des pili de type 1 (Barnich *et al.*, 2003). Afin d'étudier si les mutants pour les protéines de type-histone sont également affectés dans la synthèse des pili de type 1, leur expression a été analysée par tests d'agglutination de levures *Saccharomyces cerevisiae* qui expriment à leur surface des résidus mannose (**Figure 75**). Une absence d'agglutination a été observée pour les mutants LF82 *lrp*::Tn10, LF82- $\Delta$ *ihfA* et LF82- $\Delta$ *hns*, indiquant un défaut d'expression des pili de type 1 à la surface de ces mutants. Par contre, pour les mutants LF82 *fis*::Km et LF82 *hupB*::Km, les titres d'agglutination sont



**Figure 75 : Synthèse des pili de type 1 par les mutants LF82 *fis::Km*, LF82- $\Delta$ *hns*, LF82 *hupB::Km*, LF82- $\Delta$ *ihfA* et LF82 *lrp::Tn10*.**

\*Titre de dilution obtenu par le test d'agglutination de levures en plaques 96 puits témoignant de l'expression des pili de type 1.

Analyse de la variation de phase des pili de type 1 de la souche LF82 et des mutants isogéniques délétés des gènes codant chaque protéine de type-histone. Détermination de l'orientation de l'élément inversible de l'opéron *fim*. L'orientation est déterminée par une analyse en PCR où l'amplification d'un fragment de 450 pb révèle une orientation en phase ON et un fragment de 750 pb une orientation en phase OFF.



**Figure 76 : Propriétés d'adhésion de la souche sauvage AIEC LF82 et des mutants LF82 *fis::Km*, LF82- $\Delta$ *hns*, LF82 *hupB::Km*, LF82- $\Delta$ *ihfA* et LF82 *lrp::Tn10*.**

Effet de la délétion des gènes codant des protéines de type histone sur l'invasion de cellules épithéliales intestinales I-407. Les résultats de trois expériences indépendantes sont exprimés en pourcentages  $\pm$  erreurs standards du nombre de bactéries internalisées relatif au nombre de bactéries obtenues pour la souche AIEC LF82, définie comme 100%.

Lors de chaque expérience, une étape de centrifugation a été réalisée. Test de Student : \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$

similaires à celui de la souche sauvage. L'expression des pili de type 1 est régulée par un processus appelé « variation de phase » qui permet aux bactéries de passer d'un état pilié (ON) à un état non-pilié (OFF) par l'inversion de l'élément *fimS* portant le promoteur de l'opéron *fim*. Une approche PCR a été utilisée afin de comparer l'orientation de la séquence *fimS* entre la souche sauvage et les mutants (Schwan *et al.*, 2002). La souche sauvage présente dans sa population des bactéries préférentiellement en phase ON (**Figure 75**). Un produit d'amplification de 750 pb a été obtenu avec le mutant LF82- $\Delta$ *ihfA* indiquant une orientation de la séquence ADN inversible totalement en phase OFF. Par contre, un produit d'amplification de 450 pb est observé avec les mutants LF82 *fis*::Km indiquant qu'ils présentent donc une orientation totalement en phase ON. Les mutants LF82 *lrp*::Tn10, LF82 *hupB*::Km et LF82- $\Delta$ *hns* présentent un profil intermédiaire.

Les capacités d'interactions avec des cellules épithéliales intestinales (I-407) ont été évaluées pour les différents mutants invalidés dans les gènes codant les protéines de type-histone en comparaison avec la souche sauvage. Les capacités d'adhésion des mutants LF82- $\Delta$ *ihfA* et LF82- $\Delta$ *hns* sont significativement diminuées ( $p < 0,001$ ) par rapport à la souche sauvage avec respectivement 2,2 et 2,7% d'adhésion résiduelle (**Figure 76**). De même une diminution significative a été observée pour les mutants LF82- $\Delta$ *hupB* et LF82*fis*::Km, avec respectivement 50,1 et 53,2% d'adhésion résiduelle. Aucune diminution significative n'a été observée pour le mutant LF82*lrp*::Tn10. Ainsi, à l'exception de Lrp, toutes les protéines de type-histone jouent un rôle dans l'adhésion de la souche AIEC LF82 aux cellules épithéliales intestinales.

Les différentes analyses phénotypiques indiquent que les mutants LF82- $\Delta$ *hns* et LF82- $\Delta$ *ihfA* ne sont plus capables d'adhérer aux cellules I-407 du fait de leur défaut de piliation et/ou de croissance. La diminution de capacité d'adhésion aux cellules I-407 du mutant LF82- $\Delta$ *hupB* par rapport à la souche sauvage LF82 n'est due ni à un défaut de croissance ni à une absence de flagelles ou de pili de type 1. Ceci suggère l'implication d'autre(s) facteur(s) de virulence inconnus dont l'expression serait contrôlée par HU. Les résultats obtenus pour le mutant LF82*fis*::Km étaient inattendus, il s'agit du premier mutant dans la souche AIEC LF82 n'exprimant pas de flagelles mais qui exprime toujours des pili de type 1 (Barnich *et al.*, 2003; Rolhion *et al.*, 2007).

Le dosage des ARNm des gènes *fis*, *lrp*, *hns*, *ihfA* et *hupB* dans les bactéries au contact des cellules I-407, en comparaison avec des bactéries cultivées dans un milieu acellulaire, montre que seul le taux d'ARNm *fis* est diminué, ce qui est en corrélation avec des résultats



précédemment publiés chez *Shigella* (Lucchini *et al.*, 2005). Cette observation suggère que la protéine Fis joue un rôle clé dans la régulation de l'expression génique lors de l'interaction bactéries /cellules. D'ailleurs, la protéine Fis avait déjà été mise en évidence comme jouant un rôle dans la régulation de l'expression de structure fimbrilales comme les curli ou les pili de type IV (Lee *et al.*, 2006; Saldana *et al.*, 2009). Plusieurs arguments montrent que Fis pourrait directement agir sur l'expression des pili de type 1 dans la souche AIEC LF82 :

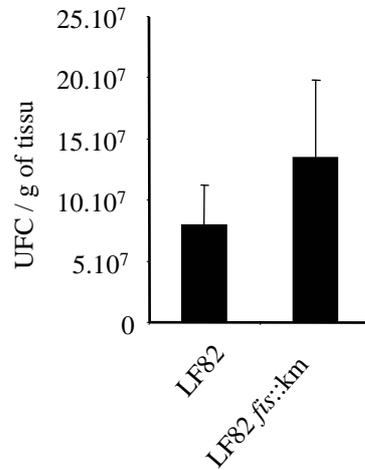
- Le défaut de mobilité du mutant LF82*fis*::Km n'est pas associé à un défaut d'expression des pili de type 1. Ce mutant présente un « bypass » de la voie dépendante du di-GMPc sur la régulation des pili de type 1.

- Au contact des cellules épithéliales intestinales, les bactéries LF82 présentent une diminution du niveau d'ARNm *fis* et sont préférentiellement en phase ON pour l'expression des pili de type 1.

- Le mutant LF82*fis*::Km présente une forte proportion de bactéries en phase ON et la surexpression de Fis chez la souche sauvage conduit à une diminution d'expression des pili de type 1.

Ces différentes observations suggèreraient que Fis pourrait contrôler négativement l'expression des pili de type 1. Cette expression, dépendante de l'orientation de la séquence inversible *fimS* comportant le promoteur de l'opéron *fim*, fait intervenir les recombinases FimB et FimE (Burns *et al.*, 2000). FimB permet l'inversion de OFF vers ON et *vice-versa*, alors que FimE ne permet que le passage ON vers OFF (McClain *et al.*, 1991). L'inversion de l'élément *fimS* requière également l'intervention de certaines protéines de type-histone Lrp, IHF et H-NS qui modifient la relaxation et induisent des courbures de l'ADN (Blomfield *et al.*, 1997; Corcoran and Dorman, 2009; Kelly *et al.*, 2006; Schwan *et al.*, 2002; Sohanpal *et al.*, 2007). Cependant aucun rôle de Fis n'avait été mis en évidence auparavant dans ce processus de régulation. Fis agit sur la relaxation de l'ADN et l'expression des gènes. En effet, cette protéine est notamment capable de fixer des séquences spécifiques en amont de certains gènes et moduler ainsi leur transcription par contact protéine/protéine avec l'ARN polymérase (Dorman, 2009).

Afin de vérifier l'hypothèse d'une implication de Fis dans la régulation des pili de type 1, la recherche de séquences s'apparentant au consensus 5'-GGTCAAAAATTGACC-3', site de fixation de Fis le plus probable, a été réalisée dans les séquences régulatrices de l'opéron *fim*. Deux sites ont pu être identifiés *in silico*, un en amont de *fimE* et un autre dans la séquence intergénique *nanC/fimB*. La fixation spécifique de la protéine Fis sur ces deux sites a été vérifiée par test de protection à la DNase I et retard sur gel. La mesure du taux de



**Figure 77 : Interaction bactérienne avec des explants coliques de souris exprimant le récepteur CEACAM6 humain.**

Des explants coliques de souris FVB transgéniques CEABAC10 ont été mis en contact avec une suspension bactérienne en ringer,  $DO_{620nm}:0.01$ , de la souche sauvage LF82 ou du mutant invalidé dans le gène *fis*, pendant 3h à 37°C sous agitation. Afin de quantifier l'interaction bactérienne, les explants coliques sont broyés à l'aide d'un Ultra-Turrax en présence de Triton X-100 0.1% et les bactéries sont numérees par étalement sur gélose Luria Broth.

transcrits par RT-PCR des gènes codant les recombinases (FimB et FimE) et la protéine de membrane externe permettant le transport de l'acide sialique (NanC) a permis de mettre en évidence que l'expression de *nanC* est augmentée et celle de *fimE* diminuée dans le mutant invalidé pour la protéine Fis par rapport à la souche sauvage. Chez *E. coli* K-12, l'expression de ces deux gènes influence directement ou indirectement celle des pili de type 1. En effet, l'acide N-acétylneuraminique conduit à une diminution de l'expression de la recombinase FimB et donc à une diminution d'expression des pili de type 1 (El-Labany *et al.*, 2003; Sohanpal *et al.*, 2007). Cependant, dans la souche AIEC LF82 ce sucre aminé n'a aucun effet sur l'expression de *fimB* et la variation de phase. Ainsi, dans un environnement intestinal, même s'il y a augmentation des taux d'acide sialique durant l'inflammation (Ricci *et al.*, 1995), les bactéries produisent des pili de type 1 permettant leur adhésion à la muqueuse intestinale. En ce qui concerne la recombinase FimE, cette enzyme catalyse de façon non stringente le passage de ON vers OFF de l'élément *fimS* (Klemm, 1986). Dans le mutant Fis, la diminution de l'expression de *fimE* permet de mieux comprendre pourquoi les bactéries sont préférentiellement en phase ON pour l'expression des pili de type 1. De plus, le niveau d'adhésion du mutant LF82*fis*::Km est augmenté par rapport à la souche sauvage *ex-vivo* sur de la muqueuse colique de souris transgéniques exprimant le récepteur humain CEACAM6 reconnu par les pili de type 1 (**Figure 77**).

L'étude du mécanisme de régulation des pili de type 1 permet de comprendre comment les souches AIEC coordonnent la régulation de l'expression de ces facteurs de surface pendant l'infection. Dans des conditions du tractus gastro-intestinal, les bactéries de type AIEC sont très flagellées du fait d'une régulation médiée par la voie  $\sigma^E$  (Rolhion *et al.*, 2007). Cela leur permet de traverser la couche de mucus et atteindre la surface de l'épithélium intestinal. Au contact des cellules épithéliales, l'expression de la protéine de type-histone Fis diminue ce qui a un impact positif sur l'expression des pili de type 1 et cet effet est majeur par rapport à la voie du di-GMPc ou à l'action de l'acide sialique. Les AIEC adhèrent aux cellules épithéliales intestinales *via* les pili de type 1 en reconnaissant le récepteur CEACAM6 surexprimé chez les patients atteints de MC (Barnich *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009). L'augmentation du niveau d'expression des pili de type 1 par les bactéries au contact des cellules pourrait renforcer et augmenter la capacité des bactéries AIEC à coloniser la muqueuse intestinale et à favoriser l'inflammation.



### **3. Séquence complète du génome de la souche de *E. coli* adhérente et invasive isolée de patient atteint de maladie de Crohn.**

#### **Publication n°3**

**Sylvie Miquel**, Eric Peyretailade, Laurent Claret, Amélie de Vallée, Carole Dossat, Benoit Vacherie, El Hajji Zineb, Beatrice Segurens, Valerie Barbe, Christel Neut, Jean-Frédéric Colombel, Claudine Medigue, Francisco J. M. Mojica, Pierre Peyret, Richard Bonnet et Arlette Darfeuille-Michaud.



## Introduction

En 1997, le séquençage du premier génome complet d'une souche de *E. coli* commensale K-12 MG1655 a été réalisé (Blattner *et al.*, 1997). Ce premier séquençage complet n'avait aucun but d'un point de vue épidémiologique mais a permis des avancées majeures d'un point de vue moléculaire. Depuis, de nombreux génomes de souches pathogènes ont été séquencés : l'UPEC CFT073 (Welch *et al.*, 2002), trois EHEC (O157:H7 EDL933, O157\_H7 str. Sakai, et O157:H7 str. EC4115) (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001) et plus récemment les génomes d'autres souches de référence comme UPEC 536 et UTI89, l'APEC\_01 ainsi que la souche EPEC E2348/69 (Chen *et al.*, 2006; Hochhut *et al.*, 2006; Iguchi *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, l'espèce *E. coli* est la seule espèce bactérienne comprenant plus de 30 génomes séquencés ou en cours de séquençage et tous sont répertoriés dans la base de donnée GOLD (Genomes OnLine Database) (Bernal *et al.*, 2001). En 2005, un projet collaboratif, dénommé ColiScope, visant à séquencer six souches représentatives des situations épidémiologiques caractéristiques de *E. coli*, ainsi que la souche type de l'espèce la plus proche *E. fergusonii*, a été mis en place par l'équipe de Eric Denamur de l'Université Paris 7 Denis Diderot en collaboration avec le Genoscope. Ce projet a permis de réaliser une étude comparative ayant pour but de déterminer l'organisation générale des génomes de l'espèce *E. coli*, l'importance des événements de recombinaison ainsi que des mutations le long de la séquence génomique, et l'existence de gènes spécifiques d'un style de vie comme le commensalisme *versus* la pathogénicité que ce soit intra ou extra-intestinale (Touchon *et al.*, 2009).

Le séquençage complet du génome de la souche de référence AIEC LF82 a été réalisé en collaboration avec le Génoscope dans la continuité du projet ColiScope. L'objectif de mon travail dans ce projet collaboratif a été de réaliser la comparaison des séquences codantes (CDSs) avec le maximum de souches de *E. coli* de référence dont la séquence était disponible dans les bases de données NCBI (National Center for Biotechnology informations) (21 souches) afin de mettre en évidence les gènes appelés « flexibles » c'est-à-dire ne faisant pas partie du squelette génomique.



# Complete Genome Sequence of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *E. coli* Strain LF82

Sylvie Miquel<sup>1,2,9</sup>, Eric Peyretailade<sup>2,3,9</sup>, Laurent Claret<sup>1,2,9</sup>, Amélie de Vallée<sup>1,2</sup>, Carole Dossat<sup>4</sup>, Benoit Vacherie<sup>4</sup>, El Hajji Zineb<sup>4</sup>, Beatrice Segurens<sup>4</sup>, Valerie Barbe<sup>4</sup>, Pierre Sauvanet<sup>1,5</sup>, Christel Neut<sup>6</sup>, Jean-Frédéric Colombel<sup>6</sup>, Claudine Medigue<sup>4,7</sup>, Francisco J. M. Mojica<sup>8</sup>, Pierre Peyret<sup>2,3</sup>, Richard Bonnet<sup>1,9</sup>, Arlette Darfeuille-Michaud<sup>1,2\*</sup>

**1** Clermont Université, Université d'Auvergne, JE2526, INRA, USC-2018, Clermont-Ferrand, France, **2** Institut Universitaire de Technologie, Université d'Auvergne, Aubière, France, **3** Laboratoire: Microorganismes Génome et Environnement, Université Clermont 2, CNRS, UMR 6023, Aubière, France, **4** Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Direction des Sciences du Vivant, Institut de Génomique, Genoscope, Evry, France, **5** Centre Hospitalier Universitaire, Pôle digestif, Clermont-Ferrand, France, **6** INSERM U995, Lille, France, **7** CNRS-UMR 8030, Laboratoire d'Analyse Bioinformatique en Génomique et Métabolisme, Evry, France, **8** Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, Spain, **9** Centre Hospitalier Universitaire, Bactériologie, Clermont-Ferrand, France

## Abstract

**Background:** Ileal lesions of Crohn's disease (CD) patients are abnormally colonized by pathogenic adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) able to invade and to replicate within intestinal epithelial cells and macrophages.

**Principal Findings:** We report here the complete genome sequence of *E. coli* LF82, the reference strain of adherent-invasive *E. coli* associated with ileal Crohn's disease. The LF82 genome of 4,881,487 bp total size contains a circular chromosome with a size of 4,773,108 bp and a plasmid of 108,379 bp. The analysis of predicted coding sequences (CDSs) within the LF82 flexible genome indicated that this genome is close to the avian pathogenic strain APEC\_01, meningitis-associated strain S88 and urinary-isolated strain UT189 with regards to flexible genome and single nucleotide polymorphisms in various virulence factors. Interestingly, we observed that strains LF82 and UT189 adhered at a similar level to Intestine-407 cells and that like LF82, APEC\_01 and UT189 were highly invasive. However, AIEC strain LF82 had an intermediate killer phenotype compared to APEC-01 and UT189 and the LF82 genome does not harbour most of specific virulence genes from ExPEC. LF82 genome has evolved from those of ExPEC B2 strains by the acquisition of *Salmonella* and *Yersinia* isolated or clustered genes or CDSs located on pLF82 plasmid and at various loci on the chromosome.

**Conclusion:** LF82 genome analysis indicated that a number of genes, gene clusters and pathoadaptative mutations which have been acquired may play a role in virulence of AIEC strain LF82.

**Citation:** Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallée A, Dossat C, et al. (2010) Complete Genome Sequence of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *E. coli* Strain LF82. PLoS ONE 5(9): e12714. doi:10.1371/journal.pone.0012714

**Editor:** Niyaz Ahmed, University of Hyderabad, India

**Received:** June 7, 2010; **Accepted:** August 20, 2010; **Published:** September 17, 2010

**Copyright:** © 2010 Miquel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie (JE2526), by the Institut National de Recherche Agronomique (USC 2018) and by grants from the Association F. Aupetit (AFA), Bourse de Recherche fondamentale sur les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (BREMICI, Schering-Plough). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease in humans which has features that might be the result of a microbial process in the gut [1,2,3,4]. Various studies have addressed the hypothesis that pathogenic bacteria contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease [4,5,6,7,8]. *Escherichia coli* strains have been assigned a putative role in the pathogenesis of CD. Increased numbers of mucosa-associated *E. coli* forming a biofilm on the surface of the gut mucosa, are observed in patients with CD [9,10,11,12,13,14,15]. Most of the *E. coli* strains colonizing the intestinal mucosa in patients with inflammatory bowel disease belong to the B2 and D phylogroup [11] and strongly adhere to intestinal epithelial cells [10,12]. In addition, seven independent studies have reported the presence

of intramucosal *E. coli* or mucosa-associated *E. coli* with invasive properties in CD patients [12,16,17,18,19,20,21]. On the basis of the pathogenic traits of CD-associated *E. coli*, a pathogenic group of *E. coli* was designated AIEC for Adherent-Invasive *Escherichia coli* [22]. The criteria for inclusion in the group are: (i) ability to adhere to and to invade intestinal epithelial cells with a macropinocytosis-like process of entry dependent on actin microfilaments and microtubule recruitment, (ii) ability to survive and to replicate extensively in large vacuoles within macrophages without triggering host cell death, and (iii) ability to induce the release of large amounts of TNF- $\alpha$  by infected macrophages. The high level of ileal colonization in CD patients by AIEC is linked to the abnormal expression of the glycoprotein CEACAM6 which acts as a receptor for AIEC adhesion via type 1 pili [23,24].



The prototype strain for AIEC pathovar is *E. coli* strain LF82. This reference AIEC strain is included in most, if not all, of the studies analysing of *E. coli* strains associated with Crohn's disease performed by our group [25,26] or others [12,16,17,27,28,29,30,31,32,33]. This, combined with the virulence properties of AIEC strain LF82 [22,24,34,35], led us to decipher the genome sequence of AIEC reference strain LF82 to compare it with the other known *E. coli* genome sequences and with as other bacteria of the *Enterobacteriaceae* family having an intracellular lifestyle in eukaryotic cells.

## Results and Discussion

### Overview of AIEC strain LF82 genome

The genome of AIEC strain LF82 of 4,881,487 bp total size contains a circular chromosome with a size of 4,773,108 bp and a plasmid of 108,379 bp (Figure 1A). It contains 4376 CDSs corresponding to 88.3% of the complete chromosome. The number of CDSs in LF82 is low compared to that of other pathogenic *E. coli* strains involved in urinary tract infection (UTI), diarrhea or meningitis in humans or colibacillosis in chickens and closer to that of pathogenic APEC strain (Table 1). The GC content of the LF82 chromosome, about 50%, is close to that of all other complete sequenced *E. coli* genomes. In contrast, the plasmid sequence has a lower GC% content of 46.1% (Table 2), indicating that it could have been acquired by horizontal transfer from a distant species. Annotation step identified 121 CDSs that were closely similar to CDSs located on pMT1 plasmid from *Yersinia* species [36] and pHCM2 plasmid from *Salmonella enterica serovar* Typhimurium [37] (Table S1). Comparative genomic analysis using MaGe software has revealed a high synteny rate between LF82 plasmid and pHCM2 (syntony 71%). However, for pMT1 plasmid synteny were only observed for 50% of this plasmid sequence with sequence inversion (Figure 1B). In addition, although the GC% of pLF82 was lower than that of plasmids pMT1 or pHCM2, of the 121 CDS identified on pLF82, 97 (~80%) and 65 (~45%) were also found on pHCM2 and pMT1 plasmids, respectively. Of note, 24 CDSs were common to these three plasmids and were not found in any other available genome sequences.

### Phylogenetic position of strain LF82

*E. coli* strains are generally divided into four major phylogenetic groups A, B1, B2 and D [38,39], although some strains may belong to additional groups [40,41]. Recombination-insensitive phylogenetic analysis was undertaken with MLST data extracted from LF82 and 22 other *E. coli* genome sequences (Figure 2). The results confirmed the strong phylogenetic clustering of *E. coli* strains into six sharply separated branches, which could be equated to groups A, B1, B2, D, E and F [42]. Strain LF82 clustered with all the B2 extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains involved in urinary tract infection, meningitis and avian colibacillosis. However, it formed a distinct clonal complex of this phylogenetic group B2, compared to B2 strains UTI89, S88 and APEC\_O1, which clustered in a single subgroup.

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) corresponding to redundant sequences that alternate with spacers of foreign origin [43,44] were detected in LF82 chromosome (Figure 3). Two subtypes of CRISPR/CAS (CRISPR-associated genes) systems have been identified in *E. coli*, CRISPR2/CAS-E and CRISPR4/CAS-Y [45]. In LF82 we found a CRISPR4/CAS-Y system composed of a CRISPR4.1 array with 10 repeats and a CRISPR4.2 with 23 repeats, interspaced by a complete set of CAS-Y genes. In contrast, a CRISPR2.2-3 locus with two repeats was the only reminiscence of

a CRISPR2/CAS-E system. Absence of both CRISPR2.1 and CAS-E genes is common to all strains of B2, although this is not a feature exclusive to the group. Among the *E. coli* reference collection ECOR; [46] and the available complete genomes analyzed here, CAS-Y genes have only been described in B2 strains (i.e. ECOR61, ECOR62, ECOR63, ECOR65, UTI89, APEC\_01, S88 and ED1a) and B1 strain B7A. Identities to LF82 CRISPR4 spacers were found within the corresponding locus in ECOR61, ECOR62, UTI89, APEC\_01, S88 (7 spacers each), ED1a (8 spacers) and ECOR65 (2 spacers).

### Global comparative genomic analysis

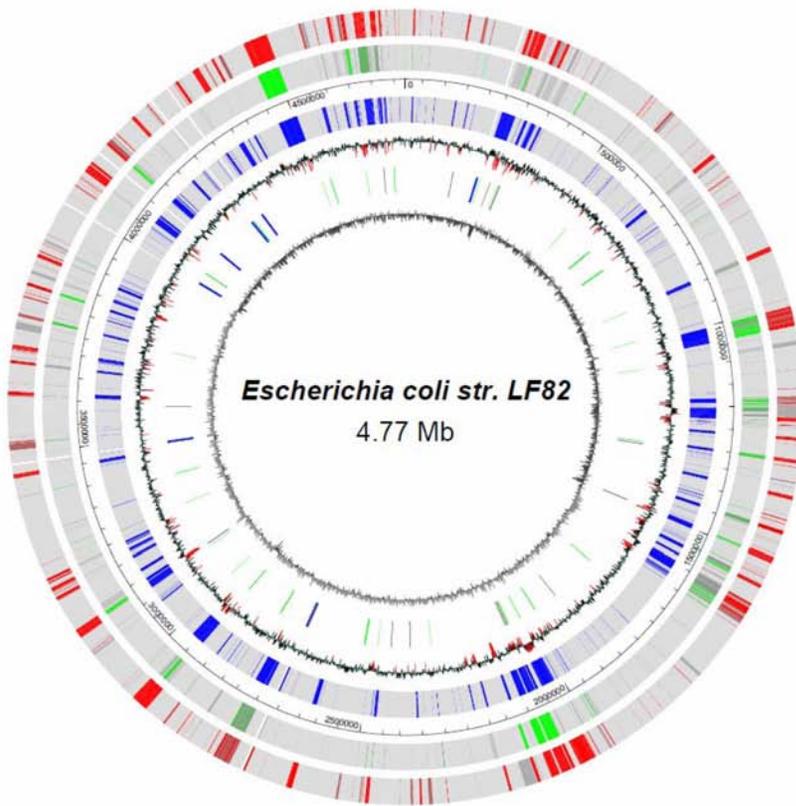
The organization of the LF82 genome is similar to that seen in other pathogenic *E. coli* strains with large regions of colinear *E. coli* core genome punctuated by genomic islands probably acquired by horizontal transfer. TBLASTN showed that 3132 CDSs (71.6%) out of the 4376 CDSs constitute the core genome of all *E. coli* strains used in this comparative genomic analysis (Table 3 and Table S2). This number is higher than that reported by Touchon *et al.* (1,996 genes) and Rasko *et al.* (2,200 genes) [47,48]. This discrepancy is the consequence of the comparative approach used. We used TBLASTN analysis to compare predicted proteins of LF82 strain with the complete DNA sequence of the other strains. LF82 genomic comparative analysis also revealed the presence of conserved insertion-deletion inducing frameshifts in some core genes that may be used as new phylogroup markers (Table S3).

