HAL
open science

Influence de la mutation NOD2 et d'un traitement antibiotique sur la colonisation et la pathogénicité d'AIEC dans l'exploration de la maladie de Crohn

Maryline Drouet

To cite this version:

Maryline Drouet. Influence de la mutation NOD2 et d'un traitement antibiotique sur la colonisation et la pathogénicité d'AIEC dans l'exploration de la maladie de Crohn. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S004 . tel-00740899

HAL Id: tel-00740899

https://theses.hal.science/tel-00740899

Submitted on 11 Oct 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.

Université Lille 2
Droit et Santé

MEMOIRE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Spécialité : Microbiologie

Soutenu publiquement le 12 juin 2012

Par Melle DROUET Maryline

Influence de la mutation NOD2 et d'un traitement antibiotique sur la colonisation et la pathogénicité d'AIEC dans l'exploration de la maladie de Crohn.

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs : Docteur Chantal Le Bouguenec
Docteur Laurent Debarbieux

Examinateurs : Professeur Luc Dubreuil
Docteur Christel Neut
Professeur Pierre Desreumaux
Docteur Kristin Wannerberger

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité Inserm 995, dirigée par le Professeur Pierre Desreumaux, Praticien Hospitalier en gastro-entérologie au CHRU de Lille, que je remercie chaleureusement pour m'avoir accueillie dans son unité et pour tous ses conseils et ses critiques pendant ces cinq années.

Je tiens à remercier également le Professeur Luc Dubreuil, doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille et Praticien Hospitalier au CH de Tourcoing, pour m'avoir permis de travailler au sein du laboratoire de Bactériologie Clinique, ainsi que pour la bienveillance et la disponibilité dont il a fait preuve au cours des cinq dernières années.

Je souhaiterais tout particulièrement remercier le Docteur Christel Neut, Maître de Conférences en Bactériologie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, qui est à l'origine de ce travail, pour m'avoir encadrée durant mes cinq années passées au laboratoire. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour son aide, ses conseils et ses critiques qui m'ont permis de surmonter les obstacles inhérents à toute thèse.

Je voudrais aussi remercier le Docteur Cécile Vignal, Maître de Conférences à la Faculté de Médecine de Lille, pour m'avoir guidée techniquement et intellectuellement tout au long de ce travail. Ces quelques lignes sont pour moi l'occasion de la remercier très sincèrement pour sa disponibilité, sa sympathie et la confiance qu'elle m'a apportée du début à la fin de mon parcours.

J'exprime également mes remerciements au Professeur Antoine Cortot, au Docteur Elisabeth Singer et à Monsieur Madjid Djouina, pour leur précieuse collaboration à la réalisation de ce travail.

Je remercie Madame Chantal Le Bouguenec, Directeur de Recherche dans l'Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram positif, et Monsieur Laurent Debarbieux, Chargé de Recherche dans l'Unité de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrêmophiles, à l'Institut Pasteur de Paris, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également Mme Kristin Wannerberger, Directeur de Projet chez Ferring, pour sa participation à mon jury de thèse.

Je remercie l'IRMAD et l'Association François Aupetit pour avoir financé une partie de ce projet.

Je tiens à remercier l'ensemble du Laboratoire de Bactériologie Clinique pour son assistance technique essentielle, ainsi que pour ses conseils et ses encouragements.

Un grand merci également à l'ensemble de l'U995, ainsi qu'aux stagiaires, passés et présents, pour leur aide, leur sympathie, leur bonne humeur, et leur soutien dans les périodes difficiles.

Merci enfin à ma famille et mes amis qui m'ont soutenue, encouragée, et supportée pendant ces années d'études.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS 9

PARTIE 1 13

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 13

I) ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DE LA MALADIE DE CROHN 14

1) Historique, généralités : 14

2) Description, diagnostic différentiel : 14

3) Epidémiologie : 17

4) Symptômes : 18

5) Complications : 18

6) Traitement de la maladie de Crohn : 19

a) Les anti-inflammatoires 19

- Les dérivés salicylés 19
- Les corticoïdes 20

b) Les anti-métabolites immunomodulateurs 20

- Azathioprine et 6-mercaptopurine 20
- Le méthotrexate (MTX) 21

c) Les biothérapies 21

- Les anti-TNF 21
- Les nouvelles cibles thérapeutiques 22

d) Les traitements d'appoints 22

e) La chirurgie 23

7) Mécanismes inflammatoires : 24

II) ETIOLOGIE DE LA MALADIE DE CROHN 27

1) Les mutations génétiques dans la maladie de Crohn: 27

a) Le gène *NOD2 / CARD15* 28

- Localisation chromosomique et structure 28
- Ligand de la protéine NOD2 29
- Fonctions de la protéine NOD2 30