Of the 1244 CDSs that are not encompassed in the core genome 1128 were found in at least one or more *E. coli* complete genomes and around 40% of them are present in commensal or K-12 *E. coli* strains. In addition, 33 CDSs (0.8%) were common to all B2 strains so far sequenced and formed four clusters of two to four genes in the genome (Table S2). Overall, the analysis of CDSs within the LF82 flexible genome indicated that this strain shared the highest percentages of common CDSs with strain APEC-01 isolated from lesions of chickens and turkeys clinically diagnosed with colibacillosis, followed by meningitis-associated *E. coli* strain S88 isolated from human cerebrospinal fluid, and by *E. coli* strain UTI89 isolated from human urine (Table 3). Of interest, strain UTI89, isolated from a patient with uncomplicated cystitis, was further assessed to be very close to meningitis-associated *E. coli* strains (Bingen, personal communication). However, phenotype analysis in the mouse lethality model developed by Johnson *et al.* [49] indicated that AIEC strain LF82 had an intermediate killer phenotype compared to APEC-01, S88 and UTI89, which induced 100% lethality at 24h post-infection (Figure 4). Of note, in this model all the B2 strains were highly virulent except strains ED1a and EPEC strain E2348/69, which did not induce lethality.

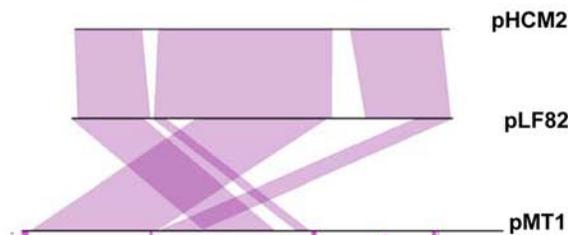
We compared AIEC LF82 strain with other B2 *E. coli* strains and K-12 MG1655 strain using *RGPfinder* tool. The more interesting highly specific regions are summarized in Table 4 and ordered taking into account the specificity score found in the eight compared strains. Fifty-six LF82 CDSs are encompassed in one integrative element inserted near the *PheU* tRNA encoding gene and 14 in two very specific regions 1 and 2. These two regions showed no similarity with the compared *E. coli* strains with values of 100 meaning that these two LF82 regions are entirely specific. Interestingly, 115 AIEC LF82 CDSs (2.6%), not found in any *E. coli* genomes used in our comparative genomic analysis, were identified as LF82 unique CDSs (Table S4). In addition, 15 CDSs (0.3%) shared no homology with genes so far identified in any pathogenic bacteria. The presence of these CDSs, encoding mostly hypothetical proteins, indicated the high level of plasticity of the LF82 genome. It has now to be determined whether these CDSs allow AIEC bacteria to adapt to the human gut and/or are



A



B



**Figure 1. AIEC strain LF82 chromosome circular map and synteny plots between pLF82 and pHCM2 and pMT1.** Circular representation of the *E. coli* LF82 genome (A). Circles display from the inside out: (1) GC skew ( $G+C/G-C$  using a 1 kbp sliding window). (2) Location of tRNAs (green), rRNAs (blue) and Insertion Sequences (grey). (3) GC deviation (mean GC content in a 1 kbp window – overall mean GC). Red areas indicate that deviation is higher than 2 Standard Deviation. (4) (5) and (6) Gene specificity of LF82 strain at strain level (K12, in blue), and at group level: *E. coli* B2 strains, in green, and *E. coli* commensal strains, in red. Genes sharing at least one homolog in another *E. coli* of the same group and having more than 85 percent identity on at least 80% of its length were regarded as non specific. Synteny plots between the *E. coli* LF82 plasmid and the plasmid from *Salmonella enterica* serovar Typhi (upper comparison) and the plasmid from *Yersinia pestis* Pestoides (bottom comparison) (B). Synteny groups containing a minimum of five genes are shown in purple for colinear regions. doi:10.1371/journal.pone.0012714.g001

involved in generating chronic inflammation or whether the adaptation may be due to changes in gene expression of CDSs present in other bacterial strains.

### Syntenic studies of integrative elements

Like other *E. coli* B2 genomes, LF82 genome has adopted the ‘mix and match’ evolution approach observed for UPEC [50]. As reported for most of the so far analyzed *E. coli* genomic islands, genomic islands

of AIEC LF82 have a patchy structure, with the information segmented into modules that can be found independently in other locations of other genomes [47,48]. Nine large genomic islands with a size larger than 17kb were identified in the LF82 genome, including the LF82 specific integrative element located at *PheU* tRNA (Table 5). Four of them were composed mainly of prophage-like elements, which being at the origin of the ongoing genetic diversity of many genomes could contribute to LF82 virulence [51].



**Table 1.** General features of the adherent-invasive *E. coli* LF82 genome compared with those of other sequenced B2 or K-12 *E. coli* strains.

Strains	Phylogroup	Pathotype (Host)	Clinical condition (sample)	Chromosome size (bp)	DNA sequence % G+C	No. of CDSs	No. of rRNA genes	No. of tRNA genes	No. of misc. RNAs <sup>a</sup>	Chromosome		Plasmids		Reference
										Content (%)	rRNA genes	GenBank accession no.	size (kb)	
<b>LF82</b>	<b>B2</b>	AIEC (Human)	Crohn's disease (ileum)	4,773,108	88.3	4,376	49.9	22	84	52	CU651637	108	CU638872	This study
<b>536</b>		UPEC (Human)	Pyelonephritis (urine)	4,938,920	87.8	4,685	50.5	22	81	45	CP000247	-	-	[96]
<b>UTI89</b>		UPEC (Human)	Cystitis (urine)	5,065,741	91.1	5,066	50.6	22	88	ND <sup>b</sup>	CP000243	114	CP000244	[61]
<b>CF1073</b>		UPEC (Human)	Pyelonephritis (blood)	5,231,428	90.6	5,379	50.5	21	89	51	AE014075	-	-	[97]
<b>APEC_O1</b>		APEC (Chicken)	Colisepsicemia (lung)	5,082,025	87.4	4,467	50.6	22	93	ND	CP000836	241	DQ517526	[59]
<b>E2348/69</b>		EPEC (Human)	Children (faeces)	4,965,553	85.5	4,703	50.8	22	92	73	FM180568	-	-	[98]
<b>ED1a</b>		- (Human)	Healthy subject (faeces)	5,209,548	86.2	4,915	50.7	22	91	90	CU928162	119	CU928147	[48]
<b>S88</b>		MNEC (Human)	New born meningitis (cerebrospinal fluid)	5,032,268	87.5	5,049	50.7	22	91	89	CU928161	134	CU928146	[48]
<b>MG1655 A</b>		K-12 (Human)	Healthy subject (faeces)	4,639,675	85.1	4,294	50.8	22	89	47	U00096	-	-	[99]
<b>W3110</b>		K-12 (Human)	Healthy subject (faeces)	4,646,332	86.7	4,227	50.8	22	86	49	AP009048	-	-	Unpublished

<sup>a</sup>Number of predicted miscellaneous RNAs.<sup>b</sup>ND, not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0012714.t001



**Table 2.** Plasmid features of *E. coli* LF82 strain compared to highly conserved plasmids in *Salmonella enteritica* and *Yersinia pestis*.

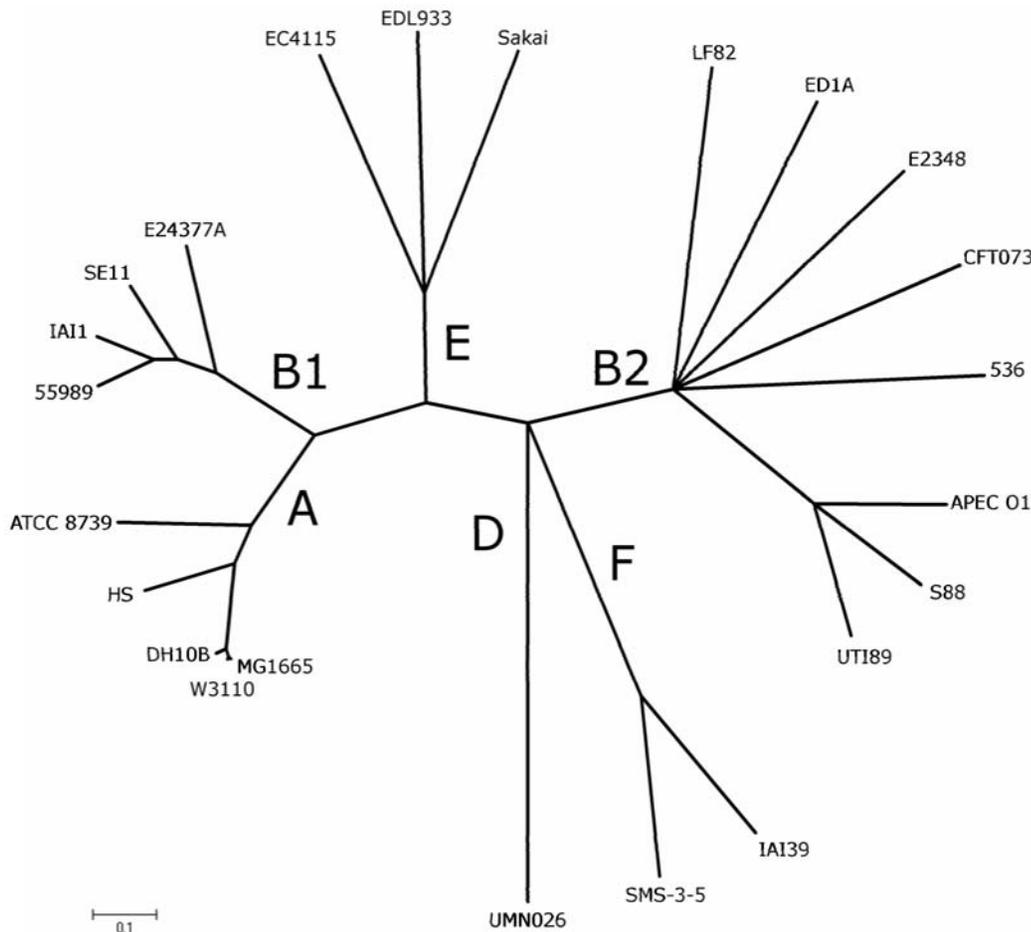
	LF82	<i>Salmonella enteritica</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<b>Plasmid names</b>	pLF82	phCM2	pMT1
<b>Genome size (bp)</b>	108379	106516	96210
<b>G+C content (%)</b>	46.17	50.61	50.23
<b>CDS number</b>	121	132	103
<b>Putative conserved domains detected</b>	52	ND	ND
<b>Hypothetical genes</b>	70	ND	ND
<b>Orphans</b>	8	ND	ND
<b>Orthologous genes to LF82</b>		97	55

doi:10.1371/journal.pone.0012714.t002

Genomic islands known to contribute to bacterial fitness by conferring new properties increase the adaptability of the organism and may also encode genes involved in pathogenicity [52]. The analysis of the distribution of selected subtracted sequences and

UPEC-associated pathogenicity islands (PAIs) amongst a panel of mucosa-associated *E. coli* isolated from colonoscopic biopsies of patients with colon cancer, patients with Crohn's disease and controls previously reported that neither the coloncancer nor the Crohn's disease mucosal *E. coli* populations are uniform [27]. In strain LF82, four PAIs were identified on the basis of homology with those characterized in ExPEC strains. However, some modifications were observed, such as the number of CDSs in the islands or their genomic organization. Differences were found when the presence of PAIs or the presences of genes encompassed in PAIs were compared in CD-associated *E. coli* strain LF82 and the commensal strain ED1a. PAI III, found in strain LF82, was absent in strain ED1a. Moreover, six additional CDSs in PAI I, two in PAI II and five in PAI IV were present in strain LF82. Interestingly, the insertion or deletion of genetic material events take place systematically at the same hotspots in LF82 genome than in various other *E. coli* genomes but different genetic information occurs at the same hotspot. These findings strongly suggest that further studies should be performed to investigate the role of these PAI-associated additional CDSs in strain LF82 virulence.

The AIEC LF82 chromosome carries two putative type VI secretion systems located on PAI I and PAI III. This secretion system is a mechanism for Gram-negative bacteria to export proteins across the cell envelope [53], were identified in *Vibrio*

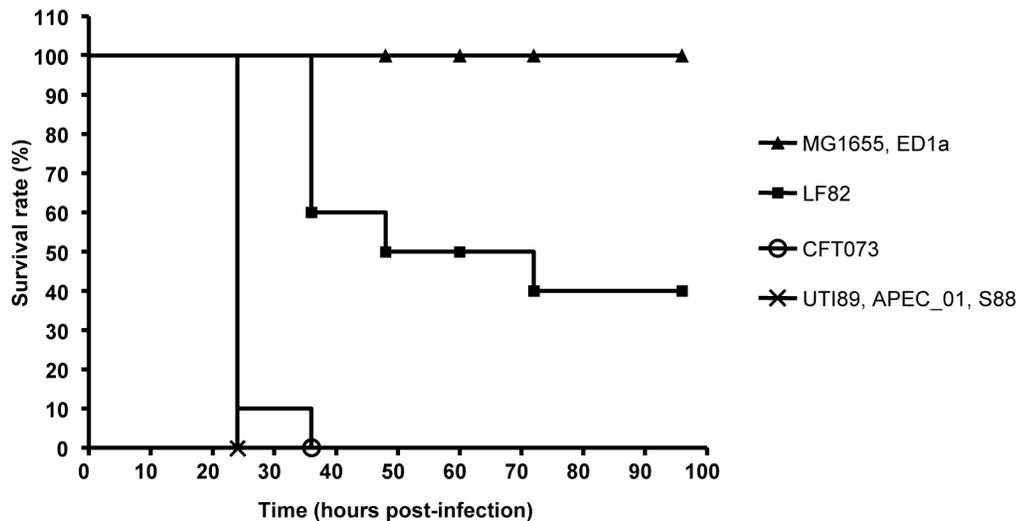


**Figure 2. Recombination-insensitive phylogenetic analysis.** The analysis was based on the sequence of seven house-keeping genes (7497 nucleotides from genes *arcA*, *aroE*, *icd*, *mdh*, *mtlD*, *pgi* and *rpoS*) of 23 genomes reference strains including LF82. The major branches are labeled according to the major phylogroups A, B1, B2, D, E and F.  
doi:10.1371/journal.pone.0012714.g002









**Figure 4. Evolution of survival rate of mice challenged subcutaneously with various *E. coli* strains.** An inoculum of  $2 \times 10^8$  bacteria was injected in OF1 mice and 10 mice were used for each bacterial strain tested. Strains were classified as non-killer (<2 of 10 mice killed), killer (>8 mice killed) or intermediate.

doi:10.1371/journal.pone.0012714.g004

VgrG homologue. It also harbors one specific CDS encoding hypothetical protein sharing highest homologies with ykris0001\_25080, a hypothetical protein from *Yersinia kristensenii* ATCC 33638.

The LF82 PAI II, located close to the *AsnT* tRNA site, is similar to the core region of the “high pathogenicity island” (HPI) of pathogenic *Yersinia* sp. and encodes the yersiniabactin siderophore system [62,63]. LF82 PAI II, also referred as PAI IV in UPEC strain 536 or PAI-*asnT* in strain CFT073, harbors 15 genes or CDSs like all the B2 strains, except strain ED1a, which has only 13 CDSs, and is absent in the EPEC strain E2348/69. LF82 PAI II encompassed *ihp1* and *ihp2* genes encoding non-ribosomal peptide synthetases polyketide synthases (NRPS\_PKS) [64]. In strain LF82, these genes are probably functional since we did not observe an in-frame stop codon like in strain CFT073, which blocks yersiniabactin expression. Analysis of the core genome clearly showed that PAI II could be extended not only in strain LF82 but also in the other B2 strains (Table S2). Finally, we observed the presence of three additional CDSs encoding putative adhesins and invasins. The role of yersiniabactin biosynthesis in AIEC LF82 gut colonization should be investigated since *FyuA*, the outer membrane receptor for yersiniabactin [65], is one of the most highly up-regulated genes in biofilm formation in UTI strains [66] and because biofilm formation is a phenotypic feature of AIEC [21].

The LF82 PAI IV, located close to the *pheV* tRNA site, shares similarities with PAI V of strain 536 or PAI-*pheV* of strain CFT073. It contains gene clusters encoding for group 2 capsule involved in UPEC strain 536 in a murine model of ascending urinary tract infection [67]. The LF82 gene cluster encoding capsule has a similar genomic organization than that described for K1 and K5 capsule synthesis [68]. Regions 1 and 3, encoding for proteins involved in the secretion of capsule components, have the same genes in strain LF82 and K1 and K5 *E. coli* strains. Region 2, defined as a highly variable antigen-specific region, contains four LF82 specific CDSs flanked by CDSs encoding a transposase and a glycerol-3-phosphateacyltransferase.

#### Identification of virulence genes in LF82 strain

We identified in strain LF82 virulence genes typically promoting motility, serum resistance, iron uptake, capsule and LPS

expression, biofilm formation, adhesion to and invasion of epithelial cell lines. Of note, we found ten genes belonging to operons encoding known or putative fimbrial structures, including type1 pili and curli. Most of them are present in both pathogenic B2 strains and non pathogenic *E. coli* K-12, except the *auf* and *ygi* operons. Both are absent in strains EPEC E2348/69 and K-12 MG1655 and the *ygi* operon is also absent in UPEC strain 536. In contrast, the UTI specific fimbriae-encoding genes *pap*, *foc* or *sfa*, allowing UPEC to bind to and to invade host cells and tissues within the urinary tract [69], were absent in strain LF82. Strain LF82 also differs in several virulence-associated traits that may correlate with its pathogenic potential (Table 6). Among virulence genes, we identified in strain LF82 the *ibeRAT* genes organized as an operon also present in strains UTI89 and APEC-01. It was originally described in an *E. coli* K1 strain isolated from a patient with human newborn meningitis [70]. Gene *ibeA* encodes an invasin for which several host receptors have been identified, such as Ibe10R on bovine brain microvascular endothelial cells (BMEC) [71], and vimentin and PSF protein on human BMEC (HBMEC) [72]. It also participates in first stages of colibacillosis in chickens by mediating interaction of APEC strains with lung epithelial cells [73].

We also observed in strain LF82 the presence of the *pdu* gene cluster, that contains 22 CDSs, involved in coenzyme B12-dependent 1,2-propanediol catabolism, propanediol being previously reported to be a crucial carbon source for *Salmonella* to be able to grow in the large intestine and replication within macrophages [74,75]. Such gene cluster is absent in all B2 strains except the EPEC strain E2348/69. The presence of *pdu* operon in AIEC strain LF82 is of high interest since by homology with *Salmonella*, it should allow LF82 bacteria to better colonize the intestine and to highly replicate within macrophages.

Another virulence gene identified in strain LF82 is *lpfA*, which belongs to the *lpf* operon encoding long polar fimbriae (LPF). Such an *lpf* operon is present in *Salmonella typhimurium*, *Shigella boydii* and *flexneri* and in enterohemorrhagic *E. coli* EDL933 [76,77]. No role has been yet reported for LPF in *Shigella*. In *S. Typhimurium*, LPF promotes bacterial interaction with murine Peyer’s patches (PP) [78]. For EHEC, experiments in pigs and sheep with O157:H7







**Table 5.** Comparison of integrative element features in the genome of LF82 strain with those of other sequenced B2 or K-12\_MG1655 *E. coli* strains.

Location		LF82	536	UTI89	CFT073	APEC_01	E2348/69	ED1a	S88	MG1655				
Integrative elements	Start (pb)	Stop (pb)	tRNAs	Description	size (bp)	GC content (%)	Number of ORFs							
							LF82	536	UTI89	CFT073	APEC_01	E2348/69	ED1a	S88
<b>Prophages</b>														
Prophage 1	999027	1036707	-		37681	47.3	2	25	4	26	16	6	23	1
Prophage 2	1173160	1232405	-		59246	48.3	69	56	68	59	32	45	59	31
Prophage 3	1582641	1632704	-		50064	48.3	11	37	32	44	31	11	41	22
Prophage 4	2736905	2769189	-		32285	51.3	0	0	32	0	33	38	36	1
<b>Putative pathogenicity islands</b>														
PAI I	240866	275935	AspV	T6SS	35070	50.1	29	26	2	26	0	23	26	3
PAI II	2007673	2041686	AsnT	Yersinia high pathogenicity island	34014	57.1	15	15	15	15	0	13	15	0
PAI III	2925480	2955960	MetZ,V,W	T6SS	30481	53.5	22	16	17	17	0	0	16	0
PAI IV	3110179	3128026	PheV	Group 2 capsule	17848	41.9	14	7	10	7	0	9	7	0

doi:10.1371/journal.pone.0012714.t005

strain 86-24 indicated that LPF contribute to intestinal colonization [79]. The presence of LPF encoding genes in strain LF82 could indicate that the AIEC bacteria are able to target Peyer's patches. Interestingly, we also identified in strain LF82 gene *gipA* that was first identified in *Salmonella Thyphimurium* [80] and whose expression is specifically induced in the small intestine. Gene *gipA* is also present in strains 536, CFT073 and in the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strain E2348/69. *GipA* allows *Salmonella* survival in PP and is involved in replication of intramacrophagic bacteria [74]. The presence of genes *lpfA* and *gipA* in strain LF82 is of great interest because clinical observations suggest that the sites of initial inflammation in ileal CD are the lymphoid follicles [81] and because microscopic erosions are observable at the specialized follicle-associated epithelium (FAE), which lines PP [82].

### Pathoadaptative mutations in AIEC strain LF82

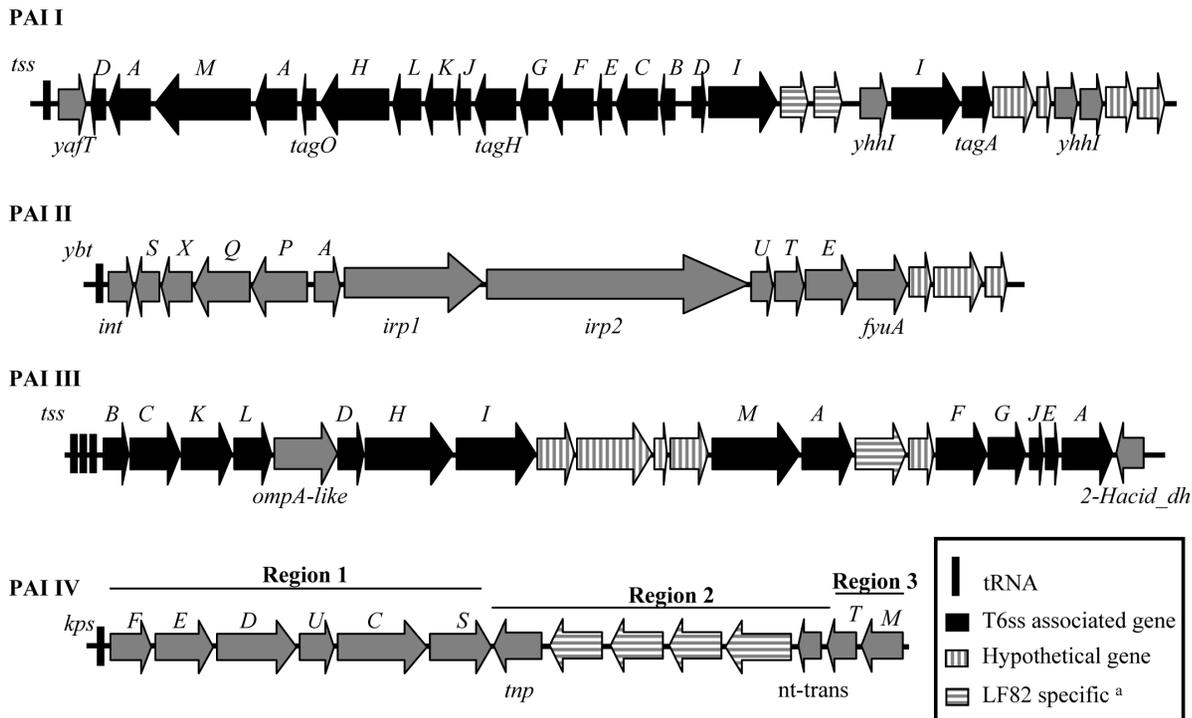
We searched for pathoadaptative mutations in previously described LF82 virulence factor encoding genes such as *fimH* encoding the adhesin of type 1 pili, *ompA* and *ompC* encoding the outer membrane proteins *OmpA* and *OmpC*, and *yfgL* involved in outer membrane vesicle formation. The analysis of the amino acid sequences of *FimH* of all the *E. coli* strains so far sequenced indicated that the strains clustered in two major groups with one including all the B2 strains except the MNEC strain S88 and the EPEC strain 2348/69 (Figure 5A). Among the several substitutions in LF82 *FimH*, we found the N70S and S78N substitutions already described as specific to the B2 phylogroup [83], but also substitution T158P, which was not found in *FimH* sequences of all other *E. coli* strains so far sequenced. Interestingly, position 158 is located in the flexible loop which connects the pilin and the lectin domains (Figure 6B). The presence of such a substitution in strain LF82 is of great interest since it can induce a structural modification in this pilin lectin interdomain and amino acid substitutions in this interdomain, region were previously shown to increase the affinity of *FimH* for its ligand mannose [84].

The analysis of the *OmpA* amino acid sequences indicated that all B2 strains are located on a single major branch, except strain CFT073 (Figure 6C). The LF82 *OmpA* sequence is 100% homologous with that of strain 536. Both strains express a *OmpA* variant having V110F and Y111D substitutions located at the top of the inflexible external L3 loop [85], likely to be involved in the recognition of a host cell receptor (Figure 6D).

The analysis of *OmpC* amino acid sequence indicated that the B2 strains are clustered in two subgroups, one including the strains S88, UTI89 and APEC\_01, and the second one with strains ED1a, CFT073 and LF82 (Figure 6E). In contrast, strain 536 was found in another cluster together with strains belonging to A and B1 phylogroups. The analysis of *YfgL* amino acid sequences indicated the presence of two major clusters with one including all the B2 *E. coli* strains (Figure 6F). The LF82 *YfgL* amino acid sequence is 100% homologous with to that of *E. coli* strains APEC\_01, UTI89, S88, CFT073 and ED1a.

Regarding the role of these various virulence factors identified in LF82, we further analyzed the association of pathoadaptative mutations of two of them that play a major role in the interaction of the LF82 bacteria with host intestinal cells. *FimH* and *OmpA* interact with host receptors whose expression is abnormal in patients with Crohn's disease, ie the CEACAM6 glycoprotein acting as an intestinal receptor for *FimH* adhesion [23,24] and the glycoprotein Gp96 involved in the fusion of *E. coli* outer membrane vesicle *via* *OmpA* to the plasma membrane of intestinal epithelial cells (Rolhion et al., in press). The analysis of the concatenated *FimH* and *OmpA* amino acid sequences indicated that the B2 strains divided into various clusters with one including





**Figure 5. Genome organization of four putative pathogenic islands carrying virulence-related genes.** PAI I and PAI III present genes encoding type VI secretion system (t6ss), PAI II is similar to the *Yersinia* high pathogenicity island and PAI IV present a similar genetic organization of group 2 capsule gene clusters. Black arrows indicate genes associated to t6ss, grey arrows indicated genes with assigned functions. Depending of the inclination, hatched arrows represents hypothetical proteins or proteins absent in any sequenced *E. coli* strains. Characteristic features of type VI secretion system genes products are indicated in Table S4. doi:10.1371/journal.pone.0012714.g005

strains LF82, 536, APEC\_01 and UTI89 (Figure 7A). Interestingly, when we compared the adhesion and invasion levels of the *E. coli* strains belonging to this subgroup, we observed that strains LF82 and UTI89 adhered at a similar level and that like LF82, APEC\_01 and UTI89 were highly invasive (Figure 7B and C).

## Conclusion

Strain LF82, belonging to phylogenetic group B2, is close to the avian pathogenic strain APEC\_01, meningitis-associated strain S88 and urinary-isolated strain UTI89 on the basis of flexible genome and single nucleotide polymorphisms in various virulence factors. Comparison of the phenotype indicated the APEC-01 and UTI89 strains present similar ability to adhere to and to invade human intestinal epithelial cells, but LF82 differs from other B2 *E. coli* strains by its intermediate killer phenotype in mice. Based on these results it would be of high interest to compare the behaviour of APEC-01 and UTI89 strains to that of AIEC strain LF82 in an inflammatory bowel disease model, such as transgenic mice expressing the human CEACAM6 receptor [24] to investigate the potential of these strains to induce chronic inflammation in a compromised host.

We identified 115 AIEC LF82 CDSs (2.6%), not found in any *E. coli* genomes so far sequenced. In addition, 15 CDSs (0.3%) share no homology with genes so far identified in any pathogenic bacteria. Among known CDSs within the flexible genome, we found four pathogenicity islands, orphan genes, genes encoding many various virulence factors involved in adhesion, invasion, iron acquisition, serum resistance, proteases, propanediol catabolism, LFP and GipA important to target PP. Combined with host susceptibility factors, this could explain the pathogenicity of

bacteria so far qualified as non pathogenic according to a modified Koch model taking into account the susceptibility of the host. It was recently reported that AIEC bacteria, among all the *E. coli* pathovars, were the only ones to benefit from autophagy deficiency, as observed in some Crohn's disease patients with mutations in IRGM and ATG16L1, and to better replicate intercellularly [86]. In addition, genome evolution in LF82 bacteria cannot be simply described by a "core genome and accessory gene pool" model. The analysis of the LF82 genome clearly showed that in addition to the presence of specific genes that could be involved in bacterial virulence, pathoadaptative mutations could also play a major role in making AIEC pathogenic in a compromised host. Analysis of single nucleotide mutations along the whole genome should be highly informative. For this purpose, genome sequencing of additional AIEC and non-AIEC strains should also be performed to better understand the AIEC-specific adaptations required to colonize the gut and to lead to the development of chronic inflammatory bowel disease in a genetic susceptible host.

## Materials and Methods

### Bacterial strain and Sequencing

*E. coli* strain LF82 was isolated from a patient with Crohn's disease [10]. Reference strains used in this study are listed in Table 1.

For the LF82 genome project, a shotgun sequencing strategy using three different clone libraries and capillary Sanger sequencing was used to obtain a 12× coverage of the complete genome. For two of three libraries, genomic DNA was fragmented by mechanical shearing and 3 kb and 10kb inserts was respectively



**Table 6.** Virulence factor encoding genes found in LF82 genome outside pathogenicity islands.

Gene(s)	Description	B2							K12	
		LF82	536	UTI89	CFT073	APEC_01	E2348/69	ED1a	S88	MG1655
<i>fimH</i>	Type 1 fimH adhesin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>csgA</i>	Curli	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>yadC</i>	Uncharacterized fimbrial-like protein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ydeQ</i>	Uncharacterized fimbrial-like protein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>yehA</i>	Predicted Yeh fimbrial-like adhesin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>yfcP</i>	Hypothetical fimbrial-like protein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ppdD</i>	Putative major pilin subunit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>auf</i>	Putative fimbrial-like protein	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>ygi</i>	Yqi fimbriae	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>lpfA</i>	fimbrial-like protein	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>gjpA</i>	Peyer's patch-specific factor	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>ibeA</i>	Invasion protein IbeA	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>pdu</i>	coenzyme B12-dependent 1,2-propanediol catabolism	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>ratA</i>	RatA-like protein	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>fepC</i>	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein fepC	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>chuA</i>	Outer membrane hemin receptor chuA	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>fhuA</i>	iron compound receptor (ferrichrome iron receptor)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>sitA-D</i>	<i>Salmonella</i> iron/manganese transport	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>iss</i>	Serum survival	+	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>sepA</i>	Extracellular serine protease	+	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>yfgL</i>	Outer membrane Vesicle formation	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ompC</i>	Outer membrane porin protein C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ompA</i>	Outer membrane porin protein A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nlpI</i>	Lipoprotein NlpI	+	+	+	+	+	+	+	+	+

doi:10.1371/journal.pone.0012714.t006

cloned onto pcdna2.1 (Invitrogen) and pCNS (pSU18 derived) plasmid vectors. In addition, a large insert (25 kb) BAC library was constructed from *Sau3A* partial digest and cloning onto pBelo-BAC11. Vector DNAs were purified and end-sequenced using dye-terminator chemistry on ABI3730 sequencers. To reduce assembly problems due to repeated sequences, the assembly was realized using Phred/Phrap/Consed software package ([www.phrap.com](http://www.phrap.com)). The finishing step was achieved by primer walks, PCR and transposon bomb libraries and a total of 11984 sequences (670, 82 and 11232 respectively) were needed for gap closure and quality assessment.

### Genome annotation and Comparative genomic analysis

The LF82 chromosome and plasmid sequences were integrated into the MicroScope system [87] to perform annotation a comparative analysis with the other *E. coli* strains published in the context of the ColiScope project [48]. In addition, each protein of LF82 strain, manually validated, was compared with the genomes of *E. coli* strains 536, UTI89, CFT073, APEC\_01, E2348/69, ED1a, S88, UMN026, AI39, SMS\_3\_5, EDL933, 157\_H7, EC4115, E24377A, 55989, IAI1, SE11, ATCC 8739, HS, K12\_DH10B, K12\_MG1655 and W3110 using the TBLASTN program to also take into account potential unpredicted genes and genes with mispredicted start codons in the so far sequenced *E. coli* strains. A gene was considered conserved if the TBLASTN analysis produced an alignment with a minimum of 85% identity and over between 90 to 110% of the length of the

query. In addition, TBLASTN analyses were manually validated to take into account a gene having a frameshift mutation. Finally, such genes were encompassed in the core genome.

To make easier the visualization of specific regions on the circular representation of the *E. coli* LF82 genome, we created color gradient that denotes the percentage of organisms which possess a homolog of a given gene of the reference genome. If this particular gene is present in all the organisms under study, it is tagged in light color (blue, red or green). Conversely, if it is only present in the reference genome, it is tagged in dark color (blue, red or green). In other words, the more pronounced the color, the higher the specificity.

Conserved gene clusters, i.e., synteny groups, were computed according to Vallenet *et al.* [88]. The Synteny plots has been obtained using the MaGe graphical interface of the ColiScope project (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>).

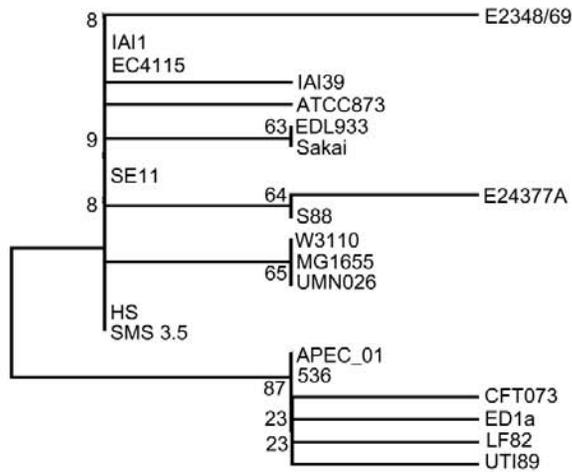
### Mage informatics Tool *RGPfinder*

Regions of Genomic plasticity (RGP) of the LF82 genome were searched in the *E. coli* strains 536, UTI89, CFT073, APEC\_01, E2348/69, ED1a, S88, UMN026, AI39, SMS\_3\_5, EDL933, 157\_H7, EC4115, E24377A, 55989, IAI1, SE11, ATCC 8739, HS, K12\_DH10B, K12\_MG1655 and W3110 genomes with the web tool *RGPfinder*, implemented in the annotation platform MaGe (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>; Roche *et al.*, in preparation).

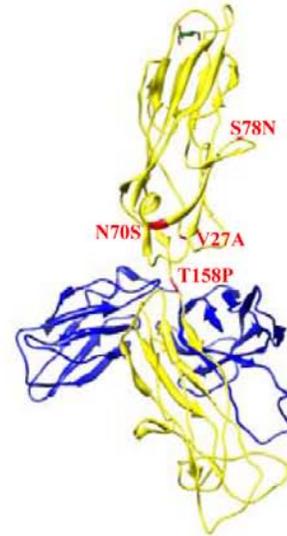
*RGPfinder* searches for synteny breaks between a reference genome and a set of closely related bacteria, named the Bacterial



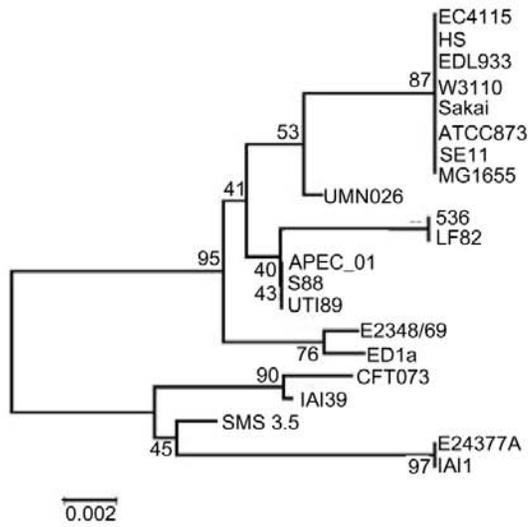
**A**



**B**



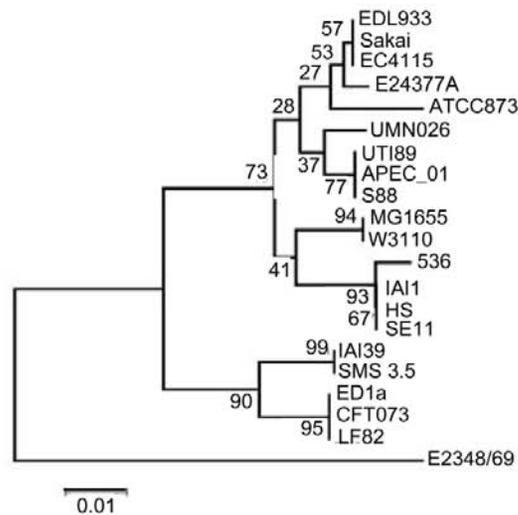
**C**



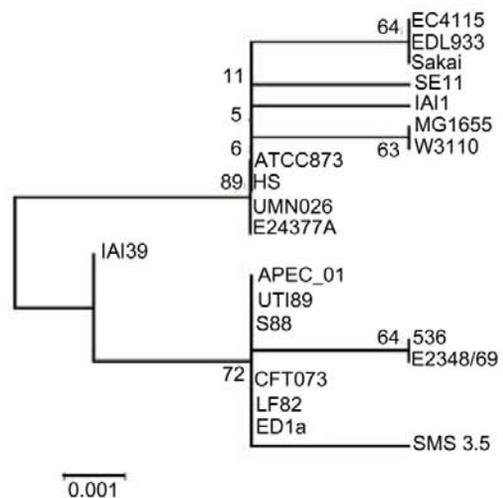
**D**



**E**



**F**





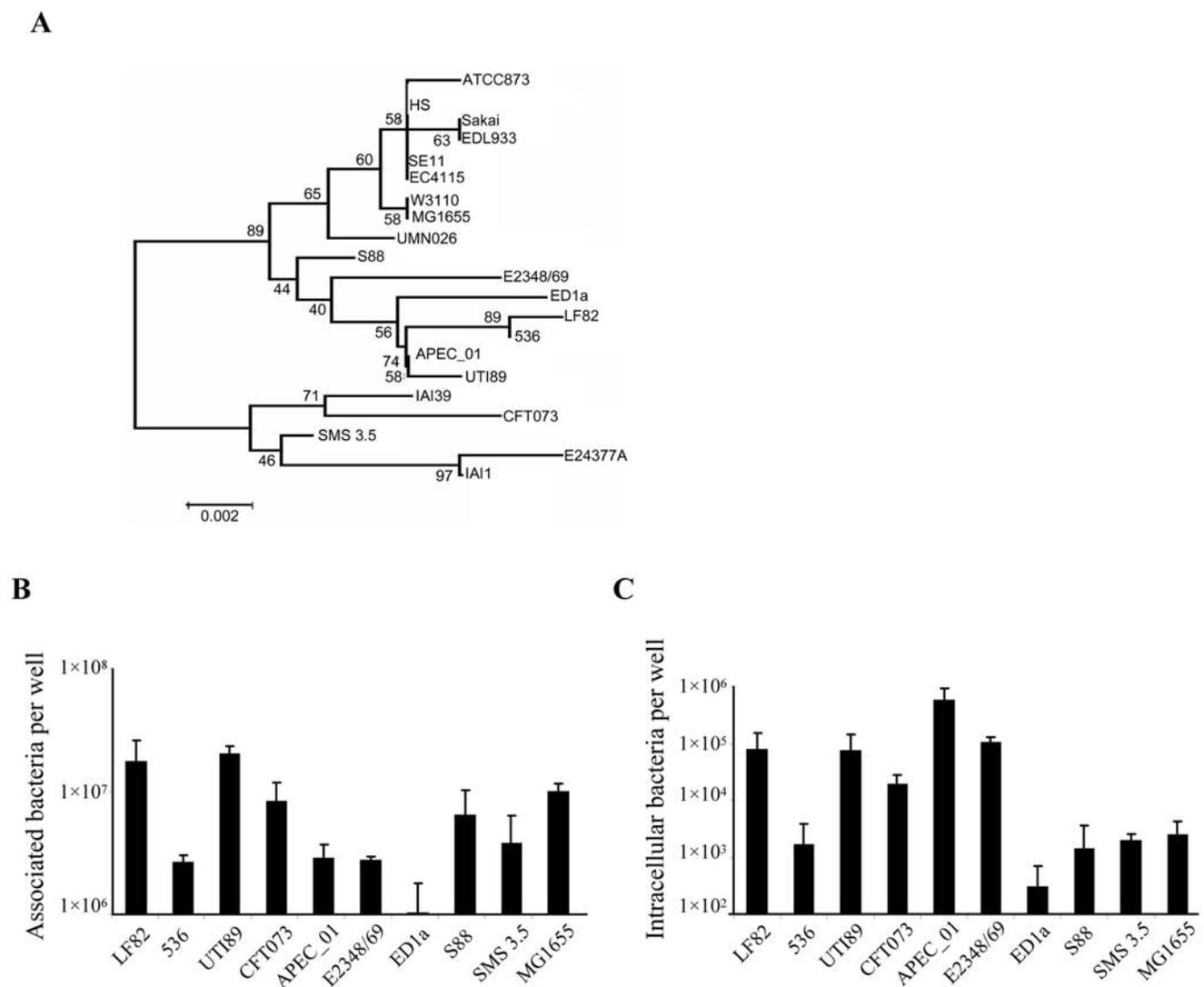
**Figure 6. Phylogenetic tree of sequenced *E. coli* strains.** Phylogenetic analysis were performed with FimH (A), OmpA (C), OmpC (E) and YfgL (F) variants. Location of substitutions in crystal structures are shown for FimH (B) and OmpA (D). FimH and OmpA are presented as ribbon in yellow [85,95]. FimH structure is in complex with the chaperon FimC (blue ribbon) and mannose (stick). The substitutions are indicated in red. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches.  
doi:10.1371/journal.pone.0012714.g006

genome set. A region of genomic plasticity (RGP) *sensu lato* is the sum of overlapping sub-regions that are missing in at least one of the bacterial genome comparison set. RGP's have a minimal size of 5 kb. This definition does not make any assumption about the evolutionary origin or genetic basis of these variable chromosomal segments. *RGPfinder* also provides information about composition abnormalities (GC% deviation, Codon Adaptation Index) and RGP's flanking features such as tRNA, IS, integrase (*int*) and genetic elements involved in DNA mobility (*mob*) which are

common characteristics of foreign DNA acquired by horizontal genetic transfer such as Genomic Islands (GI) and prophages (P).

### Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis of FimH, OmpA, OmpC and YfgL was inferred using the Neighbor-Joining method [89]. Bootstraps were defined on 500 replicates. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. Horizontal



**Figure 7. Phylogenetic tree and studies on adhesion and invasion levels of *E. coli* strains.** Location of LF82 in the phylogenetic tree based on analysis of concatenated FimH and OmpA amino acid sequences (A), adhesion (B) and invasion (C) abilities of LF82 and other sequenced B2 or non pathogenic strains to Intestine-407 cells. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches. Cell-associated bacteria were quantified after centrifugation and a 3-h infection period. Invasion was determined after gentamicin treatment for an additional 1h. Each value is the mean  $\pm$  SEM of at least three separate experiments.  
doi:10.1371/journal.pone.0012714.g007



branches are drawn proportional to inferred evolutionary distance. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 [90].

### Multilocus Sequence Typing

The multilocus sequence typing (MLST) was performed as previously described by Jaureguy et al. [42]. This MLST scheme used internal portions of the eight housekeeping genes *dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* and *uidA*. ClonalFrame [91] was used with 100,000 iterations, including 50,000 burn-ins to infer a recombination-insensitive phylogeny from the MLST data [90] to draw the consensus phylogenetic tree obtained using ClonalFrame.

### CRISPR identification

Identification of CRISPR loci in LF82 genome and searches for spacer homologs were performed as previously described [92].

### *In vitro* adhesion and invasion assays and *In vivo* virulence analysis

The bacterial adhesion and invasion assays were performed using the human intestine cell line Intestine-407 as previously described [93].

A mouse model of systemic infection was used to assess the intrinsic extraintestinal virulence of *E. coli* strains [94]. Mice were challenged subcutaneously with a standardized bacterial inoculum of  $2 \times 10^8$ , and mortality was assessed over 6 days post-challenge. In this model system, lethality is a rather clear-cut parameter and, based on the number of mice killed, strains are classified as non-killer (<2 of 10 mice killed), killer (>8 mice killed) [49] or intermediate.

### Supporting Information

**Table S1** LF82 plasmid composition compared to *Salmonella* and *Yersinia*.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0012714.s001 (0.03 MB XLS)

### References

- Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347: 417–429.
- Shanahan F (2002) Gut flora in gastrointestinal disease. *Eur J Surg Suppl.* pp 47–52.
- Elson CO (2000) Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* 119: 254–257.
- Sartor RB, DeLa Cadena RA, Green KD, Stadnicki A, Davis SW, et al. (1996) Selective kallikrein-kinin system activation in inbred rats differentially susceptible to granulomatous enterocolitis. *Gastroenterology* 110: 1467–1481.
- Lamps LW (2003) Pathology of food-borne infectious diseases of the gastrointestinal tract: an update. *Adv Anat Pathol* 10: 319–327.
- Schultz C, Moussa M, van Ketel R, Tytgat GN, Dankert J (1997) Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Clin Pathol* 50: 573–579.
- Liu CD, Rolandelli R, Ashley SW, Evans B, Shin M, et al. (1995) Laparoscopic surgery for inflammatory bowel disease. *Am Surg* 61: 1054–1056.
- Burke DA, Axon AT (1988) Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *Bmj* 297: 102–104.
- Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, et al. (2006) Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 55: 1760–1767.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, et al. (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115: 1405–1413.
- Kotlowski R, Bernstein CN, Sepchri S, Krause DO (2007) High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 56: 669–675.
- Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, et al. (2004) Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 127: 80–93.
- Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, Hudspeth BN, Brostoff J (2005) Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 11: 481–487.

**Table S2** Auxiliary genes of LF82 chromosome genome compared to other complete *E. coli* genomes.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0012714.s002 (0.55 MB XLS)

**Table S3** Identification of phylogroup markers.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0012714.s003 (0.04 MB XLS)

**Table S4** Similarity search of the LF82 specific CDSs.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0012714.s004 (0.03 MB XLS)

**Table S5** PAI I and PAI III of LF82 strain: Standardized nomenclature for type VI secretion systems compared to other published nomenclature.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0012714.s005 (0.03 MB XLS)

### Acknowledgments

We thank E. Denamur (INSERM U722, France) for strains S88 and ED1a, U. Dobrindt (University of Würzburg, Deutschland) for the 536 strain, GM. Weinstock (University of Texas) for the MG1655 strain, RA. Welch (University of Wisconsin-Madison) for the CFT073 strain, SJ. Hultgren (Washington University School of Medicine) for the UTI89 strain, LK. Nolan (Iowa State University) for the APEC\_01 strain, J. Ravel (University of Maryland) for the SMS3.5 strain and M. Donnenberg (University of Maryland) for the EPEC E2348/69 strain. We thank Stéphane Cruveiller (Genoscope) for the design of Figure 1.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SM EP LC CD BV EHZ BS VB CN JFC PP ADM. Performed the experiments: SM EP LC AdV CD BV EHZ BS VB PS. Analyzed the data: SM EP LC AdV CD BV EHZ BS VB PS CM FJMM RB ADM. Contributed reagents/materials/analysis tools: CN JFC CM. Wrote the paper: SM EP LC CM ADM.

- Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre JM, Lederman E, et al. (2002) Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 97: 939–946.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, et al. (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44–54.
- Eaves-Pyles T, Allen CA, Taormina J, Swidsinski A, Tutt CB, et al. (2007) *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol*.
- Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, et al. (2007) Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J* 1: 403–418.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, et al. (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127: 412–421.
- Sasaki M, Sitaraman SV, Babbitt BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, et al. (2007) Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* 87: 1042–1054.
- La Ferla K, Seeger D, Schreiber S (2004) Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by *E. coli* strains isolated from the colonic mucosa of IBD patients. *Int J Colorectal Dis* 19: 334–342.
- Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, Gonzalez-Huix F, Lopez-Oliu C, 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*.
- Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A (1999) Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 67: 4499–4509.
- Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschke P, et al. (2007) CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 117: 1566–1574.



24. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, et al. (2009) Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 206: 2179–2189.
25. Barnich N, Darfeuille-Michaud A (2007) Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 23: 16–20.
26. Glasser AL, Darfeuille-Michaud A (2008) Abnormalities in the handling of intracellular bacteria in Crohn's disease: a link between infectious etiology and host genetic susceptibility. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56: 237–244.
27. Bronowski C, Smith SL, Yokota K, Corkill JE, Martin HM, et al. (2008) A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. *Microbiology* 154: 571–583.
28. Mizoguchi E (2006) Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 130: 398–411.
29. Semiramoth N, Gleizes A, Turbica I, Sandre C, Gorges R, et al. (2009) *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 85: 310–321.
30. Subramanian S, Roberts CL, Hart CA, Martin HM, Edwards SW, et al. (2008) Replication of Colonic Crohn's Disease Mucosal *Escherichia coli* Isolates within Macrophages and Their Susceptibility to Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 427–434.
31. Wine E, Ossa JC, Gray-Owen SD, Sherman PM (2009) Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol* 9: 180.
32. Sutherland J, Miles M, Hedderley D, Li J, Devoy S, et al. (2009) *In vitro* effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *Int J Food Sci Nutr* 60: 717–727.
33. Huebner C, Ferguson LR, Han DY, Philpott M, Barclay ML, et al. (2009) Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 (NOD1) haplotypes and single nucleotide polymorphisms modify susceptibility to inflammatory bowel diseases in a New Zealand caucasian population: a case-control study. *BMC Res Notes* 2: 52.
34. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, et al. (2001) Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* 69: 5529–5537.
35. Meconi S, Vercellone A, Levillain F, Payre B, Al Saati T, et al. (2007) Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas *in vitro*. *Cell Microbiol* 9: 1252–1261.
36. Hu P, Elliott J, McCreedy P, Skowronski E, Garnes J, et al. (1998) Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 180: 5192–5202.
37. Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, et al. (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413: 848–852.
38. Selander RK, Levin BR (1980) Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 210: 545–547.
39. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 6175–6181.
40. Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E (2008) Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 10: 2484–2496.
41. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, et al. (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60: 1136–1151.
42. Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, et al. (2008) Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9: 560.
43. Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167–170.
44. Marraffini LA, Sontheimer EJ (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet* 11: 181–190.
45. Diez-Villasenor C, Almendros C, Garcia-Martinez J, Mojica FJ (2010) Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* 156: 1351–1361.
46. Ochman H, Selander RK (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 157: 690–693.
47. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, et al. (2008) The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* 190: 6881–6893.
48. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, et al. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5: e1000344.
49. Johnson JR, Clermont O, Menard M, Kuskowski MA, Picard B, et al. (2006) Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *J Infect Dis* 194: 1141–1150.
50. Brzuszkiewicz E, Bruggemann H, Liesegang H, Emmert H, Olschlager T, et al. (2006) How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12879–12884.
51. Lavigne JP, Blanc-Potard AB (2008) Molecular evolution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and pathogenic *Escherichia coli*: from pathogenesis to therapeutics. *Infect Genet Evol* 8: 217–226.
52. Lloyd AL, Henderson TA, Vigil PD, Mobley HL (2009) Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *J Bacteriol* 191: 3469–3481.
53. Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* 11: 3–8.
54. Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, et al. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1528–1533.
55. Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, et al. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312: 1526–1530.
56. Shalom G, Shaw JG, Thomas MS (2007) *In vivo* expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology* 153: 2689–2699.
57. Schell MA, Ulrich RL, Ribot WJ, Bruggemann EE, Hines HB, et al. (2007) Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol Microbiol* 64: 1466–1485.
58. Rao PS, Yamada Y, Tan YP, Leung KY (2004) Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol* 53: 573–586.
59. Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiameli P, Johnson SJ, et al. (2007) The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* 189: 3228–3236.
60. Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP (2006) Proteomic and microarray characterization of the *AggR* regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61: 1267–1282.
61. Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, et al. (2006) Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5977–5982.
62. Flannery EL, Mody L, Mobley HL (2009) Identification of a modular pathogenicity island that is widespread among urease-producing uropathogens and shares features with a diverse group of mobile elements. *Infect Immun* 77: 4887–4894.
63. Buchrieser C, Rusniok C, Frangeul L, Couve E, Billault A, et al. (1999) The 102-kilobase pgm locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Infect Immun* 67: 4851–4861.
64. Miller DA, Luo L, Hillson N, Keating TA, Walsh CT (2002) Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol* 9: 333–344.
65. Rakin A, Saken E, Harmsen D, Heesemann J (1994) The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol Microbiol* 13: 253–263.
66. Hancock V, Klemm P (2007) Global gene expression profiling of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* during biofilm growth in human urine. *Infect Immun* 75: 966–976.
67. Schneider G, Dobrindt U, Bruggemann H, Nagy G, Janke B, et al. (2004) The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* 72: 5993–6001.
68. Barrett B, Ebah L, Roberts IS (2002) Genomic structure of capsular determinants. *Curr Top Microbiol Immunol* 264: 137–155.
69. Wiles TJ, Kulesh RR, Mulvey MA (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 85: 11–19.
70. Huang SH, Chen YH, Fu Q, Stins M, Wang Y, et al. (1999) Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 67: 2103–2109.
71. Prasadarao NV, Wass CA, Huang SH, Kim KS (1999) Identification and characterization of a novel Ibe10 binding protein that contributes to *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* 67: 1131–1138.
72. Zou Y, He L, Wu CH, Cao H, Xie ZH, et al. (2007) PSF is an IbeA-binding protein contributing to meningitic *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Med Microbiol Immunol* 196: 135–143.
73. Cortes MA, Gibon J, Chanteloup NK, Moulin-Schouleur M, Gilot P, et al. (2008) Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infect Immun* 76: 4129–4136.
74. Klumpp J, Fuchs TM (2007) Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology* 153: 1207–1220.
75. Heithoff DM, Conner CP, Hentschel U, Govantes F, Hanna PC, et al. (1999) Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection. *J Bacteriol* 181: 799–807.
76. Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, et al. (2002) Identification and characterization of *lyfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70: 5416–5427.