- Polymorphismes de *NOD2* 32
- Effets des mutations *NOD2* 33
- NOD2 et autres maladies 35

b) Les autres gènes candidats associés au développement de la maladie de Crohn 35

2) La barrière intestinale dans la maladie de Crohn : 37

a) Le microbiote intestinal 38
- Mise en place de la flore intestinale 38
- Diversité de la flore intestinale 39
- Le métagénome 39
- Stabilité de la flore intestinale 40
- Fonction de la flore intestinale 41

b) Les cellules épithéliales 41

c) Les défensines 42

d) Le mucus 42

e) Les jonctions intercellulaires 43

f) Le système immunitaire muqueux 44

g) La graisse mésentérique 44

3) Les micro-organismes intestinaux dans la maladie de Crohn : 45

a) Implication de la flore intestinale dans la MC 46
- Arguments cliniques 46
- Modèles animaux 46
- Perte de la tolérance vis-à-vis de la flore commensale 46
- Perturbation de la translocation bactérienne 47
- Pathogènes candidats 47

b) La dysbiose chez les patients atteints de Maladie de Crohn 48

c) Association entre maladie de Crohn et *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC) 49
- *Escherichia coli* et maladie de Crohn 49
- Identification et propriétés d'AIEC 50

- Facteurs de virulence d'AIEC dans la maladie de Crohn 51
- AIEC et barrière intestinale.....52
- Association entre AIEC et mutations génétiques 52

4) Les facteurs associés à l'environnement dans la maladie de Crohn :.....53

a) Les facteurs reconnus : le tabac et l'appendicectomie 53

b) Les facteurs alimentaires et la pollution 54

c) L'hypothèse de l'hygiène 54

d) Les antibiotiques.....55

e) Autres facteurs d'inflammation.....56

- Les médicaments 56
- Le stress 56

III) MODELES ANIMAUX UTILISES DANS L'EXPLORATION DES MICI 58

1) Les modèles d'inflammation spontanée :.....58

a) Les souris *SAMP/Yit* 58

2) Les modèles génétiquement modifiés : 58

a) Les souris IL10$^{-/-}$ 59

b) Les souris Muc2$^{-/-}$ 59

3) Les modèles de colites induites chimiquement :.....59

a) Perturbation de la barrière intestinale : le Dextran Sulfate Sodium 59

b) Hypersensibilisation par un haptène : TNBS/DNBS 60

4) Les modèles de colite infectieuse chez la souris : 61

PARTIE 2 63

INFLUENCE DE LA MUTATION NOD2 ET D'UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE SUR LA COLONISATION INTESTINALE DES SOURIS PAR *E. COLI* AIEC.....63

I) INTRODUCTION.....64

II) MATERIELS ET METHODES 66

1) Souches bactériennes :.....66

2) Lignées cellulaires :.....66

3) Lignées murines :.....66

4) Antibiotiques :.....67

5) Protocole d'infection des souris :.....67

6) Analyses bactériologiques :.....68

7) Tests d'invasion : 70

8) Analyse moléculaire du TNF : 71

9) Analyse histologique de l'inflammation :.....71

10) Tests statistiques : 72

III) RESULTATS EXPERIMENTAUX.....73

1) Colonisation des souris WT et NOD2KO par AIEC :.....73

2) Colonisation des souris WT et NOD2KO par les souches d'AIEC après un traitement antibiotique :.....75

3) Translocation mésentérique d'AIEC chez les souris WT et NOD2KO :.....77

4) Colonisation des souris NOD2KO par des bactéries opportunistes après le traitement antibiotique :.....80

5) Perturbation de la flore lactobacillaire chez les souris WT et NOD2KO suite au traitement antibiotique :.....84

6) Inflammation intestinale chez les souris WT et NOD2KO colonisées par AIEC : 86

PARTIE 3.....90

INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AU DSS SUR LE MODELE DE COLONISATON PAR AIEC.....90

I) INTRODUCTION.....91

II) MATERIELS ET METHODES 92

1) Souches bactériennes :.....92

2) Protocole de colite induite par le DSS : 92

3) Evaluation de la colite et analyse des dommages histologiques :.....92

4) Tests statistiques : 93

III) RESULTATS EXPERIMENTAUX.....94

1) Colonisation des souris WT et NOD2KO après traitement par le DSS :.....94

2) Inflammation chez les souris WT et NOD2KO colonisées par AIEC 06362 après le traitement par le DSS :.....96

IV) CONCLUSION 98

PARTIE 4 99

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION 99

I) DISCUSSION 100

II) CONCLUSION 105

BIBLIOGRAPHIE 107

ANNEXES 118

I) COMPOSITION DES DIFFERENTS MILIEUX BACTERIOLOGIQUES 118

II) PUBLICATIONS 120

LISTE DES ABREVIATIONS

5-ASA : Acide 5-Aminosalicylique

AIEC : *Escherichia coli* Adhérent et Invasif

AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien

ASCA : Anticorps dirigés contre *Saccharomyces cerevisiae*

ATB : Antibiotiques

ATG16L1 : Autophagy-related protein 16-L1

CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain

CCR : Cancer Colorectal

CEACAM6 : Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6

DAI : Disease Activity Index

DNBS : acide 2,4-dinitrobenzène sulfonique

DSS : Sulfate de dextran sodique

GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue

GWAS : Genome-Wide Association

IL : InterLeukine

INF-γ : Interferon gamma

IRGM : Immunity-related GTPase family M protein

IV : Intraveineux

IκB : Inhibitor of nuclear factor κB

LB : Luria-Bertani

LRR : Leucin Rich Repeat

MAP : *Mycobacterium avium paratuberculosis*

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MC : Maladie de Crohn

MDP : Muramyl DiPeptide

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MTX : Méthotrexate

NF-κB : Nuclear Factor-κB

NLR : NOD-like receptors

NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain

NT : Non traité

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

pANCA : Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGN : Peptidoglycane

PRR : Pathogen Recognition Receptor

RC : Ringer Cystéiné

RCH : Rectocolite Hémorragique

RR : Risque Relatif

SEM : Standart Error of Mean

TLR : Toll Like Receptor

TNBS : acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique

TNF : Tumor Necrosis Factor

UFC : Unité Formant Colonie

WT : Wild Type

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation des atteintes inflammatoires de la MC (A) et de la RCH 14

Figure 2 : Photographies endoscopiques de muqueuses iléale ou colique 15

Figure 3 : Principaux critères distinguant MC et RCH 16

Figure 4 : Carte de France montrant la variation du risque relatif (RR) de développer la maladie de Crohn en fonction de la situation géographique 17

Figure 5 : Posologie des aminosalicylés en grammes/jour pour les phases active et d'entretien de la MC. 20

Figure 6 : Options thérapeutiques pour le traitement de la MC. 23

Figure 7 : Etat de l'expression de cytokines et chimiokines au cours de la MC et de la RCH 26

Figure 8 : Localisation chromosomique des différents loci IBD. 27

Figure 9 : Structure du gène et de la protéine NOD2/CARD15 28

Figure 10 : Représentation schématique de la structure répétitive du PGN de la paroi des bactéries Gram-positive et Gram-négative, dont le MDP est la signature minimale 30

Figure 11 : Maintien de l'homéostasie intestinale et mécanismes de reconnaissance bactérienne par les cellules épithéliales intestinales (a) et les cellules dendritiques ou les macrophages (b). 32

Figure 12 : Effet d'une mutation de *NOD2* sur l'épithélium intestinal.....34

Figure 13 : Carte des risques moléculaires prédisposant à la MC. 37

Figure 14 : Composition de la barrière intestinale. 38

Figure 15 : Représentation d'une crypte iléale montrant l'équilibre entre bactéries intestinales et système immunitaire muqueux.. 45

Figure 16 : Visualisation d'*E. coli* AIEC dans une vacuole de phagocytose de macrophage par microscopie électronique. 50

Figure 17 : Un modèle possible de pathogénèse de la MC. 57

Figure 18 : Quelques exemples de modèles animaux de colite expérimentale 62

Figure 19 : Facteurs choisis dans notre modèle de pathogénèse de la MC. 65

Figure 20 : Protocole expérimental d'infection des souris par AIEC. 68

Figure 21 : Protocole d'identification des AIEC. 70

Figure 22 : Colonisation et persistance des AIEC 06362 et LF82 dans l'iléon et le côlon.. ...74

Figure 23 : Colonisation et persistance des AIEC 06362 et LF82 dans l'iléon et le côlon après traitement antibiotique. 76

Figure 24 : Colonisation et persistance d'AIEC 06362 dans les ganglions et la graisse mésentériques après traitement antibiotique.. 78

Figure 25 : Colonisation et persistance d'AIEC LF82 dans les ganglions et la graisse mésentériques après traitement antibiotique.. 79