77. Baumlér AJ, Tsois RM, Heffron F (1996) The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 279–283.
78. Baumlér AJ, Tsois RM, Heffron F (1996) Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64: 1862–1865.
79. Jordan DM, Cornick N, Torres AG, Dean-Nystrom EA, Kaper JB, et al. (2004) Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect Immun* 72: 6168–6171.
80. Stanley TL, Ellermeier CD, Schlauch JM (2000) Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar typhimurium survival in Peyer's patches. *J Bacteriol* 182: 4406–4413.
81. Morson BC (1972) Rectal biopsy in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 287: 1337–1339.
82. Gullberg E, Soderholm JD (2006) Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1072: 218–232.
83. Hommais F, Gouriou S, Amorin C, Bui H, Rahimy MC, et al. (2003) The FimH A27V mutation is pathoadaptive for urovirulence in *Escherichia coli* B2 phylogenetic group isolates. *Infect Immun* 71: 3619–3622.
84. Aprikian P, Tchesnokova V, Kidd B, Yakovenko O, Yarov-Yarovoy V, et al. (2007) Interdomain interaction in the FimH adhesin of *Escherichia coli* regulates the affinity to mannose. *J Biol Chem* 282: 23437–23446.
85. Pautsch A, Schulz GE (1998) Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol* 5: 1013–1017.
86. Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A (2010) Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 12: 99–113.
87. Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L, et al. (2009) MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database (Oxford)* 2009: bap021.
88. Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S, et al. (2006) MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res* 34: 53–65.
89. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
90. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.
91. Didelot X, Falush D (2007) Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics* 175: 1251–1266.
92. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60: 174–182.
93. Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A (2001) Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* 39: 1272–1284.
94. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, et al. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67: 546–553.
95. Hung CS, Bouckaert J, Hung D, Pinkner J, Widberg C, et al. (2002) Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* 44: 903–915.
96. Hochhut B, Wilde C, Balling G, Middendorf B, Dobrindt U, et al. (2006) Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol* 61: 584–595.
97. Welch RA, Burland V, Plunkett G, 3rd, Redford P, Roesch P, et al. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 17020–17024.
98. Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, et al. (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* 191: 347–354.
99. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1462.



### Commentaire de la publication N°3 :

Le séquençage de la souche AIEC de référence LF82 est un projet réalisé grâce à une collaboration avec le Génoscope, fournissant les séquences complètes de haute qualité du chromosome et du plasmide de cette souche. Afin d'exploiter les données, nous avons comparé les séquences ADN obtenues avec celles de 21 génomes de souches de *E. coli* complètement séquencées et disponibles. Cette analyse a permis d'identifier le squelette génomique de l'espèce, représentant l'ensemble des gènes communs à tous les génomes séquencés de *E. coli* (n=3162). Les gènes ne faisant pas partie de ce squelette génomique appelés « gènes flexibles » sont pour la plupart retrouvés dans les souches suivantes : APEC-01 (isolée de poulet atteint de colibacillose aviaire), S88 (isolée du liquide céphalo-rachidien d'un patient atteint de méningite) et UTI89 (souche pathogène urinaire). Ainsi la souche AIEC LF82 est très proche de ces souches appartenant toutes au groupe phylogénétique B2. L'analyse « Multilocus Sequence Typing » (MLST) confirme l'appartenance de la souche AIEC LF82 au groupe B2 mais elle reste tout de même dissociée du sous-groupe APEC\_01/S88/UTI89.

L'appartenance de la souche AIEC LF82 au groupe phylogénétique B2 est en corrélation avec une étude génétique récente montrant que les souches *E. coli* colonisant la muqueuse intestinale de patient atteint de MICI font principalement parties des groupe phylogénétiques B2 et D (Kotlowski *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 2009). Les *E. coli* du groupe B2 ont également un rôle dans l'étiologie de pathologies extra-intestinales (Picard *et al.*, 1993). Un test de létalité en modèle animal souris, consistant à injecter  $2 \times 10^8$  bactéries en intra-abdominal, avait été mis au point par Picard et coll. afin d'évaluer le caractère de virulence des souches de *E. coli* (Picard *et al.*, 1999). Ce test a permis de mettre en évidence que le caractère virulent d'une souche est multifactoriel mais que le groupe phylogénétique B2 est souvent associé à la virulence (Johnson *et al.*, 2006). Nous avons analysé le potentiel de la souche AIEC LF82 dans ce modèle animal et il s'avère que le phénotype observé est intermédiaire par rapport aux souches considérées comme « killer » (APEC-01, S88, UTI89 et CFT076) et aux souches « non killer » (K-12 MG1655 et ED1a). Ce résultat laisse supposer que la souche AIEC LF82 pourrait être assimilée à un pathogène opportuniste.



Le génome de la souche AIEC LF82 a évolué en « patchwork » comme cela a été décrit pour les souches UPEC (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). En effet, nous avons pu identifier du matériel génétique acquis par transferts horizontaux :

- **Un plasmide**, pLF82, présentant des homologies avec le plasmide pMT1 de *Yersinia pestis* et le plasmide pHCM2 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et dont la plupart des CDSs (CoDing Sequences) codent pour des protéines hypothétiques. Le pourcentage en GC de ce plasmide est faible (46,2%) ce qui renforce l'hypothèse qu'il a été obtenu par transfert horizontal d'une espèce éloignée. Cependant la présence de ce plasmide n'est pas systématique chez les souches AIEC et cette observation a également été retrouvée dans une collection de souches AIEC nord-Américaine (Baumgart *et al.*, 2007).

- **Des îlots génomiques** augmentant la taille des génomes des *E. coli* pathogènes par rapport aux *E. coli* commensaux (Rode *et al.*, 1999). Un simple comparaison de la taille du génome de la souche AIEC LF82, 4 773 108 pb, avec celui de la souche commensale de référence *E. coli* HS, 4 643 538 pb, permet de voir que cette souche a évolué par acquisition de gènes (Rasko *et al.*, 2008). En général, les îlots génomiques participent au « fitness » bactérien en leur conférant de nouvelles propriétés notamment des capacités de virulence : on parle alors **d'îlot de pathogénicité** (PAI) (Lloyd *et al.*, 2009). Quatre PAI ont pu être identifiés dans la souche AIEC LF82 :

✓ PAI I et III codent pour un système de sécrétion de type VI déjà identifié dans différentes bactéries pathogènes à Gram négatif (Bingle *et al.*, 2008; Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Dudley *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Lloyd *et al.*, 2009; Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2004; Schell *et al.*, 2007; Shalom *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, aucun rôle de ce système de sécrétion n'a pu être mis en évidence chez la souche AIEC LF82, l'étude de ce système étant complexe car cette souche possède les gènes codant ce système de sécrétion au niveau de deux îlots ce qui induit une redondance des gènes.

✓ PAI II comporte tous les gènes permettant la biosynthèse d'un sidérophore, la yersiniabactine, ainsi que le gène *fyuA* (ferric yersiniabactin uptake) codant le récepteur de membrane externe du complexe yersiniabactine/fer (Rakin *et al.*, 1994). Ce système de captation du fer a été caractérisé comme facteur de virulence au sein des ExPEC (Schubert *et al.*, 2002). En effet, il pourrait permettre l'acquisition du fer dans des conditions de stress de privation, comme celles rencontrées lors de la colonisation du tractus intestinal.

✓ PAI IV comporte tous les gènes permettant la synthèse d'une capsule de groupe 2 et l'organisation génétique est de type antigénique K1 ou K5 (Barrett *et al.*, 2002). Dans la



souche de *E. coli* Nissle 1917, les polysaccharides K5, permettent l'interaction des bactéries avec les cellules épithéliales intestinales (Hafez *et al.*, 2009). Cependant le sérotype de la souche AIEC LF82 n'a pas permis de caractériser l'antigène de capsule.

- **Quatre prophages**, forme lysogène des phages, qui apportent à la bactérie de nouveaux éléments génétiques. Cependant, ils n'hébergent pas de facteurs de virulence actuellement caractérisés. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces prophages participent à la « conversion lysogénique » en augmentant le pouvoir pathogène de la souche AIEC LF82.

La souche AIEC LF82 est donc de par son organisation génomique proche des souches urinaires. Cependant, elle ne présente pas dans son génome les facteurs de virulence spécifiques de UPEC tels que les pili P (*pap*), S (*sfa*), et F1C (*foc*), permettant aux UPEC de coloniser le tractus urinaire, et les toxines telles que l'hémolysine (*hly*) et le facteur de nécrose (*CNF1*), induisant des dommages tissulaires (Wiles *et al.*, 2008). Par contre, comme dans la majorité des bactéries virulentes du groupe B2, la souche AIEC LF82 comprend dans son génome les gènes permettant d'exprimer différents caractères spécifiques qui les distinguent des *E. coli* commensaux.

Parmi les gènes flexibles de la souche AIEC LF82 sont retrouvés :

- **15 CDSs uniques** c'est à dire qui ne présentent aucune homologie avec d'autres CDSs de génomes bactériens. Leur analyse et leur recherche dans la collection de souche AIEC permettront de mieux caractériser la pathogénicité des souches AIEC ainsi que la mise au point d'outils moléculaires pour diagnostiquer la présence de souches AIEC.

- Des **facteurs de virulence** ont pu être identifiés par homologie avec des facteurs déjà identifiés impliqués dans l'adhésion (10 types de fimbriae), l'invasion (*ibeA*), l'acquisition du fer (*fepC*, *chuA*, *fhuA* et *sitA*), la résistance au sérum (*iss*), une protéase (*sepA*) et le catabolisme du propanediol (opéron *pdu*). De plus, dans le génome de la souche AIEC LF82 se trouve l'opéron *lpf* (long polar fimbriae) et le gène *gipA* (growth in Peyer's patches factor). Chez la souche EHEC O157:H7 86-24, des expériences *in vivo* chez le porc et le mouton montrent que les LFP contribuent à la colonisation du tractus intestinal (Jordan *et al.*, 2004). Chez *S. Typhimurium*, les LPF permettent l'adhésion bactérienne aux plaques de Peyer (Baumler *et al.*, 1996b). Par ailleurs, le gène *gipA* est spécifiquement exprimé au niveau intestinal et GipA permet la survie bactérienne dans les plaques de Peyer. Ainsi, la présence de l'opéron *lpf* et du gène *gipA* suggère que les AIEC sont capables de cibler les plaques de Peyer. Cette hypothèse serait en corrélation avec des observations cliniques rapportant que les



sites initiaux de l'inflammation dans les MC iléales seraient les follicules lymphoïdes (Gullberg and Soderholm, 2006; Morson, 1972).

- La présence de **SNP (Single Nucleotide Polymorphism)** suggère l'existence de mutations pathoadaptatives qui permettraient aux bactéries de mieux s'adapter à une « niche écologique » qui est dans le cas des AIEC le tractus intestinal de l'hôte. Chez les patients atteints de MC, deux glycoprotéines sont anormalement exprimées au niveau de la muqueuse iléale, la glycoprotéine CEACAM6 servant de récepteur à l'adhésine FimH (Barnich *et al.*, 2007 ; Carvalho *et al.*, 2009) et la glycoprotéine Gp96 impliquée dans la fusion de vésicules de membrane externe de *E. coli* via la protéine de membrane externe OmpA à la membrane plasmique de la cellule hôte (Rolhion, 2010). Il est intéressant de noter l'existence de mutations dans les séquences protéiques de OmpA et FimH par rapport à une souche de *E. coli* K-12. Cependant, l'implication de telles mutations dans une évolution pathoadaptatives de pathovar AIEC devra être évaluée par des études génétiques et la caractérisation phénotypique de la collection de souches disponible au laboratoire.

En conclusion, le séquençage du génome de la souche de référence AIEC LF82 a permis de mettre en évidence (i) des CDSs spécifiques non retrouvés chez les autres *E. coli*, (ii) des gènes de virulence qui pourraient expliquer en partie les mécanismes de pathogénicité des souches AIEC et (iii) des mutations pathoadaptatives qui pourraient jouer un rôle majeur dans l'amélioration des capacités de colonisation et d'inflammation du tractus intestinal. Ainsi, d'après la version modifiée du postulat de Koch, les bactéries AIEC pourraient être considérées comme pathogènes notamment chez des patients génétiquement prédisposés.



# **DISCUSSION-PERSPECTIVES**



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La maladie de Crohn (MC) est une maladie multifactorielle qui met en jeu une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques conduisant à une hyperactivation du système immunitaire intestinal. Cette pathologie serait la conséquence d'une prédisposition génétique de l'hôte combinée à une colonisation par des bactéries ayant subi une pathoadaptation aux conditions intestinales. Chez les sujets atteints de maladie de Crohn, des mutations sont fréquemment retrouvées au niveau de gènes de susceptibilité impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, la réponse immunitaire innée et/ou adaptative de l'hôte vis-à-vis d'agents bactériens ou de produits bactériens. Il s'agit en particulier de:

- ***NOD2/CARD15*** (Nucleotide-binding Oligomerization Domain/Caspase-Activating Recruitment Domain) qui code un récepteur cytoplasmique de l'immunité innée et pour lequel des variants mutés sont incapables de contrôler la multiplication de bactéries intracellulaires consécutivement à une déficience d'autophagie (Hisamatsu *et al.*, 2003; Opitz *et al.*, 2004; Travassos *et al.*),

- ***ATG16LI*** (ATG16 autophagy-related gene16-like 1) (Hampe *et al.*, 2007; Latiano *et al.*, 2009; Rioux *et al.*, 2007) et ***IRGM*** (Immunity-related GTPase protein type M) (Parkes *et al.*, 2007) qui codent des protéines impliquées dans la voie de l'autophagie,

- ***TLR4*** qui code un récepteur impliqué dans la détection du LPS des bactéries à Gram négatif extracellulaires et dans l'initiation des réponses immunitaires (Cario and Podolsky, 2000; Hausmann *et al.*, 2002),

- ***DLG5*** (Drosophila Disc Larg Homolog 5) qui code une protéine de la famille des guanylate-kinases impliquée dans le maintien de la perméabilité membranaire de la barrière intestinale (Humbert *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 2003),

- ***CEACAM6*** (CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6) qui code une protéine de surface glycosylée permettant aux bactéries AIEC de coloniser *via* une reconnaissance par les pili de type 1 (Barnich *et al.*, 2007).

L'identification de tels gènes de susceptibilité chez les patients renforce l'hypothèse de l'implication de bactéries à tropisme intracellulaire dans l'étiologie de la MC. Notre laboratoire a exploré un rôle possible de *E. coli* comme agents bactériens opportunistes pouvant induire une pathologie chez des patients susceptibles. Cette piste a été ouverte lorsque les premières analyses ont montré une prédominance anormale de *E. coli* associés à la



muqueuse intestinale chez les patients atteints de MC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Depuis, plusieurs études indépendantes ont rapporté une telle dysbiose avec forte augmentation de *E. coli* colonisant et formant un biofilm à la surface de la muqueuse intestinale (Conte *et al.*, 2006; Kotlowski *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004; Neut *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2002). Sur la base des caractéristiques pathogènes de ces souches de *E. coli*, un pathovar associé à la muqueuse iléale de patients atteints de MC, nommé AIEC pour Adherent-Invasive *E. coli*, a été proposé (Boudeau *et al.*, 1999; Glasser *et al.*, 2009). Des souches AIEC associées à la MC ont été mises en évidence dans différentes études réalisées en Europe ou aux Etats-Unis (Baumgart *et al.*, 2007; Bronowski *et al.*, 2008; Eaves-Pyles *et al.*, 2007; Huebner *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004; Mizoguchi, 2006; Semiramo *et al.*, 2009; Subramanian *et al.*, 2008; Sutherland *et al.*, 2009; Wine *et al.*, 2009).

L'objectif de mon travail de thèse a été l'analyse moléculaire de la souche AIEC LF82, souche de référence. Cette étude a permis de mettre en évidence que le caractère pathogène des souches AIEC est dû à des facteurs de virulence originaux et à une régulation complexe de leur expression permettant à ces bactéries opportunistes d'induire et/ou d'amplifier un état inflammatoire chez des patients prédisposés.

Les souches de *E. coli* sont classées en deux grands groupes : souches pathogènes *versus* souches non-pathogènes. Parmi les souches pathogènes, différents pathovars ont été décrits, et ces pathovars étant eux-même répartis en deux grands groupes comprenant les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) et intra-intestinaux (IntEC). Par ailleurs, les études phylogénétiques des souches de *E. coli* ont permis de décrire différents groupe phylogénétiques qui semblaient initialement en corrélation avec le caractère pathogène et non-pathogène des souches. Ainsi les souches commensales et pathogènes intra-intestinales appartiennent majoritairement aux groupes A et B1 alors que les souches ExPEC appartiennent majoritairement aux groupes B2 et D. Cependant des études récentes montrent que cette répartition est en réalité plus complexe. En effet, il existe des souches de groupe phylogénétique B2 qui sont commensales, comme la souche ED1a récemment séquencée (Touchon *et al.*, 2009). La souche AIEC de référence LF82 appartient également au groupe phylogénétique B2, comme une majorité des souches colonisant les patients atteints de MC, mais on retrouve également des AIEC appartenant aux groupe phylogénétiques D et A1. De ce fait, il est clairement établi que la distinction commensale *versus* pathogène ne peut se faire uniquement en fonction du groupe phylogénétique. Ceci s'explique notamment par l'existence



dans chaque génome d'un pool flexible de gènes échangés par transfert horizontal et modulant la pathogénicité et l'adaptation à des niches particulières chez un hôte prédisposé.

Afin de mieux comprendre le processus de pathogénicité des souches AIEC, le séquençage du génome de la souche de référence AIEC LF82 a été réalisé dans le cadre du projet ColiScope. Son analyse a permis de mieux comprendre l'évolution de cette souche, et de mettre en évidence de nombreux gènes acquis par transfert horizontaux jouant potentiellement un rôle dans la virulence de la souche AIEC LF82.

L'organisation génomique de la souche AIEC LF82 montre, comme chez les autres souches de *E. coli* entièrement séquencées, qu'il existe des points d'insertion **d'îlots génomiques**. De plus, la présence/absence de ces îlots n'est pas forcément caractéristique d'un groupe phylogénétique donné ni forcément associé au caractère pathogène des souches de *E. coli* (Touchon *et al.*, 2009). Parmi les îlots génomiques de la souche LF82, sont retrouvés quatre **îlots de pathogénicité (PAI)** dont deux codent un **système de sécrétion de type VI**. Ces systèmes de sécrétion de type VI pourraient jouer un rôle crucial dans la virulence de la souche LF82, en effet une étude très récente montre que chez *Helicobacter hepaticus* ce système de sécrétion limite la colonisation et l'inflammation intestinale et permet une relation plus équilibrée de ce pathogène avec son hôte (Chow and Mazmanian). Or, nous avons montré que la souche AIEC LF82 présente une virulence modérée, confirmée par un phénotype « killer » intermédiaire dans le modèle murin développé par Johnson *et al.* (Johnson *et al.*, 2006). Il serait intéressant d'étudier en modèle animal la virulence de mutants invalidés dans le système de sécrétion de type VI pour savoir si la souche AIEC LF82 n'utiliserait pas ce système pour échapper au système immunitaire de l'hôte et créer une niche de réplication qui lui permettrait d'entretenir un état inflammatoire chronique.

La fonctionnalité de ces deux systèmes de sécrétion de type VI n'a pas pu être vérifiée à l'heure actuelle, même si divers mutants ont été générés, dans la mesure où nous n'avons pas pu mettre en évidence des effecteurs sécrétés (résultats non présentés). Cependant, par analogie avec d'autres bactéries du genre *E. coli* exprimant de tels systèmes de sécrétion fonctionnels (Aschtgen *et al.*, 2008; Dudley *et al.*, 2006), il est probable que ceux retrouvés chez la souche LF82 soient également fonctionnels en raison de la forte homologie de séquence avec des gènes codant des systèmes de sécrétion de type VI chez d'autres espèces et du respect de leur organisation (synténie). Si un rôle du système de sécrétion de type VI est confirmé, une des perspectives immédiate est de mettre en évidence les protéines sécrétées



par un système de sécrétion type VI chez la souche AIEC LF82 et de définir leur(s) rôle(s) dans l'interaction bactéries/hôte. Pour simplifier les études préliminaires, étant donné la redondance des gènes, la mise en évidence du rôle du système de sécrétion de type VI pourrait se faire en délétant chaque îlot comportant un système de sécrétion de type VI, selon la technique déjà utilisée pour étudier le rôle des îlots de pathogénicité de la souche UPEC 536. Les îlots étant des éléments naturellement mobiles, l'intégration d'un gène suicide dans leur séquence permet, dans certaines conditions de culture, d'entraîner leur excision de façon spontanée (Middendorf *et al.*, 2004).

Le processus de colonisation et d'induction d'une inflammation par les AIEC ne serait pas possible sans l'expression de certains **facteurs de virulence** impliqués dans l'adhésion (10 types de fimbriae), l'invasion (IbeA), la captation du fer (FepC, ChuA, FhuA, SitA et FyuA), la résistance au sérum (ISS), ou la mise en place d'une capsule. De plus, chez la souche LF82, de façon intéressante, deux gènes/opérons impliqués dans le ciblage des plaques de Peyer par *S. Typhimurium* (Baumler *et al.*, 1996a; Stanley *et al.*, 2000) ont pu être mis en évidence : le gène *gipA* (growth in Peyer's patches factor) ainsi que l'opéron *lpf* (Long Polar Fimbriae). Leur présence chez les souches AIEC alors qu'ils ne sont pas fréquemment retrouvés chez les ExPEC en général ni chez les InPEC, à l'exception des EHEC (Torres *et al.*, 2002) pourrait expliquer l'apparition des lésions précoces caractéristiques de la MC préférentiellement au niveau de l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer (Gullberg and Soderholm, 2006; Morson, 1972). Nous nous proposons suite à la création de mutants isogéniques LF82- $\Delta$ *lpfA* ou LF82- $\Delta$ *gipA* d'analyser leurs rôles chez la souche AIEC LF82 dans le ciblage des plaques de Peyer. Ces études pourraient être envisagées *in vitro* en chambre de Ussing sur des plaques de Peyer murines, selon le modèle développé par Barreau et collaborateurs (Barreau *et al.*, 2007). Nous proposons également de comparer le comportement de ces mutants par rapport à la souche sauvage en modèle murin CEABAC10, surexprimant le récepteur CEACAM6 humain, qui permet une colonisation du tractus intestinal par la souche LF82 et le développement d'une colite inflammatoire (Carvalho *et al.*, 2009).

De façon intéressante, **98 CDS** retrouvés au sein du génome de la souche AIEC LF82 sont absents des bases de données nucléiques correspondant aux séquences de *E. coli*. Ainsi ces CDS, augmentant le pangénome de l'espèce, codent potentiellement des protéines spécifiques impliquées dans le comportement de la souche AIEC LF82 chez un hôte



susceptible. Par ailleurs, 55 de ces CDS spécifiques sont regroupés au sein d'un îlot génomique qui semble provenir d'une espèce éloignée comme *Yersinia*. Avant de s'intéresser à leur rôle, nous proposons tout d'abord de rechercher la prévalence de ces différents CDS au sein du pathovar AIEC par criblage de différentes collections réalisées en France, en Europe ou aux USA (Baumgart *et al.*, 2007; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Martinez-Medina *et al.*, 2009a; Sasaki *et al.*, 2007). Le but serait dans un premier temps d'identifier un ou plusieurs facteur(s) bactérien(s) spécifique(s) à l'ensemble des bactéries du pathovar AIEC. Il faut noter que parmi les 96 CDSs spécifiques de la souche AIEC LF82, 15 ne présentent aucune homologie avec des séquences nucléiques bactériennes connues. Ces CDS représentent donc de très bons candidats potentiels pour la mise au point d'un test moléculaire de détection des AIEC et/ou de quantification du niveau de colonisation de la muqueuse intestinale. Un tel outil pourrait être exploité à la fois en clinique pour mettre en place une thérapie ciblée de la MC et en laboratoire de recherche sur modèle animal.

Par ailleurs, une dysbiose est observée au niveau intestinal chez les patients atteints de MC avec une diminution des espèces bactériennes bénéfiques telles que *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* et une augmentation des bactéries pathogènes telles que *Bacteroides* et *E. coli* (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Giaffer *et al.*, 1992; Keighley *et al.*, 1978; Lederman, 1997; Manichanh *et al.*, 2006; Neut *et al.*, 2002 Swidsinski, 2002 #95; Seksik *et al.*, 2006; Sokol *et al.*, 2008; Tamboli *et al.*, 2004). Ainsi, il serait intéressant d'étudier le rôle des CDS spécifiques dans des processus qui favoriseraient les souches AIEC. En effet, les bactéries AIEC pourraient par exemple exprimer des bactériocines ou moduler le quorum sensing. Une autre hypothèse permettant d'expliquer la prévalence anormale d'AIEC serait l'acquisition de propriétés métaboliques supplémentaires par rapport aux *E. coli* commensaux permettant de transporter et/ou de métaboliser différents substrats (particulièrement des sucres) qui leur confèreraient un avantage pour s'implanter au niveau de la muqueuse intestinale. Dans la littérature, plusieurs exemples sont rapportés, notamment l'utilisation du désoxyribose favorisant la croissance de *E. coli* pathogènes pendant la colonisation de l'hôte (Martinez-Jehanne *et al.*, 2009).

La dysbiose observée chez les patients peut aussi résulter d'une adaptation de certaines souches bactériennes aux susceptibilités génétiques de l'hôte. Des études de GWA (Genome-Wide Association) ont récemment montré une forte association entre MC et des mutations des gènes *ATG16LI* (ATG16 autophagy-related 16-like 1) ou *IRGM* (Immunity-related GTPase protein type M) qui codent des protéines impliquées dans la voie de l'autophagie (Hampe *et*



*al.*, 2007; Latiano *et al.*, 2008; Parkes *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007). L'autophagie joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte vis-à-vis des pathogènes (Amer and Swanson, 2005; Deretic, 2005; Dupont and Lafont, 2009; Nakagawa *et al.*, 2004; Schmid and Munz, 2007; Singh *et al.*, 2006) et pourrait donc avoir un rôle clé dans la MC. Il s'avère que les AIEC, contrairement aux souches de *E. coli* K-12 MG1655, environnementale SMS 3.5, commensale HS, EPEC E2348/69, DAEC C1845, ETEC H10407 et EIEC E12860/0, sont pris en charge par l'autophagie qui contrôle leur multiplication intracellulaire et pourraient donc, chez les patients porteurs de susceptibilités génétiques, profiter d'une autophagie déficiente (Lapaquette *et al.*). Ainsi, il serait intéressant de comparer les génomes de ces souches afin de déterminer s'il existe chez les AIEC, comparativement aux autres pathogènes, des facteurs spécifiques modulant l'interaction avec la machinerie autophagique de l'hôte.

Les AIEC associés à la MC présentent dans leur génome des caractères spécifiques mais leur présence ne peut pas expliquer à elle seule leur capacité à coloniser l'épithélium intestinal et à induire un état inflammatoire. Il semblerait que ces souches se soient adaptées à une niche particulière, le tractus intestinal, grâce à des mécanismes de régulation différents de ceux de souches de *E. coli* non pathogènes. L'existence de systèmes de régulation de la virulence chez les bactéries AIEC a été mise en évidence lors de l'étude du comportement de mutants de la souche AIEC LF82 dépourvus de flagelles. En effet, il a été montré que les flagelles jouent un rôle important dans l'inflammation, dans l'interaction des bactéries AIEC avec les cellules épithéliales par la mobilité qu'ils confèrent aux bactéries mais également en régulant l'expression des pili de type 1 et d'autres facteurs restant à identifier (Barnich *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2008).