Figure 26 : Colonisation par les Entérobactéries autres qu'AIEC dans l'iléon et le côlon après traitement antibiotique. 81

Figure 27 : Colonisation par les Entérobactéries autres qu'AIEC dans l'iléon et le côlon après traitement antibiotique. 82

Figure 28 : Colonisation par les Entérobactéries autres qu'AIEC dans les tissus mésentériques après traitement antibiotique. 83

Figure 29 : Colonisation par les Lactobacilles dans l'iléon et le côlon après traitement antibiotique. 85

Figure 30 : Evaluation des paramètres clinique, moléculaire et histologique de l'inflammation intestinale après traitement antibiotique.. 87

Figure 31 : Evaluation des paramètres clinique, moléculaire et histologique de l'inflammation intestinale après traitement antibiotique.. 88

Figure 32 : Protocole expérimental de colite au DSS. 92

Figure 33 : Colonisation du côlon et des tissus mésentériques après le traitement par le DSS et les antibiotiques. 95

Figure 34 : Evaluation des paramètres cliniques et moléculaires de la colite. 97

PARTIE 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I) ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DE LA MALADIE DE CROHN

1) Historique, généralités :

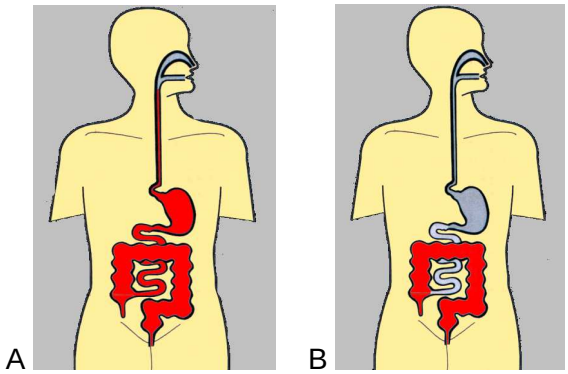
Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par la présence de lésions inflammatoires, d'étiologie peu connue, pouvant toucher tout ou partie du tube digestif. La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont les deux principales formes de MICI. La MC a été décrite précisément pour la première fois en 1932 aux Etats-Unis par le docteur Burrill B. Crohn, comme une « iléite terminale ou régionale » à laquelle son nom fut donné [1]. Ces maladies se manifestent par des symptômes cliniques variés et par une évolution chronique avec une succession de poussées plus ou moins intenses, entrecoupées de phases de rémission plus ou moins longues. Les lésions inflammatoires sont secondaires à une activation du système immunitaire muqueux intestinal, due à l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux qui commencent à être mieux connus. La MC se différencie de la RCH par sa localisation et l'étendue des lésions. La MC est classée en fonction de l'âge d'apparition de la maladie, de la localisation des lésions et du développement ou non de complications (fistules, sténoses).

Les MICI constituent un des problèmes majeurs en gastro-entérologie, car elles touchent des sujets jeunes. Leur évolution chronique se prolonge sur toute la vie du patient et peut atteindre tout le tube digestif. Ces pathologies encore méconnues retentissent sur la vie personnelle et professionnelle des malades en raison de la fréquence des poussées et des complications nécessitant souvent un recours à la chirurgie.

2) Description, diagnostic différentiel :

Le diagnostic différentiel entre MC et RCH repose principalement sur deux critères : la localisation et la forme anatomo-pathologique des lésions (Figure 1).

Figure 1 : Localisation des atteintes inflammatoires de la MC (A) et de la RCH (B)



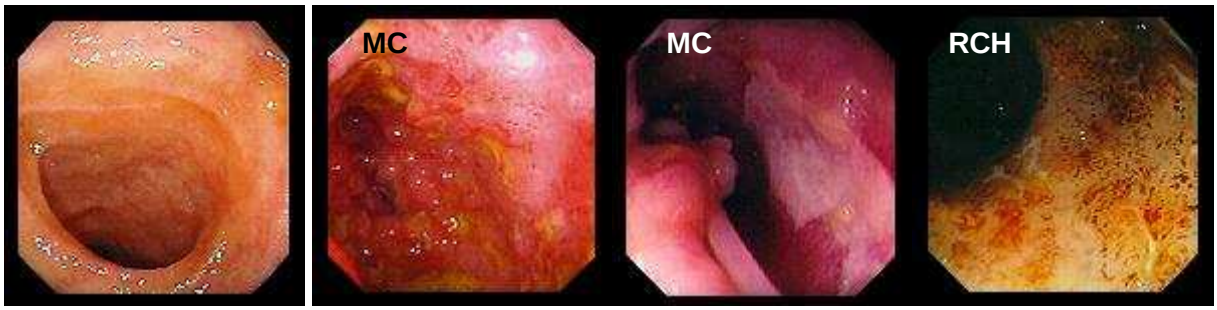
La MC peut toucher l'ensemble du tube digestif, de la bouche à l'anus. Néanmoins, on distingue trois formes principales : iléale (28%), colique (21%) et iléo-colique (47%). La maladie est habituellement découverte entre 20 et 30 ans, à l'occasion d'une poussée inaugurale ou d'une complication, mais elle n'est pas rare chez l'enfant ou la personne âgée. La MC est caractérisée par des ulcérations muqueuses aphtoïdes, plus ou moins larges, le plus souvent profondes avec une atteinte dite transpariétale, c'est-à-dire pouvant atteindre toutes les couches de la paroi. L'atteinte du tube digestif est discontinue, les lésions laissant des intervalles de muqueuse saine entre les zones enflammées (Figure 2). Ces lésions provoquent abcès et sténoses (rétrécissement de la lumière dû à l'épaississement de la paroi épithéliale), favorisant l'apparition de fistules en amont (conduit anormal faisant communiquer une cavité ou un organe avec un autre ou avec l'extérieur de l'organisme). La MC est également caractérisée par l'hypertrophie du tissu adipeux mésentérique et par la présence d'un tissu graisseux ectopique entourant les zones atteintes de l'intestin, appelé « creeping-fat ». L'inflammation transmurale est également responsable de la présence de granulomes, caractéristiques de la MC, dans 60% des cas. La maladie se caractérise aussi en fonction de la présence ou non de marqueurs sérologiques appelés ASCA (Anticorps anti *Saccharomyces cerevisiae*) présents dans 40 à 60% des cas de MC. La présence de ces marqueurs est associée aux atteintes du grêle, et à la survenue de complications [2].

Pour la RCH, l'atteinte est exclusivement recto-colique. Les lésions sont plutôt superficielles avec un aspect granulaire. Contrairement à la MC, l'atteinte de la muqueuse est continue avec de nombreux abcès. Au niveau sérologique, la RCH se caractérise par la présence de pANCA (Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies) dans 70% des cas.

D'autres marqueurs comme la calprotectine et la lactoferrine fécales, communs aux deux pathologies, permettent de mesurer l'activité de la maladie et le risque de rechute [3].

En cas de forme atypique c'est la combinaison des examens endoscopiques et anatomo-pathologiques (biopsies, radiographie, imagerie par résonance magnétique IRM, ultrasons) qui permettra un diagnostic différentiel entre MC et RCH (Figure 3).

Figure 2 : Photographies endoscopiques de muqueuses iléale ou colique [4]



Muqueuse saine | Muqueuse iléale ulcérée | Muqueuse colique avec uicères et œdèmes

Figure 3 : Principaux critères distinguant MC et RCH (d'après Podolsky, *IBD*, 2002 [5])

	Rectocolite Hémorragique	Maladie de Crohn
Symptômes :		
Fièvre	**+**	**++**
Douleur abdominale	**+/-**	**++**
Diarrhée	**+++**	**+**
Sang dans les selles	**+++**	**+**
Perte de poids	**+**	**++**
Lésions péri-anales	**-**	**+**
Masse abdominale	**-**	**++**
Troubles de croissance chez les enfants	**+/-**	**++**
Localisation :		
Côlon	Exclusivement	1/3 des patients
Iléon	Jamais	1/3 des patients
Complications :		
Sténoses	**-**	**++**
Fistules	**-**	**+**
Cancer	**++**	**+**
Endoscopie :		
Lésions friables	**+++**	**+**
Lésions aphtoïdes	**-**	**++**
Aspect en pavé	**-**	**++**
Pseudopolypes	**++**	**+**
Radiologie :		
Distribution des lésions	Continue	Discontinue
Ulcérations	Superficielles	Profondes avec atteinte de la sous-muqueuse
Fissures	absentes	++
Présence d'anticorps :		
pANCA	70% des patients	+/-
ASCA	+/-	➢ 50% des patients