Dans le but de mieux comprendre le fonctionnement des systèmes de régulation de la virulence dans la souche AIEC LF82 qui lui confèrent en condition intestinale un avantage par rapport à la flore commensale, nous avons étudié l'implication de régulateurs globaux tels que **les protéines de type-histone**. Ces protéines sont nécessaires à la structure du nucléoïde et à sa compaction (Thanbichler *et al.*, 2005) mais peuvent également moduler spécifiquement la transcription de certains gènes et notamment de gènes codant des facteurs de virulence (Dorman and Deighan, 2003). Concernant la souche AIEC LF82, au contact de cellules épithéliales intestinales, l'ADN bactérien est plus condensé, les bactéries sont majoritairement en phase ON pour l'expression des pili de type 1 et seule l'expression de la protéine de type-



histone Fis est diminuée. Nous avons pu montrer que dans cette souche, la protéine Fis, en régulant négativement l'expression de la recombinaise FimE qui catalyse de façon non stringente le passage de ON vers OFF de l'élément *fimS* (Holden *et al.*, 2007; Klemm, 1986), diminue l'expression des pili de type 1. De plus, Fis agit sur l'expression de NanC, protéine de membrane externe permettant le transport de l'acide sialique. Chez *E. coli* K-12, l'acide sialique régule négativement l'expression de *fimB* et donc des pili de type 1 (El-Labany *et al.*, 2003; Sohanpal *et al.*, 2007). Cependant, dans la souche AIEC LF82 ce sucre aminé n'a aucun effet sur l'expression de *fimB* et la variation de phase. Ainsi, chez les patients atteints de MC chez lesquels des taux élevés d'acide sialique sont produits durant l'inflammation (Ricci *et al.*, 1995), les bactéries AIEC seraient avantagées par rapport aux souches commensales car elles continueraient d'exprimer des pili de type 1 leur permettant d'adhérer à la muqueuse intestinale.

Il avait déjà été montré que Fis pouvait réguler l'expression de structures fimbriales telles que les curli chez les EAEC (Saldana *et al.*, 2009) mais aucun rôle dans la régulation des pili de type 1 n'avait été mis en évidence avant la publication de nos travaux. Par ailleurs, Fis module l'expression de facteurs de virulence chez des bactéries du genre *Salmonella* en conditions intracellulaires (T *et al.*, 2006). Il n'est pas exclu que Fis régule des cibles encore non identifiées. La recherche de sites de fixation spécifiques pour Fis, dans toutes les séquences régulatrices en amont des gènes (-1000pb), pourrait servir de point de départ pour approfondir son rôle dans la virulence des souches AIEC (**Annexe 3**).

Chez les bactéries, il existe différents niveaux de régulation de l'expression génique en réponse à un stress environnemental. Par exemple, la forte osmolarité rencontrée par les bactéries AIEC au niveau intestinal est perçue par **le système à deux composants EnvZ/OmpR**. Ce système permet la synthèse de OmpC et en conséquence l'activation de la voie de régulation RpoE et l'expression des pili de type 1 et des flagelles. Inversement, chez les souches de *E. coli* non pathogènes, l'activation du système à deux composants EnvZ/OmpR entraîne la répression de l'expression des flagelles (Oshima *et al.*, 2002; Pruss, 1998; Shin and Park, 1995). Cette différence de régulation, qui chez la souche AIEC LF82 permet la synthèse coordonnée des flagelles et des pili de type 1, est un exemple d'adaptation de la régulation d'expression de facteurs bactériens impliqués dans l'interaction bactérie/hôte.

De plus, de forts taux d'anticorps anti-OmpC sont mesurés chez les patients généralement atteints des formes sévères de MC à localisation iléale (Landers *et al.*, 2002; Mei *et al.*, 2006; Mow *et al.*, 2004a) et également chez les patients porteurs d'une mutation *NOD2* associée à la



MC (Devlin *et al.*, 2007; Papadakis *et al.*, 2007). Cette association entre le taux d'anticorps anti-OmpC de *E. coli* et les mutations du récepteur cytoplasmique de l'immunité innée NOD2, conduisant à une incapacité à contrôler la réplication intracellulaire de bactéries invasives, renforce l'hypothèse de l'implication de souches de *E. coli* invasives dans l'étiologie de la MC. Il serait donc intéressant de rechercher une corrélation entre la colonisation de la muqueuse intestinale par les souches AIEC, la présence d'anticorps anti-OmpC et la présence de mutations dans le gène *NOD2* chez des patients atteints de MC, comparativement à des sujets contrôles.

De nombreux exemples dans la bibliographie montrent l'implication du second messager bactérien le **di-guanosine monophosphate cyclique** (di-GMPc) dans la régulation de l'expression des flagelles et de structures fimbriales comme les curli chez *E. coli* (Pesavento *et al.*, 2008). Nous avons analysé cette voie de régulation chez la souche AIEC LF82, en étudiant le comportement du mutant LF82 invalidé dans le gène codant le facteur sigma FliA, régulateur clé contrôlant l'expression des gènes de classe III du régulon flagellaire, à savoir ceux codant FliC, la protéine majeure des flagelles, et ceux impliqués dans le chimiotactisme. Une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la voie dépendante du di-GMPc a été observée chez les mutants *yhjH* et *ycgR*. Ces deux gènes codent respectivement une phosphodiesterase à domaine EAL et le récepteur au di-GMPc à domaine PilZ qui interviennent dans la dégradation et l'activité effectrice du di-GMPc. Ainsi, FliA régulerait non seulement l'expression des flagelles mais aussi en parallèle la voie du di-GMPc *via* son action sur l'expression du gène *yhjH*. La diminution d'expression de la phosphodiesterase YhjH conduirait à une augmentation de la concentration intracellulaire en di-GMPc ayant un impact négatif sur l'expression de pili de type 1 et les facteurs de colonisation en général. Le rôle de YcgR en tant qu'inhibiteur de ce processus a récemment été décrit chez *Salmonella* et *E. coli* par Paul *et al.* (Paul *et al.* 2010). Le complexe di-GMPc/YcgR fixerait les sous unités FliM et FliG en entraînant le blocage du moteur flagellaire. Des expériences d'immunoprécipitation permettraient de confirmer l'existence d'un mécanisme similaire chez les AIEC.

La régulation dépendante de la concentration en di-GMPc dans la souche AIEC LF82 représente un nouvel exemple de contrôle de l'expression de gènes de virulence chez des bactéries pathogènes ou opportunistes (Hisert *et al.*, 2005; Kader *et al.*, 2006; Kulasakara *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007; Tamayo *et al.*, 2005). Il serait intéressant de mesurer les taux de di-GMPc cytosoliques dans différentes conditions, par exemple au contact de cellules



épithéliales intestinales ou dans des modèles animaux de colonisation de muqueuse intestinale *in vivo*, afin d'identifier les stimuli permettant la régulation de la synthèse ou de la dégradation du di-GMPc. Ces dosages sont réalisables par des techniques très sensibles de chromatographie couplée à la spectrophotométrie de masse récemment mises au point pour le dosage de cette molécule (Spangler *et al.*).

Cependant, la théorie d'une séquestration temporelle et/ou spatiale du second messager laisse supposer une action spécifique des différentes di-guanylate cyclases et phosphodiesterases. Or, lors de l'étude du rôle du di-GMPc, nous nous sommes intéressés à l'implication de seulement trois enzymes : deux phosphodiesterases YhjH et YahA et la di-guanylate cyclase YaiC. D'autres gènes codant des protéines à domaine EAL (9 gènes), GGDEF (11 gènes) ou les deux (6 gènes) sont présents dans le génome de la souche AIEC LF82 et pourraient également moduler la concentration intracellulaire en di-GMPc. Une étude portant sur ces différents gènes permettrait une analyse plus poussée de leur d'une spécificité d'expression en fonction des différents stades du processus de colonisation. De plus, trois des phosphodiesterases et une des di-guanylate cyclases présentes chez la souche non pathogène MG1655 ne sont pas retrouvées chez la souche AIEC LF82. Ainsi, la question reste posée de savoir si l'expression de ces trois gènes par la souche AIEC LF82, comparativement à la souche non pathogène MG1655, permettrait de moduler positivement ou négativement la virulence.

Un autre aspect de l'adaptation d'une souche pathogène à son environnement, et peut-être encore plus d'une souche opportuniste, est la présence de **mutations pathoadaptatives**. Différentes substitutions et/ou additions d'acides aminés ont été mises en évidence dans divers facteurs de virulence précédemment caractérisés chez la souche AIEC LF82 par comparaison avec les souches de *E. coli* non pathogènes. Les séquences nucléotidiques *ompA*<sub>LF82</sub> et *fimH*<sub>LF82</sub>, codant deux principales adhésines (Boudeau *et al.*, ; Rolhion, 2010) présentent respectivement 97% et 99% d'identité avec celles de la souche de *E. coli* K-12 MG1655. Il faut noter que les autres gènes codant des protéines impliquées dans l'interaction des bactéries avec les cellules hôtes telles que YfgL et OmpC, présentent également 98% et 91% d'identité avec ceux de la souche de *E. coli* K-12 MG1655. Au niveau protéique, l'ensemble de ces variations se traduit par différentes substitutions d'acides aminés. L'adhésine FimH de la souche AIEC LF82 présente quatre substitutions d'acides aminés par rapport à l'adhésine FimH exprimée par *E. coli* K-12 MG1655 non pathogène (V27A ; N70S ; S78N et T158P). La mutation A27V a été décrite comme une mutation pathoadaptative chez



les UPEC de groupe phylogénétique B2 (Hommais *et al.*, 2003). La mutation T158P, localisée dans le bras flexible de FimH (entre les domaines piline et lectine), pourrait influencer le mécanisme de « catch bond » important dans l'association adhésine/récepteur en conditions de forces de cisaillement (Thomas *et al.*, 2002). Les formes variantes des différents facteurs de virulence des souches AIEC doivent jouer un rôle central dans l'évolution adaptative des AIEC aux conditions physiologiques intestinales et à l'interaction des bactéries avec la muqueuse intestinale. D'ailleurs, la présence simultanée des quatre substitutions dans FimH permet *in vitro* une meilleure adhésion des souches AIEC aux cellules épithéliales intestinales (Travaux en cours). De plus, il a été montré que l'expression de pili de type 1 variants par les AIEC permet une meilleure colonisation de l'épithélium intestinal suite à une interaction de forte affinité avec le récepteur CEACAM6 (Barnich *et al.*, 2007). Afin de caractériser le rôle de chaque mutation, une approche par mutagenèse dirigée est envisagée et nous nous proposons de tester l'adhésion des variants à des cellules épithéliales intestinales avec une application de flux assimilé au péristaltisme, ce qui permettrait d'évaluer l'implication des différentes mutations dans la fonction des pili de type 1 exprimé par les AIEC.

Nous avons montré que les bactéries AIEC présentes dans la lumière intestinale régulent l'expression des flagelles et des pili de type 1 de façon spécifique. Cette adaptation de la régulation leur conférerait un avantage par rapport à la flore commensale (Stecher *et al.*, 2008). En effet, l'hyper-flagellation pourrait rendre les bactéries AIEC hyper-mobiles (Rolhion *et al.*, 2007) ce qui faciliterait l'accès à la barrière épithéliale intestinale et donc l'interaction avec différentes protéines telles que le récepteur CEACAM6 (Barnich *et al.*, 2007). Au contact des cellules, nos résultats suggèrent que les bactéries n'exprimeraient plus de flagelles mais resteraient hyper-piliées grâce à la levée de l'inhibition faisant intervenir la protéine Fis (Miquel *et al.*). La répression de l'expression des flagelles permettrait de limiter l'induction de la réponse inflammatoire *via* TLR5 et/ou IPAF tandis que le haut niveau d'expression de pili de type 1 expliquerait la forte colonisation iléale chez les patients atteints de MC surexprimant la protéine CEACAM6.

Mon travail de thèse a eu pour objectif d'acquérir des données fondamentales permettant d'approfondir les connaissances sur les mécanismes d'adaptation des souches AIEC aux conditions du tractus intestinal. Les données recueillies devraient permettre à terme de concevoir des stratégies thérapeutiques innovantes ciblant spécifiquement la prévention du



pouvoir pathogène des AIEC chez les patients atteints de MC. La souche AIEC LF82 présente une forte régulation positive de l'expression des pili de type 1 dans les premières étapes d'adhésion aux entérocytes par rapport à une souche non pathogène de type K-12. Par conséquent, les pili de type 1 pourraient représenter une très bonne cible thérapeutique. Pour cela, différentes stratégies peuvent être envisagées afin de limiter l'interaction bactérie/cellule hôte :

- l'utilisation de levures ou d'extraits de levures riches en résidus mannose en tant que probiotiques entrant en compétition avec le récepteur CEACAM6, surexprimé chez les patient, pour l'interaction avec les bactéries.

- l'utilisation d'une souche bactérienne non pathogène, *E. coli* Nissle 1917, en tant que probiotique car elle présente des effets inhibiteurs sur les capacités d'adhésion et d'invasion des souches AIEC *in vitro* (Boudeau *et al.*, 2003).

- la mise au point d'un vaccin basé sur l'adhésine FimH. Ce type de vaccin a déjà montré son efficacité lors d'infections de la muqueuse uro-génitale par *E. coli* chez l'animal (Langermann *et al.*, 1997; Langermann *et al.*, 2000; Poggio *et al.*, 2006; Thankavel *et al.*, 1997).

- le blocage de l'assemblage des pili de type 1, et donc de l'adhésion des bactéries à la muqueuse intestinale, par l'utilisation des pilicides (Hedenstrom *et al.*, 2005; Svensson *et al.*, 2000).

Une autre cible moléculaire pourrait être le di-GMPc pour limiter la virulence des AIEC et contrôler les infections à AIEC chez les patients MC. Il s'agit d'une molécule exclusivement produite par les procaryotes mais qui peut toutefois avoir des impacts sur les cellules eucaryotes. En effet, il a été montré que le di-GMPc pouvait favoriser la réponse immunitaire et être utilisé à des fins immunothérapeutiques, immunoprophylactiques ou comme adjuvant lors de vaccination afin d'inhiber les infections (Chen *et al.*).

En conclusion, il existe une co-évolution hôte/pathogène favorisant l'émergence de la MC. Ce travail a permis de mieux caractériser le processus infectieux mis en place par les AIEC et notamment de montrer comment la régulation de l'expression de facteurs de virulence favorise leur adaptation aux conditions du tractus intestinal. De plus, l'étude du génome de la souche AIEC de référence LF82 a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques spécifiques de cette souche. Il est vraisemblable que certains facteurs spécifiques soient des facteurs de virulence. L'étude de leur rôle et de leur prévalence permettra de définir de nouvelles cibles et outils thérapeutiques.



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

- (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**: 661-678.
- Abe, J., Onimaru, M., Matsumoto, S., Noma, S., Baba, K., Ito, Y., Kohsaka, T., and Takeda, T. (1997) Clinical role for a superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *J Clin Invest* **99**: 1823-1830.
- Abraham, C., and Cho, J.H. (2007) Bugging of the intestinal mucosa. *N Engl J Med* **357**: 708-710.
- Adam, T., Arpin, M., Prevost, M.C., Gounon, P., and Sansonetti, P.J. (1995) Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* **129**: 367-381.
- Afzal, M.A., Minor, P.D., Begley, J., Bentley, M.L., Armitage, E., Ghosh, S., and Ferguson, A. (1998) Absence of measles-virus genome in inflammatory bowel disease. *Lancet* **351**: 646-647.
- Aldridge, P., and Hughes, K.T. (2002) Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**: 160-165.
- Aloni, Y., Delmer, D.P., and Benziman, M. (1982) Achievement of high rates of *in vitro* synthesis of 1,4-beta-D-glucan: activation by cooperative interaction of the *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, polyethylene glycol, and a protein factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 6448-6452.
- Alpern J., S.M., Sitaraman S., Rutherford R., Olejeme H., Cai Q., Klapproth J. (2006) Invasive *E. coli* strains are increased in Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**: A-362.
- Ambrose, N.S., Johnson, M., Burdon, D.W., and Keighley, M.R. (1984) Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery. *Br J Surg* **71**: 623-625.
- Ambrose, N.S., Allan, R.N., Keighley, M.R., Burdon, D.W., Youngs, D., Barnes, P., and Lennard-Jones, J.E. (1985) Antibiotic therapy for treatment in relapse of intestinal Crohn's disease. A prospective randomized study. *Dis Colon Rectum* **28**: 81-85.
- Amer, A.O., and Swanson, M.S. (2005) Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **7**: 765-778.
- Amikam, D., and Galperin, M.Y. (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3-6.
- Arbibe, L., Kim, D.W., Batsche, E., Pedron, T., Mateescu, B., Muchardt, C., Parsot, C., and Sansonetti, P.J. (2007) An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat Immunol* **8**: 47-56.
- Arikawa, K., Meraz, I.M., Nishikawa, Y., Ogasawara, J., and Hase, A. (2005) Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with diffusely adherent *Escherichia coli* possessing Afa adhesin-coding genes. *Microbiol Immunol* **49**: 493-503.
- Arnold, G.L., Beaves, M.R., Pryjdu, V.O., and Mook, W.J. (2002) Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **8**: 10-15.
- Arnott, I.D., McNeill, G., and Satsangi, J. (2003) An analysis of factors influencing short-term and sustained response to infliximab treatment for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **17**: 1451-1457.
- Arnott, I.D., Nimmo, E.R., Drummond, H.E., Fennell, J., Smith, B.R., MacKinlay, E., Morecroft, J., Anderson, N., Kelleher, D., O'Sullivan, M., McManus, R., and Satsangi, J. (2004) NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* **5**: 417-425.
- Aschtgen, M.S., Bernard, C.S., De Bentzmann, S., Llobes, R., and Cascales, E. (2008) SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 7523-7531.
- Atlung, T., and Ingmer, H. (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* **24**: 7-17.
- Auner, H., Buckle, M., Deufel, A., Kutateladze, T., Lazarus, L., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pemberton, I., Schneider, R., and Travers, A. (2003) Mechanism of transcriptional activation by FIS: role of core promoter structure and DNA topology. *J Mol Biol* **331**: 331-344.
- Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Löffler, T., Buchler, M.W., and Schmidt, J. (2005) High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* **54**: 944-949.

- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**: 1915-1920.
- Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., G, D.H., Carbonez, A., and Rutgeerts, P. (2003) Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* **348**: 601-608.
- Bai, M., Katsanos, K.H., Economou, M., Kamina, S., Balli, C., Briasoulis, E., Kappas, A.M., Agnantis, N., and Tsianos, E.V. (2006) Rectal Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's lymphoma in a patient with Crohn's disease: case report and review of the literature. *Scand J Gastroenterol* **41**: 866-869.
- Ball, C.A., Osuna, R., Ferguson, K.C., and Johnson, R.C. (1992) Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 8043-8056.
- Barends, T.R., Hartmann, E., Griese, J.J., Beitlich, T., Kirienko, N.V., Ryjenkov, D.A., Reinstein, J., Shoeman, R.L., Gomelsky, M., and Schlichting, I. (2009) Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459**: 1015-1018.
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003) Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* **48**: 781-794.
- Barnich, N., Bringer, M.A., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2004) Involvement of lipoprotein NlpI in the virulence of adherent invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* **72**: 2484-2493.
- Barnich, N., Aguirre, J.E., Reinecker, H.C., Xavier, R., and Podolsky, D.K. (2005) Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* **170**: 21-26.
- Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) CEACAM6 as receptor of Adherent-Invasive *Escherichia coli* supports ileal mucosa colonization in Crohn's disease patients. *the Journal of Clinical Investigation* **sous presse**.
- Barreau, F., Meinzer, U., Chareyre, F., Berrebi, D., Niwa-Kawakita, M., Dussailant, M., Foligne, B., Ollendorff, V., Heyman, M., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T., Sterkers, G., Giovannini, M., and Hugot, J.P. (2007) CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS ONE* **2**: e523.
- Barrett, B., Ebah, L., and Roberts, I.S. (2002) Genomic structure of capsular determinants. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**: 137-155.
- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, L.W., Green, T., Griffiths, A.M., Kistner, E.O., Murtha, M.T., Regueiro, M.D., Rotter, J.I., Schumm, L.P., Steinhart, A.H., Targan, S.R., Xavier, R.J., Libioulle, C., Sandor, C., Lathrop, M., Belaiche, J., Dewit, O., Gut, I., Heath, S., Laukens, D., Mni, M., Rutgeerts, P., Van Gossum, A., Zelenika, D., Franchimont, D., Hugot, J.P., de Vos, M., Vermeire, S., Louis, E., Cardon, L.R., Anderson, C.A., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Fisher, S.A., Marchini, J., Ghori, J., Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, C.G., Parkes, M., Georges, M., and Daly, M.J. (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* **40**: 955-962.
- Basle, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T. (2006) Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J Mol Biol* **362**: 933-942.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., and Simpson, K.W. (2007) Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J* **1**: 403-418.
- Baumler, A.J., Kusters, J.G., Stojiljkovic, I., and Heffron, F. (1994) *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect Immun* **62**: 1623-1630.
- Baumler, A.J., Tsolis, R.M., and Heffron, F. (1996a) Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**: 1862-1865.
- Baumler, A.J., Tsolis, R.M., and Heffron, F. (1996b) The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 279-283.
- Beaven, S.W., and Abreu, M.T. (2004) Biomarkers in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* **20**: 318-327.

- Benach, J., Swaminathan, S.S., Tamayo, R., Handelman, S.K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J.E., Forouhar, F., Neely, H., Seetharaman, J., Camilli, A., and Hunt, J.F. (2007) The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *Embo J* **26**: 5153-5166.
- Benevides, J.M., Danahy, J., Kawakami, J., and Thomas, G.J., Jr. (2008) Mechanisms of specific and nonspecific binding of architectural proteins in prokaryotic gene regulation. *Biochemistry* **47**: 3855-3862.
- Berg, R.D. (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* **4**: 430-435.
- Bernal, A., Ear, U., and Kyrpides, N. (2001) Genomes OnLine Database (GOLD): a monitor of genome projects world-wide. *Nucleic Acids Res* **29**: 126-127.
- Bernardini, M.L., Fontaine, A., and Sansonetti, P.J. (1990) The two-component regulatory system ompR-envZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **172**: 6274-6281.
- Bernstein, C.N., Wang, M.H., Sargent, M., Brant, S.R., and Collins, M.T. (2007) Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* **45**: 968-971.
- Betis, F., Brest, P., Hofman, V., Guignot, J., Bernet-Camard, M.F., Rossi, B., Servin, A., and Hofman, P. (2003) The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infect Immun* **71**: 1068-1074.
- Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2005) IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med* **201**: 169-171.
- Beveridge, T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**: 4725-4733.
- Binder, V., and Orholm, M. (1996) Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth J Med* **48**: 53-56.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* **11**: 3-8.
- Birrenbach, T., and Bocker, U. (2004) Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* **10**: 848-859.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Blichfeldt, P., Blomhoff, J.P., Myhre, E., and Gjone, E. (1978) Metronidazole in Crohn's disease. A double blind cross-over clinical trial. *Scand J Gastroenterol* **13**: 123-127.
- Blomfield, I.C., Calie, P.J., Eberhardt, K.J., McClain, M.S., and Eisenstein, B.I. (1993) Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**: 27-36.
- Blomfield, I.C., Kulasekara, D.H., and Eisenstein, B.I. (1997) Integration host factor stimulates both FimB- and FimE-mediated site-specific DNA inversion that controls phase variation of type 1 fimbriae expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **23**: 705-717.
- Boirivant, M., Fuss, I.J., Chu, A., and Strober, W. (1998) Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* **188**: 1929-1939.
- Borenshtein, D., Nambiar, P.R., Groff, E.B., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2007) Development of Fatal Colitis in FVB Mice Infected with *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **75**: 3271-3281.
- Borody, T.J., Leis, S., Warren, E.F., and Surace, R. (2002) Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy--approaching a cure? *Dig Liver Dis* **34**: 29-38.
- Bossuyt, X. (2006) Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* **52**: 171-181.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999) Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* **67**: 4499-4509.
- Boudeau, J., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2001) Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* **39**: 1272-1284.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Julien, S., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2003) Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **18**: 45-56.

- Bouma, G., and Strober, W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **3**: 521-533.
- Bourret, R.B., and Stock, A.M. (2002) Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **277**: 9625-9628.
- Bower, J.M., Eto, D.S., and Mulvey, M.A. (2005) Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* **6**: 18-31.
- Braaten, B.A., Platko, J.V., van der Woude, M.W., Simons, B.H., de Graaf, F.K., Calvo, J.M., and Low, D.A. (1992) Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* pili operons in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4250-4254.
- Brand, S., Staudinger, T., Schnitzler, F., Pfennig, S., Hofbauer, K., Dambacher, J., Seiderer, J., Tillack, C., Konrad, A., Crispin, A., Goke, B., Lohse, P., and Ochsenkuhn, T. (2005) The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 645-652.
- Breese, E.J., Michie, C.A., Nicholls, S.W., Murch, S.H., Williams, C.B., Domizio, P., Walker-Smith, J.A., and MacDonald, T.T. (1994) Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **106**: 1455-1466.
- Bringer, M.A., Barnich, N., Glasser, A.L., Bardot, O., and Darfeuille-Michaud, A. (2005) HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* **73**: 712-721.
- Bringer, M.A., Glasser, A.L., Tung, C.H., Meresse, S., and Darfeuille-Michaud, A. (2006) The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol* **8**: 471-484.
- Bringer, M.A., Rolhion, N., Glasser, A.L., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing. *J Bacteriol* **189**: 4860-4871.
- Brinkman, A.B., Ettema, T.J., de Vos, W.M., and van der Oost, J. (2003) The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol* **48**: 287-294.
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C., and Landini, P. (2006) Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol* **188**: 2027-2037.
- Bronowski, C., Smith, S.L., Yokota, K., Corkill, J.E., Martin, H.M., Campbell, B.J., Rhodes, J.M., Hart, C.A., and Winstanley, C. (2008) A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. *Microbiology* **154**: 571-583.
- Brown, P.N., Terrazas, M., Paul, K., and Blair, D.F. (2007) Mutational analysis of the flagellar protein FliG: sites of interaction with FliM and implications for organization of the switch complex. *J Bacteriol* **189**: 305-312.
- Brzuszkiewicz, E., Bruggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., Gottschalk, G., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2006) How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12879-12884.
- Burich, A., Hershberg, R., Waggle, K., Zeng, W., Brabb, T., Westrich, G., Viney, J.L., and Maggio-Price, L. (2001) *Helicobacter*-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**: G764-778.
- Burke, D.A., and Axon, A.T. (1988) Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *Bmj* **297**: 102-104.
- Burns, L.S., Smith, S.G., and Dorman, C.J. (2000) Interaction of the FimB integrase with the *fimS* invertible DNA element in *Escherichia coli* *in vivo* and *in vitro*. *J Bacteriol* **182**: 2953-2959.
- 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., and 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.
- Cahill, R.J., Foltz, C.J., Fox, J.G., Dangler, C.A., Powrie, F., and Schauer, D.B. (1997) Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* **65**: 3126-3131.
- Cai, S.J., and Inouye, M. (2002) EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 24155-24161.

- Camacho-Carranza, R., Membrillo-Hernandez, J., Ramirez-Santos, J., Castro-Dorantes, J., Chagoya de Sanchez, V., and Gomez-Eichelmann, M.C. (1995) Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **177**: 3619-3622.
- Cario, E., and Podolsky, D.K. (2000) Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68**: 7010-7017.
- Cario, E. (2005) Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**: 1182-1193.
- Cartun, R.W., Van Kruiningen, H.J., Pedersen, C.A., and Berman, M.M. (1993) An immunocytochemical search for infectious agents in Crohn's disease. *Mod Pathol* **6**: 212-219.
- Carvalho, F.A., Barnich, N., Sauvanet, P., Darcha, C., Gelot, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2008) Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon *via* signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis* **14**: 1051-1060.
- Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C.H., Stanners, C.P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009) Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* **206**: 2179-2189.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U., and Schirmer, T. (2004) Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17084-17089.
- Chen, S.L., Hung, C.S., Xu, J., Reigstad, C.S., Magrini, V., Sabo, A., Blasiar, D., Bieri, T., Meyer, R.R., Ozersky, P., Armstrong, J.R., Fulton, R.S., Latreille, J.P., Spieth, J., Hooton, T.M., Mardis, E.R., Hultgren, S.J., and Gordon, J.I. (2006) Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5977-5982.
- Chen, W., Kuolee, R., and Yan, H. The potential of 3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) as an effective vaccine adjuvant. *Vaccine* **28**: 3080-3085.
- Chen, W., Li, D., Paulus, B., Wilson, I., and Chadwick, V.S. (2000) Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* **15**: 1145-1150.
- Chiba, M., Fukushima, T., Inoue, S., Horie, Y., Iizuka, M., and Masamune, O. (1998) *Listeria monocytogenes* in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **33**: 430-434.
- Chin, E.Y., Dangler, C.A., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2000) *Helicobacter hepaticus* infection triggers inflammatory bowel disease in T cell receptor alphabeta mutant mice. *Comp Med* **50**: 586-594.
- Chiodini, R.J. (1989) Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* **2**: 90-117.
- Chow, J., and Mazmanian, S.K. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe* **7**: 265-276.
- Christen, M., Christen, B., Allan, M.G., Folcher, M., Jenö, P., Grzesiek, S., and Jenal, U. (2007) DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4112-4117.
- Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**: 33275-33283.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4555-4558.
- Colgan, J., and Rothman, P. (2006) All in the family: IL-27 suppression of T(H)-17 cells. *Nat Immunol* **7**: 899-901.
- Collier-Hyams, L.S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A.D., Bao, Z.Q., Chen, H., Madara, J.L., Orth, K., and Neish, A.S. (2002) Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* **169**: 2846-2850.
- Colombel, J.F., and Mesnard, B. (1993) Maladie de Crohn. In : Editions Techniques, Encycl. Med.Chir. (Paris, France). *Gastroentérologie*, **9-057-G10**: 1-15.
- Colombel, J.F., Grandbastien, B., Gower-Rousseau, C., Plegat, S., Evrard, J.P., Dupas, J.L., Gendre, J.P., Modigliani, R., Belaiche, J., Hostein, J., Hugot, J.P., van Kruiningen, H., and Cortot, A. (1996) Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* **111**: 604-607.
- Colombel, J.F., Lemann, M., Cassagnou, M., Bouhnik, Y., Duclos, B., Dupas, J.L., Nottoghem, B., and Mary, J.Y. (1999) A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of

- active Crohn's disease. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID). *Am J Gastroenterol* **94**: 674-678.
- Colombel, J.F., Cortot, A., and van Kruiningen, H.J. (2001) Antibiotics in Crohn's disease. *Gut* **48**: 647.
- Conte, M.P., Schippa, S., Zamboni, I., Penta, M., Chiarini, F., Seganti, L., Osborn, J., Falconieri, P., Borrelli, O., and Cucchiara, S. (2006) Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **55**: 1760-1767.
- Corcoran, C.P., and Dorman, C.J. (2009) DNA relaxation-dependent phase biasing of the *fim* genetic switch in *Escherichia coli* depends on the interplay of H-NS, IHF and LRP. *Mol Microbiol* **74**: 1071-1082.
- Cortot, A. (1993) [Has ileo-anal anastomosis modified the pattern of operated patients?]. *Ann Chir* **47**: 952-955.
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., and Gendre, J.P. (2001) Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* **120**: 1093-1099.
- Cosnes, J., Nion-Larmurier, I., Afchain, P., Beaugerie, L., and Gendre, J.P. (2004) Gender differences in the response of colitis to smoking. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2**: 41-48.
- Cotter, P.A., and Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**: 17-23.
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., and Rosenbusch, J.P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**: 727-733.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (2000) Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med* **67**: 263-268.
- Crost, C., Garrivier, A., Harel, J., and Martin, C. (2003) Leucine-responsive regulatory protein-mediated repression of *clp* (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 1886-1894.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**: 26-38.
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G.D., and Calvo, J.M. (1995) A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J Bacteriol* **177**: 4872-4880.
- Dailey, F.E., and Berg, H.C. (1993) Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1043-1047.
- Daly, M.J., Pearce, A.V., Farwell, L., Fisher, S.A., Latiano, A., Prescott, N.J., Forbes, A., Mansfield, J., Sanderson, J., Langelier, D., Cohen, A., Bitton, A., Wild, G., Lewis, C.M., Annese, V., Mathew, C.G., and Rioux, J.D. (2005) Association of DLG5 R30Q variant with inflammatory bowel disease. *Eur J Hum Genet* **13**: 835-839.
- Dalziel, T.K. (1989) Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. *Dis Colon Rectum* **32**: 1076-1078.
- Dame, R.T., and Goosen, N. (2002) HU: promoting or counteracting DNA compaction? *FEBS Lett* **529**: 151-156.
- Dame, R.T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R., and Goosen, N. (2002) Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J Biol Chem* **277**: 2146-2150.
- Dame, R.T., Luijsterburg, M.S., Krin, E., Bertin, P.N., Wagner, R., and Wuite, G.J. (2005) DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J Bacteriol* **187**: 1845-1848.
- Dame, R.T., Noom, M.C., and Wuite, G.J. (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**: 387-390.
- Danese, S., Sans, M., and Fiocchi, C. (2004) Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* **3**: 394-400.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**: 1405-1413.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., Bringer, M.A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.F. (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**: 412-421.
- Daszak, P., Purcell, M., Lewin, J., Dhillon, A.P., Pounder, R.E., and Wakefield, A.J. (1997) Detection and comparative analysis of persistent measles virus infection in Crohn's disease by immunogold electron microscopy. *J Clin Pathol* **50**: 299-304.

- Davidson, I.W., Lloyd, R.S., Whorwell, P.J., and Wright, R. (1979) Antibodies to maize in patients with Crohn's disease, ulcerative colitis and coeliac disease. *Clin Exp Immunol* **35**: 147-148.
- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R., Driessen, C., Rammensee, H.G., and Stevanovic, S. (2005) Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7922-7927.
- Deretic, V. (2005) Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **26**: 523-528.
- Desreumaux, P., Brandt, E., Gambiez, L., Emilie, D., Geboes, K., Klein, O., Ectors, N., Cortot, A., Capron, M., and Colombel, J.F. (1997) Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* **113**: 118-126.
- Devlin, S.M., Yang, H., Ippoliti, A., Taylor, K.D., Landers, C.J., Su, X., Abreu, M.T., Papadakis, K.A., Vasiliauskas, E.A., Melmed, G.Y., Fleshner, P.R., Mei, L., Rotter, J.I., and Targan, S.R. (2007) NOD2 variants and antibody response to microbial antigens in Crohn's disease patients and their unaffected relatives. *Gastroenterology* **132**: 576-586.
- Dibb-Fuller, M.P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C.J., and Woodward, M.J. (1999) Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* **145**: 1023-1031.
- Dickinson, R.J., Varian, S.A., Axon, A.T., and Cooke, E.M. (1980) Increased incidence of faecal coliforms with *in vitro* adhesive and invasive properties in patients with ulcerative colitis. *Gut* **21**: 787-792.
- Dieleman, L.A., Arends, A., Tonkonogy, S.L., Goerres, M.S., Craft, D.W., Grenther, W., Sellon, R.K., Balish, E., and Sartor, R.B. (2000) *Helicobacter hepaticus* does not induce or potentiate colitis in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* **68**: 5107-5113.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**: 414-424.
- Dorman, C.J., and Higgins, C.F. (1987) Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J Bacteriol* **169**: 3840-3843.
- Dorman, C.J., and Porter, M.E. (1998) The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol Microbiol* **29**: 677-684.
- Dorman, C.J., and Deighan, P. (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 179-184.
- Dorman, C.J. (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**: 391-400.
- Dorman, C.J. (2009) Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv Appl Microbiol* **67**: 47-64.
- Dorman, C.J., and Corcoran, C.P. (2009) Bacterial DNA topology and infectious disease. *Nucleic Acids Res* **37**: 672-678.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A., Jr., and Progulsk-Fox, A. (2002) Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* **4**: 1-10.
- Dossett, L.A., White, L.M., Welch, D.C., Herline, A.J., Muldoon, R.L., Schwartz, D.A., and Wise, P.E. (2007) Small bowel adenocarcinoma complicating Crohn's disease: case series and review of the literature. *Am Surg* **73**: 1181-1187.
- Douglass, A., Cann, P., and MG., B. (2000) An open pilot study of antimicrobial therapy in patients with unresponsive Crohn's disease. *Gut* **46(suppl II)**: A11.
- Dudley, E.G., Thomson, N.R., Parkhill, J., Morin, N.P., and Nataro, J.P. (2006) Proteomic and microarray characterization of the *AggR* regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **61**: 1267-1282.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B., and Jenal, U. (2009) Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* **23**: 93-104.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L.W., Kistner, E.O., Schumm, L.P., Lee, A.T., Gregersen, P.K., Barmada, M.M., Rotter, J.I., Nicolae, D.L., and Cho, J.H. (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**: 1461-1463.
- Dupont, N., and Lafont, F. (2009) How autophagy regulates the host cell signaling associated with the postpartum bacteria cocoon experienced as a danger signal. *Autophagy* **5**: 1222-1223.

- Dutta, S., Iida, K., Takade, A., Meno, Y., Nair, G.B., and Yoshida, S. (2004) Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and *in vitro* effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol Immunol* **48**: 965-969.
- Dziva, F., and Stevens, M.P. (2008) Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol* **37**: 355-366.
- Eaves-Pyles, T., Allen, C.A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C.B., Eric Jezek, G., Islas-Islas, M., and Torres, A.G. (2007) *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol*.
- Eisenstein, B.I. (1981) Phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* is under transcriptional control. *Science* **214**: 337-339.
- Eisenstein, B.I., Sweet, D.S., Vaughn, V., and Friedman, D.I. (1987) Integration host factor is required for the DNA inversion that controls phase variation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6506-6510.
- El-Labany, S., Sohanpal, B.K., Lahooti, M., Akerman, R., and Blomfield, I.C. (2003) Distant cis-active sequences and sialic acid control the expression of *fimB* in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **49**: 1109-1118.
- Ellingson, J.L., Cheville, J.C., Brees, D., Miller, J.M., and Cheville, N.F. (2003) Absence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. *Clin Med Res* **1**: 217-226.
- Ellson, C.D., Davidson, K., Ferguson, G.J., O'Connor, R., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2006) Neutrophils from p40phox<sup>-/-</sup> mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J Exp Med* **203**: 1927-1937.
- Elsner, A., Kreikemeyer, B., Braun-Kiewnick, A., Spellerberg, B., Buttaro, B.A., and Podbielski, A. (2002) Involvement of Lsp, a member of the Lral-lipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalization. *Infect Immun* **70**: 4859-4869.
- Elson, C.O., Cong, Y., McCracken, V.J., Dimmitt, R.A., Lorenz, R.G., and Weaver, C.T. (2005) Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* **206**: 260-276.
- Enright, M.C., and Spratt, B.G. (1999) Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**: 482-487.
- Escobar-Paramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M.C., Andremont, A., Denamur, E., and Ruimy, R. (2004) Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5698-5700.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G., and Gualerzi, C.O. (1998) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *Embo J* **17**: 7033-7043.
- Falconi, M., Prosseda, G., Giangrossi, M., Beghetto, E., and Colonna, B. (2001) Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **42**: 439-452.
- Falk, R.J., and Jennette, J.C. (1988) Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* **318**: 1651-1657.
- Fang, F.C., and Rimsky, S. (2008) New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol* **11**: 113-120.
- Farrokhyar, F., Swarbrick, E.T., and Irvine, E.J. (2001) A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **36**: 2-15.
- Fass, E., and Groisman, E.A. (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**: 199-204.
- Favier, C., Neut, C., Mizon, C., Cortot, A., Colombel, J.F., and Mizon, J. (1997) Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **42**: 817-822.
- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyffer, G.E., Jemmi, T., Baumgartner, A., and Egger, M. (2007) *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **7**: 607-613.
- Fellermann, K., Stange, D.E., Schaeffeler, E., Schmalzl, H., Wehkamp, J., Bevins, C.L., Reinisch, W., Teml, A., Schwab, M., Lichter, P., Radlwimmer, B., and Stange, E.F. (2006) A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* **79**: 439-448.

- Ferrante, M., Henckaerts, L., Joossens, M., Pierik, M., Joossens, S., Dotan, N., Norman, G.L., Altstock, R.T., Van Steen, K., Rutgeerts, P., Van Assche, G., and Vermeire, S. (2007) New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* **56**: 1394-1403.
- Finlay, B.B., and Falkow, S. (1988) Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie* **70**: 1089-1099.
- Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T.L., and Solcia, E. (1999) Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* **188**: 220-226.
- Fleiszig, S.M., Arora, S.K., Van, R., and Ramphal, R. (2001) FlhA, a component of the flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithelial cells. *Infect Immun* **69**: 4931-4937.
- Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamaillard, M., Pot, B., Simonet, M., and Daniel, C. (2007) Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology* **133**: 862-874.
- Foltz, C.J., Fox, J.G., Cahill, R., Murphy, J.C., Yan, L., Shames, B., and Schauer, D.B. (1998) Spontaneous inflammatory bowel disease in multiple mutant mouse lines: association with colonization by *Helicobacter hepaticus*. *Helicobacter* **3**: 69-78.
- Forcione, D.G., Rosen, M.J., Kisiel, J.B., and Sands, B.E. (2004) Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut* **53**: 1117-1122.
- Forst, S., and Inouye, M. (1988) Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Cell Biol* **4**: 21-42.
- Fox, J.G., Yan, L., Shames, B., Campbell, J., Murphy, J.C., and Li, X. (1996) Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* **64**: 3673-3681.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Deviere, J., and Rutgeerts, P. (2004) Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**: 987-992.
- Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J., and Falkow, S. (1993) Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* **364**: 639-642.
- Franklin, C.L., Riley, L.K., Livingston, R.S., Beckwith, C.S., Besch-Williford, C.L., and Hook, R.R., Jr. (1998) Enterohepatic lesions in SCID mice infected with *Helicobacter bilis*. *Lab Anim Sci* **48**: 334-339.
- Freeman, H., and Noble, M. (2005) Lack of evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 782-783.
- Fujimori, S., Tatsuguchi, A., Gudis, K., Kishida, T., Mitsui, K., Ehara, A., Kobayashi, T., Sekita, Y., Seo, T., and Sakamoto, C. (2007) High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* **22**: 1199-1204.
- Fujita, H., Eishi, Y., Ishige, I., Saitoh, K., Takizawa, T., Arima, T., and Koike, M. (2002) Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* **37**: 509-516.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., and Koonin, E.V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 11-21.
- Gankema, H., Wensink, J., Guinee, P.A., Jansen, W.H., and Witholt, B. (1980) Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **29**: 704-713.
- Gent, A.E., Hellier, M.D., Grace, R.H., Swarbrick, E.T., and Coggon, D. (1994) Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* **343**: 766-767.
- Giaffer, M.H., Holdsworth, C.D., and Duerden, B.I. (1992) Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **33**: 646-650.
- Giampapa, C.S., Abraham, S.N., Chiang, T.M., and Beachey, E.H. (1988) Isolation and characterization of a receptor for type 1 fimbriae of *Escherichia coli* from guinea pig erythrocytes. *J Biol Chem* **263**: 5362-5367.

- Gionchetti, P., Rizzello, F., Lammers, K.M., Morselli, C., Sollazzi, L., Davies, S., Tambasco, R., Calabrese, C., and Campieri, M. (2006) Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **12**: 3306-3313.
- Girardin, S.E., Tournebize, R., Mavris, M., Page, A.L., Li, X., Stark, G.R., Bertin, J., DiStefano, P.S., Yaniv, M., Sansonetti, P.J., and Philpott, D.J. (2001) CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* **2**: 736-742.
- Girardin, S.E., Sansonetti, P.J., and Philpott, D.J. (2002) Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* **10**: 193-199.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**: 8869-8872.
- Girgis, H.S., Liu, Y., Ryu, W.S., and Tavazoie, S. (2007) A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet* **3**: 1644-1660.
- Giron, J.A., Torres, A.G., Freer, E., and Kaper, J.B. (2002) The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**: 361-379.
- Glasser, A.L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.H., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001) Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* **69**: 5529-5537.
- Glasser, A.L., Lapaquette, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009) [Impaired autophagy in Crohn's disease patients: an opened gate to invasive bacteria?]. *Med Sci (Paris)* **25**: 349-351.
- Goosen, N., and van de Putte, P. (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* **16**: 1-7.
- Gordon, D.M., Clermont, O., Tolley, H., and Denamur, E. (2008) Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* **10**: 2484-2496.
- Gorski, A., Kniotek, M., Perkowska-Ptasinska, A., Mroz, A., Przerwa, A., Gorczyca, W., Dabrowska, K., Weber-Dabrowska, B., and Nowaczyk, M. (2006) Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplant Proc* **38**: 331-333.
- Grassl, G.A., Kracht, M., Wiedemann, A., Hoffmann, E., Aepfelbacher, M., von Eichel-Streiber, C., Bohn, E., and Autenrieth, I.B. (2003) Activation of NF-kappaB and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol* **5**: 957-971.
- Greenstein, R.J. (2003) Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis* **3**: 507-514.
- Grenier, D., and Mayrand, D. (1987) Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* **55**: 111-117.
- Griffith, J.D. (1976) Visualization of prokaryotic DNA in a regularly condensed chromatin-like fiber. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 563-567.
- Gross, V., Andus, T., Leser, H.G., Roth, M., and Scholmerich, J. (1991) Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases. *Klin Wochenschr* **69**: 981-987.
- Grunert, F., Daniel, S., Nagel, G., von Kleist, S., and Jantschke, P. (1995) CD66b, CD66c and carcinoembryonic antigen (CEA) are independently regulated markers in sera of tumor patients. *Int J Cancer* **63**: 349-355.
- Grutzkau, A., Hanski, C., Hahn, H., and Riecken, E.O. (1990) Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**: 1011-1015.
- Guerry, P. (2007) Campylobacter flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* **15**: 456-461.
- Gui, G.P., Thomas, P.R., Tizard, M.L., Lake, J., Sanderson, J.D., and Hermon-Taylor, J. (1997) Two-year-outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **39**: 393-400.
- Guignot, J., and Servin, A. (2006) *Escherichia coli* entéro-virulents : récentes avancées. *Bull. Soc. Fr. Microbiol* **21**: 263-276.
- Guignot, J., Chaplais, C., Coconnier-Polter, M.H., and Servin, A.L. (2007) The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell Microbiol* **9**: 204-221.
- Gullberg, E., and Soderholm, J.D. (2006) Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1072**: 218-232.

- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., and Testoni, P.A. (2000) *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **45**: 1462-1464.
- Guslandi, M., Fanti, L., and Testoni, P.A. (2002) *Helicobacter pylori* seroprevalence in Crohn's disease: lack of influence by pharmacological treatment. *Hepatogastroenterology* **49**: 1296-1297.
- Hacker, J., Hochhut, B., Middendorf, B., Schneider, G., Buchrieser, C., Gottschalk, G., and Dobrindt, U. (2004) Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **293**: 453-461.
- Hadrich, I., Vandewalle, P., Cheikhrouhou, F., Makni, F., Krichen, M.S., Sendid, B., Standaert-Vitse, A., Ayadi, A., and Poulain, D. (2007) Ethnic and socio-cultural specificities in Tunisia have no impact on the prevalence of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in Crohn's disease patients, their relatives or associated clinical factors. *Scand J Gastroenterol* **42**: 717-725.
- Hafez, M., Hayes, K., Goldrick, M., Warhurst, G., Grecis, R., and Roberts, I.S. (2009) The K5 capsule of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is important in mediating interactions with intestinal epithelial cells and chemokine induction. *Infect Immun* **77**: 2995-3003.
- Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., and Jarnerot, G. (2003) Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* **124**: 1767-1773.
- Hall, M.N., and Silhavy, T.J. (1981) The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol* **146**: 23-43.
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., and Kontula, K. (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **12**: 3668-3672.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., Gunther, S., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Hasler, R., Sipos, B., Folsch, U.R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C.G., Krawczak, M., and Schreiber, S. (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* **39**: 207-211.
- Haraga, A., and Miller, S.I. (2003) A *Salmonella enterica* serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun* **71**: 4052-4058.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spottl, T., Andus, T., Scholmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., and Rogler, G. (2002) Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**: 1987-2000.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., and Shinagawa, H. (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**: 11-22.
- Hayden, J.D., and Ades, S.E. (2008) The extracytoplasmic stress factor, sigmaE, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS One* **3**: e1573.
- Hedenstrom, M., Emtenas, H., Pemberton, N., Aberg, V., Hultgren, S.J., Pinkner, J.S., Tegman, V., Almqvist, F., Sethson, I., and Kihlberg, J. (2005) NMR studies of interactions between periplasmic chaperones from uropathogenic *E. coli* and pilicides that interfere with chaperone function and pilus assembly. *Org Biomol Chem* **3**: 4193-4200.
- Hengen, P.N., Bartram, S.L., Stewart, L.E., and Schneider, T.D. (1997) Information analysis of Fis binding sites. *Nucleic Acids Res* **25**: 4994-5002.
- Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263-273.
- Hernday, A., Krabbe, M., Braaten, B., and Low, D. (2002) Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**: 16470-16476.
- Heyde, M., and Portalier, R. (1987) Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. *Mol Gen Genet* **208**: 511-517.
- Hickman, J.W., and Harwood, C.S. (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**: 376-389.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H.C., Nadeau, W.J., McCormick, B.A., and Podolsky, D.K. (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**: 993-1000.
- Hisert, K.B., MacCoss, M., Shiloh, M.U., Darwin, K.H., Singh, S., Jones, R.A., Ehrhart, S., Zhang, Z., Gaffney, B.L., Gandotra, S., Holden, D.W., Murray, D., and Nathan, C. (2005) A glutamate-

- alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* **56**: 1234-1245.
- Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Carniel, E., and Hacker, J. (2006) Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol* **61**: 584-595.
- Hoekstra, D., van der Laan, J.W., de Leij, L., and Witholt, B. (1976) Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **455**: 889-899.
- Holden, N., Blomfield, I.C., Uhlin, B.E., Totsika, M., Kulasekara, D.H., and Gally, D.L. (2007) Comparative analysis of FimB and FimE recombinase activity. *Microbiology* **153**: 4138-4149.
- Homewood, R., Gibbons, C.P., Richards, D., Lewis, A., Duane, P.D., and Griffiths, A.P. (2003) Ileitis due to *Yersinia pseudotuberculosis* in Crohn's disease. *J Infect* **47**: 328-332.
- Hommais, F., Gouriou, S., Amorin, C., Bui, H., Rahimy, M.C., Picard, B., and Denamur, E. (2003) The FimH A27V mutation is pathoadaptive for urovirulence in *Escherichia coli* B2 phylogenetic group isolates. *Infect Immun* **71**: 3619-3622.
- Horiuchi, S., Inagaki, Y., Okamura, N., Nakaya, R., and Yamamoto, N. (1992) Type 1 pili enhance the invasion of *Salmonella braenderup* and *Salmonella typhimurium* to HeLa cells. *Microbiol Immunol* **36**: 593-602.
- Horstman, A.L., and Kuehn, M.J. (2002) Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J Biol Chem* **277**: 32538-32545.
- Horvath, P., and Barrangou, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**: 167-170.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**: 547-549.
- Huang, S.H., Stins, M.F., and Kim, K.S. (2000) Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect* **2**: 1237-1244.
- Huebner, C., Ferguson, L.R., Han, D.Y., Philpott, M., Barclay, M.L., Gearry, R.B., McCulloch, A., Demmers, P.S., and Browning, B.L. (2009) Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 (NOD1) haplotypes and single nucleotide polymorphisms modify susceptibility to inflammatory bowel diseases in a New Zealand caucasian population: a case-control study. *BMC Res Notes* **2**: 52.
- 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., and Thomas, G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 599-603.
- Hugot, J.P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E., and Cezard, J.P. (2003a) Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362**: 2012-2015.
- Hugot, J.P., Cezard, J.P., Colombel, J.F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., Montague, S., Gassull, M., Christensen, S., Finkel, Y., Gower-Rousseau, C., Modigliani, R., Zouali, H., Lesage, S., Chamaillard, M., Macry, J., Thomas, G., and Victor, J.M. (2003b) Clustering of Crohn's disease within affected sibships. *Eur J Hum Genet* **11**: 179-184.
- Huijsdens, X.W., Linskens, R.K., Taspinar, H., Meuwissen, S.G., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and Savelkoul, P.H. (2003) *Listeria monocytogenes* and inflammatory bowel disease: detection of *Listeria* species in intestinal mucosal biopsies by real-time PCR. *Scand J Gastroenterol* **38**: 332-333.
- Humbert, P., Russell, S., and Richardson, H. (2003) Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays* **25**: 542-553.
- Hung, S.P., Baldi, P., and Hatfield, G.W. (2002) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of leucine-responsive regulatory protein. *J Biol Chem* **277**: 40309-40323.
- Iguchi, A., Thomson, N.R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M.A., Thurston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J., and Frankel, G. (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* **191**: 347-354.
- Iizuka, M., Nakagomi, O., Chiba, M., Ueda, S., and Masamune, O. (1995) Absence of measles virus in Crohn's disease. *Lancet* **345**: 199.