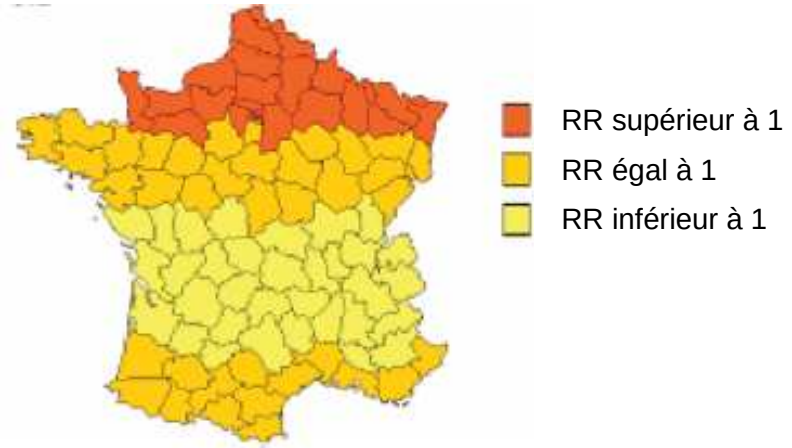
3) Epidémiologie :

La MC est une maladie de l'adulte jeune. La majorité des diagnostics sont réalisés entre 20 et 30 ans. Néanmoins il existe des cas de MC pédiatrique. Les femmes semblent être plus touchées que les hommes (Sex Ratio = 1,3). On estime à 850 000 les personnes atteintes de MC en Europe, dont 100 000 à 120 000 en France. L'incidence de la MC en France est de l'ordre d'environ 4 cas pour 100 000 habitants. Elle est dépassée par la RCH dans la plupart des pays industrialisés sauf dans certaines régions où l'incidence de la MC dépasse celle de la RCH, notamment le nord de la France (Figure 4) [6]. Selon le registre Epimad qui récence les cas de MICI du nord ouest de la France, l'incidence de la MC y atteint les 6 cas pour 100 000 habitants, alors que l'incidence de la RCH y est plus basse que chez ses voisins européens.

La fréquence des MICI est plus élevée dans les pays du nord ou industrialisés (Europe : 5 cas/100 000 hab., Etats-Unis : 7 cas/100 000 hab.), par rapport aux pays émergeants (Asie, Afrique : 3 cas/100 000 hab.). Dans les pays fortement touchés, il existe des gradients Nord/Sud et Ouest/Est.

Apparues dans les années 1950 en Europe et en Amérique du Nord avec un taux plus important de MC que de RCH, les MICI ont vu leur fréquence augmenter durant une période de 20 ans pour ensuite se stabiliser. Dans les pays développés, la RCH est devenue la forme prédominante des MICI. A l'inverse, l'incidence de la MC a tendance à diminuer surtout dans les cohortes pédiatriques. Ce même profil évolutif est actuellement observé dans les pays en développement [7].

Figure 4 : Carte de France montrant la variation du risque relatif (RR) de développer la maladie de Crohn en fonction de la situation géographique [8]



4) Symptômes :

Les manifestations cliniques de la MC sont principalement digestives. Dans sa forme typique, le début de la MC est lent et insidieux. Diarrhées épisodiques et vagues douleurs abdominales résument la symptomatologie pendant des mois ou des années.
Lorsque la maladie est bien installée, la diarrhée, d'intensité moyenne, parfois grasse, rarement sanglante est le symptôme principal. Les douleurs abdominales continues ou paroxystiques sont liées à la localisation des lésions. L'amaigrissement et la fièvre sont d'autres symptômes importants. Les signes varient selon la topographie des lésions. Les lésions anales (fissures, fistules chroniques) ou péri-annales sont fréquentes.
Chez l'enfant, le retard de croissance est un symptôme évocateur.

La MC se manifeste également par des symptômes extra-intestinaux. Entre 21 et 40% des patients atteints d'une MC développent des manifestations ou des complications extra-intestinales :

- Les manifestations articulaires sont fréquentes (16 à 33%) : polyarthrite, spondylarthrite ankylosante. L'hippocratisme digital (doigts dits en baguette de tambour, ongles cyanosés et bombés en verre de montre) est souvent observé. L'ostéomalacie et l'ostéoporose sont moins fréquentes.
- Il existe des signes cutanés et muqueux (3 à 12 %) : érythème noueux, ulcérations cutanées, aphtes, glossite, iritis.
- Des troubles hépatiques sont souvent associés : stéatose, hépatite, cirrhose, lithiase...
- Les manifestations urinaires sont fréquentes : compressions urétérales, amylose rénale, fistules iléo-vésicales, lithiase urinaire.
- Des fistules génitales avec stérilité sont possibles.