- Inohara, N., Ogura, Y., and Nunez, G. (2002) Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* **5**: 76-80.
- Inouye, M., Dutta, R., and Zhu, Y. (2003) In *Histidine Kinases in Signal Transduction*. Inouye, M., and Dutta, R. (ed). Inc., San Diego, CA: Academic Press, pp. 25–45.
- Isaacs, K., and Herfarth, H. (2008) Role of probiotic therapy in IBD. *Inflamm Bowel Dis* **14**: 1597-1605.
- Isaacs, K.L., and Sartor, R.B. (2004) Treatment of inflammatory bowel disease with antibiotics. *Gastroenterol Clin North Am* **33**: 335-345, x.
- Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006) The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**: 1121-1133.
- Iwakura, Y., and Ishigame, H. (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* **116**: 1218-1222.
- Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Jr., and Murphy, K.M. (1995) Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* **181**: 1755-1762.
- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X., and Brisse, S. (2008) Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**: 560.
- Jawhara, S., and Poulain, D. (2007) *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med Mycol*: 1-10.
- Jenal, U., and Malone, J. (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**: 385-407.
- Jenne, D.E., Tschopp, J., Ludemann, J., Utecht, B., and Gross, W.L. (1990) Wegener's autoantigen decoded. *Nature* **346**: 520.
- Jergens, A.E., Wilson-Welder, J.H., Dorn, A., Henderson, A., Liu, Z., Evans, R.B., Hostetter, J., and Wannemuehler, M.J. (2007) *Helicobacter bilis* triggers persistent immune reactivity to antigens derived from the commensal bacteria in gnotobiotic C3H/HeN mice. *Gut* **56**: 934-940.
- Jiang, H.Q., Kushnir, N., Thurnheer, M.C., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (2002) Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells. *Gastroenterology* **122**: 1346-1354.
- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P., and Chan, V.L. (2001) JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol* **39**: 1225-1236.
- Johnson, G.J., Cosnes, J., and Mansfield, J.C. (2005) Review article: smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **21**: 921-931.
- Johnson, J.R., Clermont, O., Menard, M., Kuskowski, M.A., Picard, B., and Denamur, E. (2006) Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *J Infect Dis* **194**: 1141-1150.
- Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S.J., Doetkott, C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Johnson, J.R., and Nolan, L.K. (2007) The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* **189**: 3228-3236.
- Joossens, S., Reinisch, W., Vermeire, S., Sendid, B., Poulain, D., Peeters, M., Geboes, K., Bossuyt, X., Vandewalle, P., Oberhuber, G., Vogelsang, H., Rutgeerts, P., and Colombel, J.F. (2002) The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* **122**: 1242-1247.
- Joossens, S., Colombel, J.F., Landers, C., Poulain, D., Geboes, K., Bossuyt, X., Targan, S., Rutgeerts, P., and Reinisch, W. (2006) Anti-outer membrane of porin C and anti-I2 antibodies in indeterminate colitis. *Gut* **55**: 1667-1669.
- Jordan, D.M., Cornick, N., Torres, A.G., Dean-Nystrom, E.A., Kaper, J.B., and Moon, H.W. (2004) Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 *in vivo*. *Infect Immun* **72**: 6168-6171.
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J.M., Lazzaroni, J.C., Lejeune, P., and Dorel, C. (2005) CpxR/OmpR interplay regulates *curli* gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 2038-2049.

- Juillerat, P., Mottet, C., Froehlich, F., Felley, C., Vader, J.P., Burnand, B., Gonvers, J.J., and Michetti, P. (2005) Extraintestinal manifestations of Crohn's disease. *Digestion* **71**: 31-36.
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., and Romling, U. (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **60**: 602-616.
- Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (1999) Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. *Microbiology* **145 (Pt 8)**: 2051-2060.
- Kallinowski, F., Wassmer, A., Hofmann, M.A., Harmsen, D., Heesemann, J., Karch, H., Herfarth, C., and Buhr, H.J. (1998) Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* **45**: 1552-1558.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.
- Kar, S., and Adhya, S. (2001) Recruitment of HU by piggyback: a special role of GalR in repressosome assembly. *Genes Dev* **15**: 2273-2281.
- Karlinger, K., Gyorke, T., Mako, E., Mester, A., and Tarjan, Z. (2000) The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* **35**: 154-167.
- Kato, S., Kowashi, Y., and Demuth, D.R. (2002) Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* **32**: 1-13.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**: 816-825.
- Keighley, M.R., Arabi, Y., Dimock, F., Burdon, D.W., Allan, R.N., and Alexander-Williams, J. (1978) Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut* **19**: 1099-1104.
- Keita, A.V., Salim, S.Y., Jiang, T., Yang, P.C., Franzen, L., Soderkvist, P., Magnusson, K.E., and Soderholm, J.D. (2008) Increased uptake of non-pathogenic *E. coli* via the follicle-associated epithelium in longstanding ileal Crohn's disease. *J Pathol* **215**: 135-144.
- Kelly, A., Goldberg, M.D., Carroll, R.K., Danino, V., Hinton, J.C., and Dorman, C.J. (2004) A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **150**: 2037-2053.
- Kelly, A., Conway, C., T, O.C., Smith, S.G., and Dorman, C.J. (2006) DNA supercoiling and the Lrp protein determine the directionality of fim switch DNA inversion in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **188**: 5356-5363.
- Kirsch, P., Jores, J., and Wieler, L.H. (2004) [Plasticity of bacterial genomes: pathogenicity islands and the locus of enterocyte effacement (LEE)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **117**: 116-129.
- Kleessen, B., Kroesen, A.J., Buhr, H.J., and Blaut, M. (2002) Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* **37**: 1034-1041.
- Klemm, P. (1986) Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Embo J* **5**: 1389-1393.
- Knoflach, P., Park, B.H., Cunningham, R., Weiser, M.M., and Albini, B. (1987) Serum antibodies to cow's milk proteins in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* **92**: 479-485.
- Ko, M., and Park, C. (2000) Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **303**: 371-382.
- Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R.A. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**: 731-734.
- Koch, C., and Kahmann, R. (1986) Purification and properties of the *Escherichia coli* host factor required for inversion of the G segment in bacteriophage Mu. *J Biol Chem* **261**: 15673-15678.
- Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sepehri, S., and Krause, D.O. (2006) High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*.
- Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sepehri, S., and Krause, D.O. (2007) High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**: 669-675.
- Krasteva, P.V., Fong, J.C., Shikuma, N.J., Beyhan, S., Navarro, M.V., Yildiz, F.H., and Sondermann, H. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* **327**: 866-868.
- Krogfelt, K.A. (1991) Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* **13**: 721-735.

- Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J.D., Daly, M.J., and Xavier, R.J. (2008) Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* **3**: e3391.
- Kucharzik, T., Maaser, C., Luger, A., Kagnoff, M., Mayer, L., Targan, S., and Domschke, W. (2006) Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 1068-1083.
- Kuehn, M.J., and Kesty, N.C. (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**: 2645-2655.
- Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D.G., Neely, A.N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ausubel, F.M., and Lory, S. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2839-2844.
- Kullberg, M.C., Ward, J.M., Gorelick, P.L., Caspar, P., Hieny, S., Cheever, A., Jankovic, D., and Sher, A. (1998) *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun* **66**: 5157-5166.
- Kulshina, N., Baird, N.J., and Ferre-D'Amare, A.R. (2009) Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1212-1217.
- Laffineur, G., Lescut, D., Vincent, P., Quandalle, P., Wurtz, A., and Colombel, J.F. (1992) [Bacterial translocation in Crohn disease]. *Gastroenterol Clin Biol* **16**: 777-781.
- Lahooti, M., Roesch, P.L., and Blomfield, I.C. (2005) Modulation of the sensitivity of FimB recombination to branched-chain amino acids and alanine in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **187**: 6273-6280.
- Lakatos, P.L., Szamosi, T., and Lakatos, L. (2007) Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol* **13**: 6134-6139.
- Lal, S., and Steinhart, A.H. (2006) Antibiotic therapy for Crohn's disease: a review. *Can J Gastroenterol* **20**: 651-655.
- Lambert, P.A. (1988) Enterobacteriaceae: composition, structure and function of the cell envelope. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **17**: 21S-34S.
- Lamps, L.W., Madhusudhan, K.T., Havens, J.M., Greenson, J.K., Bronner, M.P., Chiles, M.C., Dean, P.J., and Scott, M.A. (2003) Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Am J Surg Pathol* **27**: 220-227.
- Landers, C.J., Cohavy, O., Misra, R., Yang, H., Lin, Y.C., Braun, J., and 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.
- Lane, M.C., Simms, A.N., and Mobley, H.L. (2007) complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 5523-5533.
- Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J.S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C.H., and Hultgren, S.J. (1997) Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* **276**: 607-611.
- Langermann, S., Mollby, R., Burlein, J.E., Palaszynski, S.R., Auguste, C.G., DeFusco, A., Strouse, R., Schenerman, M.A., Hultgren, S.J., Pinkner, J.S., Winberg, J., Guldevall, L., Soderhall, M., Ishikawa, K., Normark, S., and Koenig, S. (2000) Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **181**: 774-778.
- Lapaquette, P., Glasser, A.L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* **12**: 99-113.
- Lashner, B.A., Shaheen, N.J., Hanauer, S.B., and Kirschner, B.S. (1993) Passive smoking is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease in children. *Am J Gastroenterol* **88**: 356-359.
- Latiano, A., Palmieri, O., Valvano, M.R., D'Inca, R., Cucchiara, S., Riegler, G., Staiano, A.M., Ardizzone, S., Accomando, S., de Angelis, G.L., Corritore, G., Bossa, F., and Annese, V. (2008) Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy. *World J Gastroenterol* **14**: 4643-4651.
- Latiano, A., Palmieri, O., Cucchiara, S., Castro, M., D'Inca, R., Guariso, G., Dallapiccola, B., Valvano, M.R., Latiano, T., Andriulli, A., and Annese, V. (2009) Polymorphism of the *IRGM* gene might predispose to fistulizing behavior in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **104**: 110-116.

- Lawrence, J.G., and Ochman, H. (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9413-9417.
- Le Bouguenec, C., and Servin, A.L. (2006) Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **256**: 185-194.
- Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P., and Denamur, E. (1998) *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol* **15**: 1685-1695.
- Lederman, E., C. Neut, P. Desreumaux, O. Klein, L. Gambiez, A. Cortot, P. Quandalle, J. F. Colombel (1997) Bacterial overgrowth in the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *gastroenterology* **112**: A1023.
- Lee, F.K., Morris, C., and Hackett, J. (2006) The *Salmonella enterica* serovar Typhi Vi capsule and self-association pili share controls on expression. *FEMS Microbiol Lett* **261**: 41-46.
- Lee, S.J., Gray, M.C., Zu, K., and Hewlett, E.L. (2005) Oligomeric behavior of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in solution. *Arch Biochem Biophys* **438**: 80-87.
- Leiper, K., Morris, A.I., and Rhodes, J.M. (2000) Open label trial of oral clarithromycin in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **14**: 801-806.
- Lepage, P., Seksik, P., Sutren, M., de la Cochetiere, M.F., Jian, R., Marteau, P., and Dore, J. (2005) Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 473-480.
- Lepage, P., Colombet, J., Marteau, P., Sime-Ngando, T., Dore, J., and Leclerc, M. (2008) Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* **57**: 424-425.
- Lerebours, E., Savoye, G., and Guedon, C. (2003) [Epidemiology and natural history of chronic inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Clin Biol* **27**: S76-80.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27-42.
- Liebert, C.A., Hall, R.M., and Summers, A.O. (1999) Transposon *Tn21*, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 507-522.
- Lim, B., Beyhan, S., and Yildiz, F.H. (2007) Regulation of *Vibrio* polysaccharide synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **189**: 717-729.
- Lim, S., Kim, B., Choi, H.S., Lee, Y., and Ryu, S. (2006) Fis is required for proper regulation of *ssaG* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* **41**: 33-42.
- Lindberg, E., Magnusson, K.E., Tysk, C., and Jarnerot, G. (1992) Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gut* **33**: 909-913.
- Liu, X., and Matsumura, P. (1994) The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol* **176**: 7345-7351.
- Liu, X., and Ferenci, T. (2001) An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation. *Microbiology* **147**: 2981-2989.
- Liu, Y., van Kruiningen, H.J., West, A.B., Cartun, R.W., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1995) Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* **108**: 1396-1404.
- Lloyd, A.L., Henderson, T.A., Vigil, P.D., and Mobley, H.L. (2009) Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *J Bacteriol* **191**: 3469-3481.
- Lodes, M.J., Cong, Y., Elson, C.O., Mohamath, R., Landers, C.J., Targan, S.R., Fort, M., and Hershberg, R.M. (2004) Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* **113**: 1296-1306.
- Lucchini, S., Liu, H., Jin, Q., Hinton, J.C., and Yu, J. (2005) Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun* **73**: 88-102.
- Macpherson, A., Khoo, U.Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J., and Bjarnason, I. (1996) Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* **38**: 365-375.
- Maeda, S., Hsu, L.C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., and Karin, M. (2005) *Nod2* mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **307**: 734-738.
- Main, J., McKenzie, H., Yeaman, G.R., Kerr, M.A., Robson, D., Pennington, C.R., and Parratt, D. (1988) Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *Bmj* **297**: 1105-1106.

- Man, S.M., Zhang, L., Day, A.S., Leach, S., and Mitchell, H. (2008) Detection of enterohepatic and gastric *helicobacter* species in fecal specimens of children with Crohn's disease. *Helicobacter* **13**: 234-238.
- Mangan, M.W., Lucchini, S., Danino, V., Croinin, T.O., Hinton, J.C., and Dorman, C.J. (2006) The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**: 1831-1847.
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., and Dore, J. (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**: 205-211.
- Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet* **11**: 181-190.
- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Dore, J., Pochart, P., and Seksik, P. (2004) Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 4**: 18-23.
- Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofo, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004) Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**: 80-93.
- Martinez-Jehanne, V., du Merle, L., Bernier-Febreau, C., Usein, C., Gassama-Sow, A., Wane, A.A., Gouali, M., Damian, M., Aidara-Kane, A., Germani, Y., Fontanet, A., Coddeville, B., Guerardel, Y., and Le Bouguenec, C. (2009) Role of deoxyribose catabolism in colonization of the murine intestine by pathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **77**: 1442-1450.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., Gonzalez-Huix, F., Lopez-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, L.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2009a) 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*.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J.E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., and Garcia-Gil, L.J. (2009b) Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* **9**: 202.
- Martinez-Wilson, H.F., Tamayo, R., Tischler, A.D., Lazinski, D.W., and Camilli, A. (2008) The vibrio cholerae hybrid sensor kinase VieS contributes to motility and biofilm regulation by altering the cyclic diguanylate level. *J Bacteriol* **190**: 6439-6447.
- Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S., and Hultgren, S.J. (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J* **19**: 2803-2812.
- Masseret, E., Boudeau, J., Colombel, J.F., Neut, C., Desreumaux, P., Joly, B., Cortot, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2001) Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut* **48**: 320-325.
- Matsui, T., Iida, M., Fujishima, M., Imai, K., and Yao, T. (1990) Increased sugar consumption in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterol Jpn* **25**: 271.
- Maynard, C.L., and Weaver, C.T. (2009) Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* **31**: 389-400.
- McClain, M.S., Blomfield, I.C., and Eisenstein, B.I. (1991) Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 5308-5314.
- McCormick, P., and Manning, D. (2001) Chronic inflammatory bowel disease and the 'over-clean' environment: rarity in the Irish 'traveller' community. *Ir Med J* **94**: 203-204.
- McDonald, C., Chen, F.F., Ollendorff, V., Ogura, Y., Marchetto, S., Lecine, P., Borg, J.P., and Nunez, G. (2005) A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* **280**: 40301-40309.
- McGovern, D.P., Butler, H., Ahmad, T., Paolucci, M., van Heel, D.A., Negoro, K., Hysi, P., Ragoussis, J., Travis, S.P., Cardon, L.R., and Jewell, D.P. (2006) TUCAN (CARD8) genetic variants and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **131**: 1190-1196.
- Meconi, S., Vercellone, A., Levillain, F., Payre, B., Al Saati, T., Capilla, F., Desreumaux, P., Darfeuille-Michaud, A., and Altare, F. (2007) Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas *in vitro*. *Cell Microbiol*.
- Mei, L., Targan, S.R., Landers, C.J., Dutridge, D., Ippoliti, A., Vasiliauskas, E.A., Papadakis, K.A., Fleshner, P.R., Rotter, J.I., and Yang, H. (2006) Familial expression of anti-*Escherichia coli* outer membrane porin C in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**: 1078-1085.

- Meraz, I.M., Arikawa, K., Ogasawara, J., Hase, A., and Nishikawa, Y. (2006) Epithelial cells secrete interleukin-8 in response to adhesion and invasion of diffusely adhering *Escherichia coli* lacking Afa/Dr genes. *Microbiol Immunol* **50**: 159-169.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B., and Gorvel, J.P. (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol* **1**: E183-188.
- Meuwis, M.A., Fillet, M., Geurts, P., de Seny, D., Lutteri, L., Chapelle, J.P., Bours, V., Wehenkel, L., Belaiche, J., Malaise, M., Louis, E., and Merville, M.P. (2007) Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochem Pharmacol* **73**: 1422-1433.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., and Hacker, J. (2004) Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* **186**: 3086-3096.
- Mikkelsen, H., Ball, G., Giraud, C., and Filloux, A. (2009) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *CupD* fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS One* **4**: e6018.
- Miquel, S., Claret, L., Bonnet, R., Dorboz, I., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. Role of decreased levels of Fis histone-like protein in Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* LF82 bacteria interacting with intestinal epithelial cells. *J Bacteriol* **192**: 1832-1843.
- Miyamoto, H., Tanaka, T., Kitamoto, N., Fukuda, Y., and Shimoyama, T. (1995) Detection of immunoreactive antigen, with a monoclonal antibody to measles virus, in tissue from a patient with Crohn's disease. *J Gastroenterol* **30**: 28-33.
- Mizoguchi, E. (2006) Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **130**: 398-411.
- Mizuno, T., and Mizushima, S. (1990) Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol Microbiol* **4**: 1077-1082.
- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**: 161-168.
- Monsen, U., Bernell, O., Johansson, C., and Hellers, G. (1991) Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **26**: 302-306.
- Morson, B.C. (1972) Rectal biopsy in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **287**: 1337-1339.
- Morson, B.C., Dawson, J.M.P., and Jay, D.W. (1990) Gastro-intestinal pathology. Oxford: Blackwell Scientific Publication.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordóñez, C.L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., and Mekalanos, J.J. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**: 1526-1530.
- Mow, W.S., Landers, C.J., Steinhart, A.H., Feagan, B.G., Croitoru, K., Seidman, E., Greenberg, G.R., and Targan, S.R. (2004a) High-level serum antibodies to bacterial antigens are associated with antibiotic-induced clinical remission in Crohn's disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* **49**: 1280-1286.
- Mow, W.S., Vasilias, E.A., Lin, Y.C., Fleshner, P.R., Papadakis, K.A., Taylor, K.D., Landers, C.J., Abreu-Martin, M.T., Rotter, J.I., Yang, H., and Targan, S.R. (2004b) Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* **126**: 414-424.
- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., and Hultgren, S.J. (1998) Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282**: 1494-1497.
- Mundy, R., MacDonald, T.T., Dougan, G., Frankel, G., and Wiles, S. (2005) *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell Microbiol* **7**: 1697-1706.
- Mylonaki, M., Rayment, N.B., Rampton, D.S., Hudspith, B.N., and Brostoff, J. (2005) Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 481-487.
- Nagy, B., Moon, H.W., and Isaacson, R.E. (1977) Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*: selection of piliated forms *in vivo*, adhesion of piliated forms to epithelial cells *in vitro*, and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *E. coli*. *Infect Immun* **16**: 344-352.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., and Yoshimori, T. (2004) Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* **306**: 1037-1040.

- Nakamura, H., Sudo, T., Tsuiki, H., Miyake, H., Morisaki, T., Sasaki, J., Masuko, N., Kochi, M., Ushio, Y., and Saya, H. (1998) Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Lett* **433**: 63-67.
- Nakamura, R.M., Matsutani, M., and Barry, M. (2003) Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* **335**: 9-20.
- Naser, S.A., Schwartz, D., and Shafran, I. (2000) Isolation of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol* **95**: 1094-1095.
- Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., and Valentine, J.F. (2004) Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**: 1039-1044.
- Nash, H.A., and Robertson, C.A. (1981) Purification and properties of the *Escherichia coli* protein factor required for lambda integrative recombination. *J Biol Chem* **256**: 9246-9253.
- Navarre, W.W., McClelland, M., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2007) Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev* **21**: 1456-1471.
- Neurath, M.F. (2007) IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* **13**: 26-28.
- Neut, C., Bulois, P., Desreumaux, P., Membre, J.M., Lederman, E., Gambiez, L., Cortot, A., Quandalle, P., van Kruiningen, H., and 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.
- Newman, E.B., and Lin, R. (1995) Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu Rev Microbiol* **49**: 747-775.
- Nicholls, S., Stephens, S., Braegger, C.P., Walker-Smith, J.A., and MacDonald, T.T. (1993) Cytokines in stools of children with inflammatory bowel disease or infective diarrhoea. *J Clin Pathol* **46**: 757-760.
- Niessner, M., and Volk, B.A. (1995) Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* **101**: 428-435.
- Nikaido, H., and Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* **49**: 1-32.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593-656.
- Nikolaus, S., and Schreiber, S. (2007) Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **133**: 1670-1689.
- Noble, C.L., Nimmo, E.R., Drummond, H., Ho, G.T., Tenesa, A., Smith, L., Anderson, N., Arnott, I.D., and Satsangi, J. (2005) The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology* **129**: 1854-1864.
- Nou, X., Braaten, B., Kaltenbach, L., and Low, D.A. (1995) Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *Embo J* **14**: 5785-5797.
- O'Gara J, P., and Dorman, C.J. (2000) Effects of local transcription and H-NS on inversion of the *fim* switch of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**: 457-466.
- O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**: 688-693.
- Ochman, H., and Selander, R.K. (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**: 690-693.
- Ofek, I., Mirelman, D., and Sharon, N. (1977) Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* **265**: 623-625.
- 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., and Cho, J.H. (2001) A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 603-606.
- Olekhovich, I.N., and Kadner, R.J. (2007) Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J Bacteriol* **189**: 6882-6890.

- Olsen, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S., and Normark, S. (1993) The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **7**: 523-536.
- Olsen, I., Tollefsen, S., Aagaard, C., Reitan, L.J., Bannantine, J.P., Andersen, P., Sollid, L.M., and Lundin, K.E. (2009) Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients. *PLoS One* **4**: e5641.
- Oostenbrug, L.E., Drenth, J.P., de Jong, D.J., Nolte, I.M., Oosterom, E., van Dullemen, H.M., van der Linde, K., te Meerman, G.J., van der Steege, G., Kleibeuker, J.H., and Jansen, P.L. (2005) Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 567-575.
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A.C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R.R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2004) Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **279**: 36426-36432.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F., and Kastelein, R.A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**: 715-725.
- Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O.H., Sorensen, T.I., and Binder, V. (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **324**: 84-88.
- Orholm, M., Binder, V., Sorensen, T.I., Rasmussen, L.P., and Kyvik, K.O. (2000) Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* **35**: 1075-1081.
- Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R., and Milton, D.L. (2000) Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **182**: 2326-2328.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H., and Mizuno, T. (2002) Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **46**: 281-291.
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Folsch, U.R., Timmis, K.N., and Schreiber, S. (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* **53**: 685-693.
- Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., and Murphy, K.M. (2000) Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* **12**: 27-37.
- Papadakis, K.A., Yang, H., Ippoliti, A., Mei, L., Elson, C.O., Hershberg, R.M., Vasilias, E.A., Fleshner, P.R., Abreu, M.T., Taylor, K., Landers, C.J., Rotter, J.I., and Targan, S.R. (2007) Anti-flagellin (CBir1) phenotypic and genetic Crohn's disease associations. *Inflamm Bowel Dis*.
- Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., Roberts, R.G., Nimmo, E.R., Cummings, F.R., Soars, D., Drummond, H., Lees, C.W., Khawaja, S.A., Bagnall, R., Burke, D.A., Todhunter, C.E., Ahmad, T., Onnie, C.M., McArdle, W., Strachan, D., Bethel, G., Bryan, C., Lewis, C.M., Deloukas, P., Forbes, A., Sanderson, J., Jewell, D.P., Satsangi, J., Mansfield, J.C., Cardon, L., and Mathew, C.G. (2007) Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* **39**: 830-832.
- Pathan, N., Marusawa, H., Krajewska, M., Matsuzawa, S., Kim, H., Okada, K., Torii, S., Kitada, S., Krajewski, S., Welsh, K., Pio, F., Godzik, A., and Reed, J.C. (2001) TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *J Biol Chem* **276**: 32220-32229.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F., and Harshey, R.M. (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* **38**: 128-139.
- Pedersen, G., Andresen, L., Matthiessen, M.W., Rask-Madsen, J., and Brynskov, J. (2005) Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol* **141**: 298-306.
- Peeters, H., Bogaert, S., Laukens, D., Rottiers, P., De Keyser, F., Darfeuille-Michaud, A., Glasser, A.L., Elewaut, D., and De Vos, M. (2007) *CARD15* variants determine a disturbed early response of

- monocytes to adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 in Crohn's disease. *Int J Immunogenet* **34**: 181-191.
- Peltekova, V.D., Wintle, R.F., Rubin, L.A., Amos, C.I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Van Oene, M., Cescon, D., Greenberg, G., Griffiths, A.M., St George-Hyslop, P.H., and Siminovitch, K.A. (2004) Functional variants of *OCTN* cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* **36**: 471-475.
- Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., and Blattner, F.R. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533.
- Persson, P.G., Ahlbom, A., and Hellers, G. (1992) Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* **3**: 47-52.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehlis, A., and Hengge, R. (2008) Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**: 2434-2446.
- Petersen, A.M., Nielsen, E.M., Litrup, E., Brynskov, J., Mirsepasi, H., and Krogh, K.A. (2009) A phylogenetic group of *Escherichia coli* associated with active left-sided inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* **9**: 171.
- Philpott, D.J., Yamaoka, S., Israel, A., and Sansonetti, P.J. (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* **165**: 903-914.
- Philpott, D.J., Girardin, S.E., and Sansonetti, P.J. (2001) Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol* **13**: 410-416.
- Picard, B., Journet-Mancy, C., Picard-Pasquier, N., and Gouillet, P. (1993) Genetic structures of the B2 and B1 *Escherichia coli* strains responsible for extra-intestinal infections. *J Gen Microbiol* **139**: 3079-3088.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., and Denamur, E. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* **67**: 546-553.
- Pineton de Chambrun, G., Colombel, J.F., Poulain, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2008) Pathogenic agents in inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol* **24**: 440-447.
- Poggio, T.V., La Torre, J.L., and Scodeller, E.A. (2006) Intranasal immunization with a recombinant truncated FimH adhesin adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against uropathogenic *Escherichia coli* challenge. *Can J Microbiol* **52**: 1093-1102.
- Porter, M.E., Mitchell, P., Free, A., Smith, D.G., and Gally, D.L. (2005) The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. *J Bacteriol* **187**: 458-472.
- Prantera, C., Zannoni, F., Scribano, M.L., Berto, E., Andreoli, A., Kohn, A., and Luzi, C. (1996) An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol* **91**: 328-332.
- Prasadarao, N.V., Wass, C.A., Stins, M.F., Shimada, H., and Kim, K.S. (1999) Outer membrane protein A-promoted actin condensation of brain microvascular endothelial cells is required for *Escherichia coli* invasion. *Infect Immun* **67**: 5775-5783.
- Pratt, L.A., and Silhavy, T.J. (1995) Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction. *Mol Microbiol* **17**: 565-573.
- Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., and Silhavy, T.J. (1996) From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 911-917.
- Present, D.H. (1999) Review article: the efficacy of infliximab in Crohn's disease--healing of fistulae. *Aliment Pharmacol Ther* **13 Suppl 4**: 23-28; discussion 38.
- Prosseda, G., Falconi, M., Giangrossi, M., Gualerzi, C.O., Micheli, G., and Colonna, B. (2004) The virF promoter in *Shigella*: more than just a curved DNA stretch. *Mol Microbiol* **51**: 523-537.
- Pruss, B.M. (1998) Acetyl phosphate and the phosphorylation of OmpR are involved in the regulation of the cell division rate in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **170**: 141-146.

- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Mekalanos, J.J. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1528-1533.
- Puorger, C., Eidam, O., Capitani, G., Erilov, D., Grutter, M.G., and Glockshuber, R. (2008) Infinite kinetic stability against dissociation of supramolecular protein complexes through donor strand complementation. *Structure* **16**: 631-642.
- Quinton, J.F., Sendid, B., Reumaux, D., Duthilleul, P., Cortot, A., Grandbastien, B., Charrier, G., Targan, S.R., Colombel, J.F., and Poulain, D. (1998) Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* **42**: 788-791.
- Rakin, A., Saken, E., Harmsen, D., and Heesemann, J. (1994) The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol Microbiol* **13**: 253-263.
- Rao, P.S., Yamada, Y., Tan, Y.P., and Leung, K.Y. (2004) Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol* **53**: 573-586.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., Henderson, I.R., Sperandio, V., and Ravel, J. (2008) The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* **190**: 6881-6893.
- Reese, G.E., Constantinides, V.A., Simillis, C., Darzi, A.W., Orchard, T.R., Fazio, V.W., and Tekkis, P.P. (2006) Diagnostic precision of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **101**: 2410-2422.
- Reese, G.E., Nanidis, T., Borysiewicz, C., Yamamoto, T., Orchard, T., and Tekkis, P.P. (2008) The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. *Int J Colorectal Dis* **23**: 1213-1221.
- Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., and Gilat, T. (1997) Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* **40**: 754-760.
- Ricci, G., D'Ambrosi, A., Resca, D., Masotti, M., and Alvisi, V. (1995) Comparison of serum total sialic acid, C-reactive protein, alpha 1-acid glycoprotein and beta 2-microglobulin in patients with non-malignant bowel diseases. *Biomed Pharmacother* **49**: 259-262.
- Riley, P.A. (2004) Bacteriophages in autoimmune disease and other inflammatory conditions. *Med Hypotheses* **62**: 493-498.
- Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., Shugart, Y.Y., Griffiths, A.M., Targan, S.R., Ippoliti, A.F., Bernard, E.J., Mei, L., Nicolae, D.L., Regueiro, M., Schumm, L.P., Steinhardt, A.H., Rotter, J.I., Duerr, R.H., Cho, J.H., Daly, M.J., and Brant, S.R. (2007) Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* **39**: 596-604.
- Rode, C.K., Melkerson-Watson, L.J., Johnson, A.T., and Bloch, C.A. (1999) Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**: 230-236.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V., and Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**: 498-504.
- Roesch, P.L., and Blomfield, I.C. (1998) Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the fim switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**: 751-761.
- Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2005) Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. *J Bacteriol* **187**: 2286-2296.
- Rolhion, N., Carvalho, F.A., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol Microbiol* **63**: 1684-1700.
- Rolhion, N.B., N.; Glasser, A.L., Ranc, J.; Hébuterne, X.; Hofman, P.; Darfeuille-Michaud, A. (2010) The abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *E. coli* invasion. *Gut*.
- Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J.F., and Naser, S.A. (2005) Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 116-125.

- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., and Benziman, M. (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**: 279-281.
- Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M., and Fleckenstein, J.M. (2009) Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* **457**: 594-598.
- Ruseler-van Embden, J.G., and Both-Patoir, H.C. (1983) Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**: 125-132.
- Russel, M.G., Engels, L.G., Muris, J.W., Limonard, C.B., Volovics, A., Brummer, R.J., and Stockbrugger, R.W. (1998) Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **10**: 243-249.
- Russell, R.K., Drummond, H.E., Nimmo, E.E., Anderson, N., Smith, L., Wilson, D.C., Gillett, P.M., McGrogan, P., Hassan, K., Weaver, L.T., Bisset, M., Mahdi, G., and Satsangi, J. (2005) Genotype-phenotype analysis in childhood-onset Crohn's disease: NOD2/CARD15 variants consistently predict phenotypic characteristics of severe disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 955-964.
- Rutgeerts, P., D'Haens, G., Targan, S., Vasilias, E., Hanauer, S.B., Present, D.H., Mayer, L., Van Hogezaand, R.A., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F., and Van Deventer, S.J. (1999) Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* **117**: 761-769.
- Ryan, P., Bennett, M.W., Aarons, S., Lee, G., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Connell, J., and Shanahan, F. (2002) PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut* **51**: 665-670.
- Ryan, P., Kelly, R.G., Lee, G., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Connell, J., and Shanahan, F. (2004a) Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol* **99**: 1539-1543.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., and Dow, J.M. (2006) Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J Bacteriol* **188**: 8327-8334.
- Ryan, R.P., Lucey, J., O'Donovan, K., McCarthy, Y., Yang, L., Tolker-Nielsen, T., and Dow, J.M. (2009) HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **11**: 1126-1136.
- Ryan, W.R., Allan, R.N., Yamamoto, T., and Keighley, M.R. (2004b) Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence. *Am J Surg* **187**: 219-225.
- Ryjenkov, D.A., Tarutina, M., Moskvina, O.V., and Gomelsky, M. (2005) Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* **187**: 1792-1798.
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Romling, U., and Gomelsky, M. (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**: 30310-30314.
- Saldana, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A.D., Kaper, J.B., Puente, J.L., and Giron, J.A. (2009) Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ Microbiol* **11**: 992-1006.
- Salim, S.Y., Silva, M.A., Keita, A.V., Larsson, M., Andersson, P., Magnusson, K.E., Perdue, M.H., and Soderholm, J.D. (2009) CD83+CCR7- dendritic cells accumulate in the subepithelial dome and internalize translocated *Escherichia coli* HB101 in the Peyer's patches of ileal Crohn's disease. *Am J Pathol* **174**: 82-90.
- Sandborn, W.J., and Hanauer, S.B. (2002) Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians. *Am J Gastroenterol* **97**: 2962-2972.
- Sandborn, W.J., Hanauer, S.B., Rutgeerts, P., Fedorak, R.N., Lukas, M., MacIntosh, D.G., Panaccione, R., Wolf, D., Kent, J.D., Bittle, B., Li, J., and Pollack, P.F. (2007) Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* **56**: 1232-1239.
- Sartor, R.B. (2005) Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* **21**: 44-50.
- Sartor, R.B. (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134**: 577-594.
- Sasaki, M., Sitaraman, S.V., Babbin, B.A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Garrett, N., Alpern, J.A., Akyildiz, A., Theiss, A.L., Nusrat, A., and Klapproth, J.M. (2007) Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* **87**: 1042-1054.

- Savage, D.C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **31**: 107-133.
- Schechter, L.M., Jain, S., Akbar, S., and Lee, C.A. (2003) The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect hilA expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**: 5432-5435.
- Schell, M.A., Ulrich, R.L., Ribot, W.J., Brueggemann, E.E., Hines, H.B., Chen, D., Lipscomb, L., Kim, H.S., Mrazek, J., Nierman, W.C., and Deshazer, D. (2007) Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol Microbiol* **64**: 1466-1485.
- Schembri, M.A., Sokurenko, E.V., and Klemm, P. (2000) Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infect Immun* **68**: 2638-2646.
- Schmid, D., and Munz, C. (2007) Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27**: 11-21.
- Schmitt, C.K., Ikeda, J.S., Darnell, S.C., Watson, P.R., Bispham, J., Wallis, T.S., Weinstein, D.L., Metcalf, E.S., and O'Brien, A.D. (2001) Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* **69**: 5619-5625.
- Schooling, S.R., and Beveridge, T.J. (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* **188**: 5945-5957.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., and Hampe, J. (1998) Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* **42**: 477-484.
- Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J., and Denamur, E. (2002) Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect Immun* **70**: 5335-5337.
- Schuch, R., and Maurelli, A.T. (1999) The mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri* requires an outer membrane lipoprotein, MxiM, for invasin translocation. *Infect Immun* **67**: 1982-1991.
- Schuch, R., and Maurelli, A.T. (2001) MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *J Bacteriol* **183**: 6991-6998.
- Schultsz, C., Moussa, M., van Ketel, R., Tytgat, G.N., and Dankert, J. (1997) Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Clin Pathol* **50**: 573-579.
- Schwan, W.R., Lee, J.L., Lenard, F.A., Matthews, B.T., and Beck, M.T. (2002) Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**: 1391-1402.
- Sechi, L.A., Scanu, A.M., Mollicotti, P., Cannas, S., Mura, M., Dettori, G., Fadda, G., and Zanetti, S. (2005) Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am J Gastroenterol* **100**: 1529-1536.
- Seder, R.A. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* **94**: 1195-1202.
- Seibold, F., Konrad, A., Flogerzi, B., Seibold-Schmid, B., Arni, S., Juliger, S., and Kun, J.F. (2004) Genetic variants of the mannan-binding lectin are associated with immune reactivity to mannans in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**: 1076-1084.
- Seibold, F. (2005) Food-induced immune responses as origin of bowel disease? *Digestion* **71**: 251-260.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Dore, J. (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* **52**: 237-242.
- Seksik, P., Lepage, P., de la Cochetiere, M.F., Bourreille, A., Sutren, M., Galliche, J.P., Dore, J., and Marteau, P. (2005) Search for localized dysbiosis in Crohn's disease ulcerations by temporal temperature gradient gel electrophoresis of 16S rRNA. *J Clin Microbiol* **43**: 4654-4658.
- Seksik, P., Sokol, H., Lepage, P., Vasquez, N., Manichanh, C., Mangin, I., Pochart, P., Dore, J., and Marteau, P. (2006) Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **24 Suppl 3**: 11-18.
- Seksik, P., Nion-Larmurier, I., Sokol, H., Beaugerie, L., and Cosnes, J. (2009) Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 734-741.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P., Mitchell, B., Connell, W., Read, R., Merrett, M., Ee, H., and Hetzel, D. (2007) Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* **132**: 2313-2319.

- Semiramoth, N., Gleizes, A., Turbica, I., Sandre, C., Gorges, R., Kansau, I., Servin, A., and Chollet-Martin, S. (2009) *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* **85**: 310-321.
- Sendid, B., Colombel, J.F., Jacquinet, P.M., Faille, C., Fruit, J., Cortot, A., Lucidarme, D., Camus, D., and Poulain, D. (1996) Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**: 219-226.
- Sendid, B., Quinton, J.F., Charrier, G., Goulet, O., Cortot, A., Grandbastien, B., Poulain, D., and Colombel, J.F. (1998) Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **93**: 1306-1310.
- Seow, C.H., Stempak, J.M., Xu, W., Lan, H., Griffiths, A.M., Greenberg, G.R., Steinhart, A.H., Dotan, N., and Silverberg, M.S. (2009) Novel anti-glycan antibodies related to inflammatory bowel disease diagnosis and phenotype. *Am J Gastroenterol* **104**: 1426-1434.
- Servin, A.L. (2005) Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **18**: 264-292.
- Shafraan, I., and Johnson, L.K. (2005) An open-label evaluation of rifaximin in the treatment of active Crohn's disease. *Curr Med Res Opin* **21**: 1165-1169.
- Shalom, G., Shaw, J.G., and Thomas, M.S. (2007) *In vivo* expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology* **153**: 2689-2699.
- Shanahan, F. (2002) Crohn's disease. *Lancet* **359**: 62-69.
- Shanahan, F., and O'Mahony, J. (2005) The mycobacteria story in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **100**: 1537-1538.
- Shao, Y., Feldman-Cohen, L.S., and Osuna, R. (2008) Functional characterization of the *Escherichia coli* Fis-DNA binding sequence. *J Mol Biol* **376**: 771-785.
- Sharma, R., Tesfay, S., Tomson, F.L., Kanteti, R.P., Viswanathan, V.K., and Hecht, G. (2006) Balance of bacterial pro- and anti-inflammatory mediators dictates net effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**: G685-694.
- Shin, S., and Park, C. (1995) Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J Bacteriol* **177**: 4696-4702.
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., and van Blankenstein, M. (1996) Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* **39**: 690-697.
- Shomer, N.H., Dangler, C.A., Schrenzel, M.D., and Fox, J.G. (1997) Helicobacter bilis-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora. *Infect Immun* **65**: 4858-4864.
- Simm, R., Morr, M., Remminghorst, U., Andersson, M., and Romling, U. (2009) Quantitative determination of cyclic diguanosine monophosphate concentrations in nucleotide extracts of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* **386**: 53-58.
- Simms, L.A., Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E.V., and Radford-Smith, G.L. (2008) Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* **57**: 903-910.
- Simpson, K.W., Dogan, B., Rishniw, M., Goldstein, R.E., Klaessig, S., McDonough, P.L., German, A.J., Yates, R.M., Russell, D.G., Johnson, S.E., Berg, D.E., Harel, J., Bruant, G., McDonough, S.P., and Schukken, Y.H. (2006) Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. *Infect Immun* **74**: 4778-4792.
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A., and Deretic, V. (2006) Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**: 1438-1441.
- Smith, K.D., Lipchock, S.V., Ames, T.D., Wang, J., Breaker, R.R., and Strobel, S.A. (2009) Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1218-1223.
- Sohanpal, B.K., Friar, S., Roobol, J., Plumbridge, J.A., and Blomfield, I.C. (2007) Multiple co-regulatory elements and IHF are necessary for the control of *fimB* expression in response to sialic acid and N-acetylglucosamine in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **63**: 1223-1236.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P., and Tannock, G.W. (2008) Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: What has it revealed? *Inflamm Bowel Dis*.

- Sokurenko, E.V., Courtney, H.S., Ohman, D.E., Klemm, P., and Hasty, D.L. (1994) FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among *fimH* genes. *J Bacteriol* **176**: 748-755.
- Solano, C., Garcia, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., Casals, J., Pedroso, E., and Lasa, I. (2009) Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 7997-8002.
- Sonden, B., and Uhlin, B.E. (1996) Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *Embo J* **15**: 4970-4980.
- Sonnenberg, A., McCarty, D.J., and Jacobsen, S.J. (1991) Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* **100**: 143-149.
- Spangler, C., Bohm, A., Jenal, U., Seifert, R., and Kaefer, V. A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J Microbiol Methods*.
- Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Vandewalle, P., Mille, C., Seddik, M., Sendid, B., Mallet, J.M., Colombel, J.F., and Poulain, D. (2006) *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**: 1764-1775.
- Stange, E.F., Travis, S.P., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von Herbay, A., Warren, B.F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, S.W., Scholmerich, J., and Reinisch, W. (2006) European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* **55 Suppl 1**: i1-15.
- Stanley, T.L., Ellermeier, C.D., and Schlauch, J.M. (2000) Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar typhimurium survival in Peyer's patches. *J Bacteriol* **182**: 4406-4413.
- Stecher, B., Barthel, M., Schlumberger, M.C., Haberli, L., Rabsch, W., Kremer, M., and Hardt, W.D. (2008) Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cell Microbiol*.
- Steinhart, A.H., Feagan, B.G., Wong, C.J., Vandervoort, M., Mikolainis, S., Croitoru, K., Seidman, E., Leddin, D.J., Bitton, A., Drouin, E., Cohen, A., and Greenberg, G.R. (2002) Combined budesonide and antibiotic therapy for active Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* **123**: 33-40.
- Stilo, R., Leonardi, A., Formisano, L., Di Jeso, B., Vito, P., and Liguoro, D. (2002) TUCAN/CARDINAL and DRAL participate in a common pathway for modulation of NF-kappaB activation. *FEBS Lett* **521**: 165-169.
- Stoll, M., Corneliusen, B., Costello, C.M., Waetzig, G.H., Mellgard, B., Koch, W.A., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Croucher, P.J., Seegert, D., Nikolaus, S., Hampe, J., Lengauer, T., Pierrou, S., Foelsch, U.R., Mathew, C.G., Lagerstrom-Fermer, M., and Schreiber, S. (2004) Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* **36**: 476-480.
- Strober, W., Fuss, I.J., and Blumberg, R.S. (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* **20**: 495-549.
- Su, C., Judge, T., and Lichtenstein, G. (2002) Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **31**: 307-327.
- Subramanian, S., Roberts, C.L., Hart, C.A., Martin, H.M., Edwards, S.W., Rhodes, J.M., and Campbell, B.J. (2008) Replication of Colonic Crohn's Disease Mucosal *Escherichia coli* Isolates within Macrophages and Their Susceptibility to Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 427-434.
- Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H., and Breaker, R.R. (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**: 411-413.
- Suh, C.I., Stull, N.D., Li, X.J., Tian, W., Price, M.O., Grinstein, S., Yaffe, M.B., Atkinson, S., and Dinauer, M.C. (2006) The phosphoinositide-binding protein p40phox activates the NADPH oxidase during FcgammaIIA receptor-induced phagocytosis. *J Exp Med* **203**: 1915-1925.
- Sutherland, J., Miles, M., Hedderley, D., Li, J., Devoy, S., Sutton, K., and Lauren, D. (2009) *In vitro* effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *Int J Food Sci Nutr* **60**: 717-727.
- Sutherland, L., Singleton, J., Sessions, J., Hanauer, S., Krawitt, E., Rankin, G., Summers, R., Mekhjian, H., Greenberger, N., Kelly, M., and et al. (1991) Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* **32**: 1071-1075.
- Sutton, C.L., Kim, J., Yamane, A., Dalwadi, H., Wei, B., Landers, C., Targan, S.R., and Braun, J. (2000) Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**: 23-31.

- Svensson, A., Fex, T., and Kihlberg, J. (2000) Preparation of fluorinated linkers: use of  $^{19}\text{F}$  NMR spectroscopy to establish conditions for solid-phase synthesis of pilicide libraries. *J Comb Chem* **2**: 736-748.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., and Lochs, H. (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**: 44-54.
- Swinger, K.K., and Rice, P.A. (2004) IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 28-35.
- T, O.C., Carroll, R.K., Kelly, A., and Dorman, C.J. (2006) Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **62**: 869-882.
- Tabaqchali, S., O'Donoghue, D.P., and Bettelheim, K.A. (1978) *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **19**: 108-113.
- Takesue, Y., Ohge, H., Uemura, K., Imamura, Y., Murakami, Y., Yokoyama, T., Kakehashi, M., and Sueda, T. (2002) Bacterial translocation in patients with Crohn's disease undergoing surgery. *Dis Colon Rectum* **45**: 1665-1671.
- Tamayo, R., Tischler, A.D., and Camilli, A. (2005) The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J Biol Chem* **280**: 33324-33330.
- Tamayo, R., Pratt, J.T., and Camilli, A. (2007) Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **61**: 131-148.
- Tamboli, C.P., Neut, C., Desreumaux, P., and Colombel, J.F. (2004) Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**: 1-4.
- Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O., and Matthews, R.G. (2002) Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13471-13476.
- Targan, S.R., Landers, C.J., Yang, H., Lodes, M.J., Cong, Y., Papadakis, K.A., Vasiliauskas, E., Elson, C.O., and Hershberg, R.M. (2005) Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* **128**: 2020-2028.
- Terashima, H., Kojima, S., and Homma, M. (2008) Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* **270**: 39-85.
- Tewari, R., MacGregor, J.I., Ikeda, T., Little, J.R., Hultgren, S.J., and Abraham, S.N. (1993) Neutrophil activation by nascent FimH subunits of type 1 fimbriae purified from the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 3009-3015.
- Thanbichler, M., Wang, S.C., and Shapiro, L. (2005) The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *J Cell Biochem* **96**: 506-521.
- Thankavel, K., Madison, B., Ikeda, T., Malaviya, R., Shah, A.H., Arumugam, P.M., and Abraham, S.N. (1997) Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J Clin Invest* **100**: 1123-1136.
- Thomas, W.E., Trintchina, E., Forero, M., Vogel, V., and Sokurenko, E.V. (2002) Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* **109**: 913-923.
- Torok, H.P., Glas, J., Tonenchi, L., Mussack, T., and Folwaczny, C. (2004) Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* **112**: 85-91.
- Torres, A.G., Giron, J.A., Perna, N.T., Burland, V., Blattner, F.R., Avelino-Flores, F., and Kaper, J.B. (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**: 5416-5427.
- Torres, A.G., Lopez-Sanchez, G.N., Milflores-Flores, L., Patel, S.D., Rojas-Lopez, M., Martinez de la Pena, C.F., Arenas-Hernandez, M.M., and Martinez-Laguna, Y. (2007) Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **189**: 5916-5928.
- Torres, A.G., Slater, T.M., Patel, S.D., Popov, V.L., and Arenas-Hernandez, M.M. (2008) Contribution of the Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells. *Infect Immun* **76**: 5062-5071.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M.E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J.M., Gilles, A.M., Johnson, J.,

- Le Bouguenec, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jehanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M.A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C.S., Schneider, D., Tourret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Medigue, C., Rocha, E.P., and Denamur, E. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* **5**: e1000344.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Girardin, S., and Philpott, D.J. Nod proteins link bacterial sensing and autophagy. *Autophagy* **6**: 409-411.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.G., Magalhaes, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I.G., Allaoui, A., Jones, N.L., Nunez, G., Girardin, S.E., and Philpott, D.J. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* **11**: 55-62.
- Tschowri, N., Busse, S., and Hengge, R. (2009) The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **23**: 522-534.
- Tysk, C., Lindberg, E., Jarnerot, G., and Floderus-Myrhed, B. (1988) Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* **29**: 990-996.
- Tytgat, G.N., and Vog, H. (1983) Role of ileocolonoscopy in diagnosis and follow-up of inflammatory bowel disease. *Acta Endoscopica* **13**: 245-260.
- Umanski, T., Rosenshine, I., and Friedberg, D. (2002) Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: 2735-2744.
- Umeyama, T., Lee, P.C., and Horinouchi, S. (2002) Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 419-425.
- Ursing, B., Alm, T., Barany, F., Bergelin, I., Ganrot-Norlin, K., Hoevens, J., Huitfeldt, B., Jarnerot, G., Krause, U., Krook, A., Lindstrom, B., Nordle, O., and Rosen, A. (1982) A comparative study of metronidazole and sulfasalazine for active Crohn's disease: the cooperative Crohn's disease study in Sweden. II. Result. *Gastroenterology* **83**: 550-562.
- van der Heide, F., Dijkstra, A., Weersma, R.K., Albersnagel, F.A., van der Logt, E.M., Faber, K.N., Sluiter, W.J., Kleibeuker, J.H., and Dijkstra, G. (2009) Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 1199-1207.
- van der Woude, M.W., and Low, D.A. (1994) Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **11**: 605-618.
- Van Kruiningen, H.J., and West, A.B. (2005) Potential danger in the medical use of *Trichuris suis* for the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 515.
- Van Kruiningen, H.J., Poulin, M., Garmendia, A.E., Desreumaux, P., Colombel, J.F., De Hertogh, G., Geboes, K., Vermeire, S., and Tsongalis, G.J. (2007) Search for evidence of recurring or persistent viruses in Crohn's disease. *Apmis* **115**: 962-968.
- Wai, S.N., Takade, A., and Amako, K. (1995) The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* **39**: 451-456.
- Wai, S.N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y., and Uhlin, B.E. (2003) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**: 25-35.
- Wakabayashi, M., Ito, T., Mitsushima, M., Aizawa, S., Ueda, K., Amachi, T., and Kioka, N. (2003) Interaction of lp-dlg/KIAA0583, a membrane-associated guanylate kinase family protein, with vinexin and beta-catenin at sites of cell-cell contact. *J Biol Chem* **278**: 21709-21714.
- Wakefield, A.J., Fox, J.D., Sawyerr, A.M., Taylor, J.E., Sweeney, C.H., Smith, M., Emery, V.C., Hudson, M., Tedder, R.S., and Pounder, R.E. (1992) Detection of herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease using the nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* **38**: 183-190.
- Wakefield, A.J., Pittilo, R.M., Sim, R., Cosby, S.L., Stephenson, J.R., Dhillon, A.P., and Pounder, R.E. (1993) Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* **39**: 345-353.
- Wakefield, A.J., Montgomery, S.M., and Pounder, R.E. (1999) Crohn's disease: the case for measles virus. *Ital J Gastroenterol Hepatol* **31**: 247-254.
- Wakefield, A.J., and Montgomery, S.M. (2000) Measles virus as a risk for inflammatory bowel disease: an unusually tolerant approach. *Am J Gastroenterol* **95**: 1389-1392.

- Walmsley, R.S., Anthony, A., Sim, R., Pounder, R.E., and Wakefield, A.J. (1998) Absence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Klebsiella pneumoniae* antigens within inflammatory bowel disease tissues. *J Clin Pathol* **51**: 657-661.
- Walthers, D., Carroll, R.K., Navarre, W.W., Libby, S.J., Fang, F.C., and Kenney, L.J. (2007) The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **65**: 477-493.
- Wang, W.Y., Barratt, B.J., Clayton, D.G., and Todd, J.A. (2005) Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* **6**: 109-118.
- Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U., and Schirmer, T. (2007) Structure of BeF3- modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* **15**: 915-927.
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., and Strober, W. (2004) NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **5**: 800-808.
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., Wakatsuki, Y., Fuss, I.J., and Strober, W. (2006) Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity* **25**: 473-485.
- Watanabe, T., Asano, N., Murray, P.J., Ozato, K., Taylor, P., Fuss, I.J., Kitani, A., and Strober, W. (2008) Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* **118**: 545-559.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., and Hengge, R. (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**: 1014-1034.
- 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., and 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., and Bevins, C.L. (2005) Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18129-18134.
- Wei, B., Huang, T., Dalwadi, H., Sutton, C.L., Bruckner, D., and Braun, J. (2002) *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. *Infect Immun* **70**: 6567-6575.
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L., Donnenberg, M.S., and Blattner, F.R. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 17020-17024.
- Wensink, J., and Witholt, B. (1981) Outer-membrane vesicles released by normally growing *Escherichia coli* contain very little lipoprotein. *Eur J Biochem* **116**: 331-335.
- White-Ziegler, C.A., Angus Hill, M.L., Braaten, B.A., van der Woude, M.W., and Low, D.A. (1998) Thermoregulation of *Escherichia coli* pap transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol Microbiol* **28**: 1121-1137.
- White-Ziegler, C.A., Villapakkam, A., Ronaszeki, K., and Young, S. (2000) H-NS controls pap and *daa* fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J Bacteriol* **182**: 6391-6400.
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R., and Mulvey, M.A. (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **85**: 11-19.
- Williams, S.B., and Stewart, V. (1999) Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction. *Mol Microbiol* **33**: 1093-1102.
- Wine, E., Ossa, J.C., Gray-Owen, S.D., and Sherman, P.M. (2009) Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol* **9**: 180.
- Wold, A.E., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T., and Eden, C.S. (1990) Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect Immun* **58**: 3073-3077.
- Wu, X.R., Sun, T.T., and Medina, J.J. (1996) *In vitro* binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9630-9635.

- Yanai, H., Shimizu, N., Nagasaki, S., Mitani, N., and Okita, K. (1999) Epstein-Barr virus infection of the colon with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **94**: 1582-1586.
- Yang, S.K., Loftus, E.V., Jr., and Sandborn, W.J. (2001) Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm Bowel Dis* **7**: 260-270.
- Yao, R., Burr, D.H., Doig, P., Trust, T.J., Niu, H., and Guerry, P. (1994) Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **14**: 883-893.
- Young, B.M., and Young, G.M. (2002) YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **184**: 1324-1334.
- Young, G.M., Schmiel, D.H., and Miller, V.L. (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6456-6461.
- Young, J.C., and Hartl, F.U. (2003) A stress sensor for the bacterial periplasm. *Cell* **113**: 1-2.
- Zhang, A., Derbyshire, V., Salvo, J.L., and Belfort, M. (1995) *Escherichia coli* protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly *in vitro*. *Rna* **1**: 783-793.
- Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D.E., and Doyle, R.J. (1998) On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 223-228.
- Zhou, L., Tan, A., and Hershenson, M.B. (2004) *Yersinia* YopJ inhibits pro-inflammatory molecule expression in human bronchial epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol* **140**: 89-97.
- Zippi, M., Colaiacomo, M.C., Marcheggiano, A., Pica, R., Paoluzi, P., Iaiani, G., Caprilli, R., and Maccioni, F. (2006) Mesenteric adenitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in a patient subsequently diagnosed with Crohn's disease of the terminal ileum. *World J Gastroenterol* **12**: 3933-3935.