5) Complications :

Les complications sont principalement les fistules (ano-périnéales, entéro-vésicales…), les abcès, le risque d'occlusion intestinale, ainsi que les hémorragies digestives. Certaines comme les perforations et les sténoses nécessitent de la chirurgie.
Il arrive aussi que la maladie devienne réfractaire au traitement médical et que la chirurgie soit le recours ultime. Le risque cumulé de chirurgie d'exérèse intestinale est de 80% à 20 ans. Il est fréquent d'être réopéré à cause des récidives.
La chirurgie elle-même peut entrainer des problèmes de nutrition dus aux résections étendues du grêle.

Il faut aussi souligner le risque augmenté de cancer colique. La MC présente en effet un risque accru de développer un cancer colorectal (CCR), des adénocarcinomes du grêle et des cancers extra-intestinaux (cholangiocarcinomes, lymphomes non hodgkiniens), risque qui s'ajoute aux effets secondaires carcinogènes des traitements médicamenteux des MICI. Ainsi, les malades atteints de MICI ont, par rapport à la population générale, un risque 5 fois supérieur de développer un CCR. Ce risque est modulé par la durée de l'évolution de la maladie et l'étendue de l'atteinte colique.

6) Traitement de la maladie de Crohn :

Le traitement des MICI s'organise autour de deux axes : la guérison des poussées en phase active, dans le but de réduire la durée de cette phase et d'induire une rémission, et une stratégie d'entretien, dans le but de maintenir cette rémission et prévenir les poussées.

Les options thérapeutiques varient en fonction de la nature, la localisation, la sévérité et l'évolution de la MICI (Figure 6). En cas de poussées, un traitement symptomatique est institué comprenant repos au lit, antispasmodiques, anti-diarrhéiques, pansement intestinal et alimentation sans résidu.

Les principaux médicaments utilisés sont les anti-inflammatoires, salicylés et corticoïdes, et les immunomodulateurs en cas de poussée sévère.

a) Les anti-inflammatoires

- Les dérivés salicylés

Les aminosalicylés font partie de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Le principe actif de ce groupe de composés est l'acide 5-Aminosalicylique (5-ASA), qui agit au contact de la muqueuse intestinale lésée. Les médicaments de cette famille diffèrent par le site de libération du 5-ASA. Le chef de file, la sulfasalazine (Salazopyrine®), est une association d'un sulfamide (la sulfapyridine) et de 5-ASA, uniquement libéré au niveau colique sous l'action d'une azoréductase produite par les bactéries coliques. Elle est aujourd'hui délaissée au profit de ses dérivés, mésalazine et olsalazine (Pentasa®, Rowasa®, Dipentum®) qui ne comportent que du 5-ASA et dont le site de libération varie dans l'intestin. Ce groupe de médicaments est principalement utilisé dans le traitement de la RCH, mais peut être utilisé dans les poussées légères ou modérées de la MC dans les formes colique ou iléale terminale de la maladie afin d'éviter le recours aux corticoïdes. Un traitement local par lavement ou suppositoire de 5-ASA peut être associé en cas d'atteinte basse et peut parfois suffire si l'atteinte est isolée (Figure 5). Les effets secondaires sont principalement dus à la sulfazalazine, avec des réactions immunoallergiques et à l'olsalazine avec des diarrhées sécrétoires.

Figure 5 : Posologie des aminosalicylés en grammes/jour pour les phases active et d'entretien de la MC.

	Colite		Iléite	
	Aiguë	**Entretien**	**Aiguë**	**Entretien**
Salazopyrine®	2 - 4	Pas conseillé	Pas conseillé	Pas conseillé
Pentasa®	4	3-4	4	3-4
Dipentum®	2 - 3	1	Pas conseillé	Pas conseillé
Rowasa®	4	Pas conseillé	Pas conseillé	Pas conseillé

- Les corticoïdes

Le traitement par les corticoïdes est utilisé dans les formes moyennes à sévères de la MC. Les deux principaux médicaments utilisés sont la Prednisolone (Solupred®) et la Prednisone (Cortancyl®) à raison de 0,5 à 1mg/kg/j en une seule prise matinale. C'est le traitement le plus rapidement efficace quelle que soit la localisation des lésions. Il permet d'obtenir une rémission en 3 à 4 semaines dans plus de 90 % des cas. Il peut s'accompagner des effets secondaires classiques des corticoïdes : œdème, surcharge pondérale, hypertension artérielle, élévation de la glycémie. Ils sont inconstants, et souvent réversibles à l'arrêt du traitement. Les corticoïdes peuvent aussi favoriser une décalcification, dont la maladie elle-même est aussi responsable. Une forme à action locale a été développée plus récemment afin d'éviter les effets indésirables systémiques. Le budésonide (Entocort®) est libéré au niveau de la partie terminale du grêle et du côlon droit, permettant l'administration de doses plus faibles pour une même efficacité.

b) Les anti-métabolites immunomodulateurs

Dans les formes réfractaires ou en cas de cortico-dépendance (impossibilité de réduire les corticoïdes au-dessous d'une certaine dose « seuil » sans que réapparaissent les symptômes), un traitement par immunomodulateur peut être mis en place en traitement d'entretien de la MC (30% des patients). Les principaux immunosuppresseurs utilisés dans le traitement de la MC sont l'azathioprine ou 6-mercaptopurine et le methotrexate (MTX). Tous ces traitements nécessitent une surveillance biologique régulière.

- Azathioprine et 6-mercaptopurine

L'azathioprine (Imurel®) et son métabolite actif le 6-mercaptopurine (Purinethol®) sont très efficaces dans le maintien de la rémission de la MC et pour le sevrage des MC cortico-dépendantes chez 70% des patients [9]. Chez ces patients, l'efficacité à long

terme de ce traitement est bonne avec un taux de rechute d'environ 5-10% par an. Mais l'effet est médiocre dans les formes fistulisantes (30 à 40% d'efficacité) avec un risque de rechute important. Les effets indésirables sont fréquents et de type immunoallergiques (hépatite, pancréatite, fièvre….), les cas de leucopénie ou de thrombopénie sont plus rares mais nécessitent l'arrêt du traitement. L'inhibition des voies de dégradation lors d'un déficit en thiopurine méthyl transférase (10% de la population) ou lors de la prise d'inhibiteurs de la xanthine oxydase (allopurinol) accentue la toxicité médullaire du médicament et impose un arrêt du traitement.

- Le méthotrexate (MTX)

Le MTX est un analogue de l'acide folique. L'absorption par voie orale étant très variable d'un individu à l'autre, le MTX est donc administré par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Le MTX permettrait une amélioration de 80% des formes cortico-dépendantes de MC, avec une rémission dans 40 à 50% des cas [10]. Ce traitement peut être proposé pour les patients qui ne tolèrent pas l'azathioprine et le 6-mercaptopurine. Ce traitement impose une surveillance régulière toutes les 6 à 8 semaines de la numération formule sanguine et de la biologie hépatique. La toxicité du MTX est atténuée par la prise d'acide folique (2,5 mg/j). La prise de MTX impose une contraception rigoureuse.

c) Les biothérapies

Des nouvelles classes de médicaments, comme les anticorps anti-TNF (Adalimumab et Infliximab), sont aussi utilisées depuis quelques années dans le traitement des poussées et d'entretien de la MC.

- Les anti-TNF

Le TNF (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine pro-inflammatoire dont la concentration est augmentée dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC. Il joue un rôle primordial dans la pathogénèse des lésions intestinales. L'administration de certains anticorps monoclonaux anti-TNF, tels que l'Infliximab (Remicade®, anticorps humanisé à 75%) ou l'Adalimumab (Humira®, anticorps humanisé à 100%), peut donc être pratiquée en cas de MC active, sévère et n'ayant pas répondu à un traitement classique ou en cas de contre-indication aux autres traitements. Le modèle le plus utilisé est un traitement d'induction de 3 doses de 5mg/kg de Remicade® à 0, 2 et 6 semaines en perfusion IV lente de 2 heures. Il permet d'atteindre une réponse clinique de 65% à 10 semaines [11]. Ce modèle permet de limiter l'immunisation contre le Remicade®. Le Remicade® est aussi utilisé dans le traitement d'entretien des patients atteints de MC

réfractaires à un traitement d'entretien par les immunosuppresseurs (MTX ou azathioprine) et chez les malades cortico-dépendants après échec des immunosuppresseurs. Il est aussi très efficace dans les formes fistulisantes de la maladie dès la première injection et en entretien toutes les 8 semaines. Les principaux effets indésirables sont liés à l'immunogénicité des anticorps avec une réaction immédiate ou retardée à la perfusion (bouffées de chaleur, rash, prurit, fièvre, maux de tête…), ainsi que l'apparition d'anticorps anti-infliximab nécessitant parfois l'arrêt du traitement. Un traitement préalable par immunosuppresseur permet de limiter l'apparition des ces anticorps. Le risque infectieux accru est important chez les patients traités par Remicade® (8 à 35%), mais les infections sont en général peu graves et transitoires.

- Les nouvelles cibles thérapeutiques

A l'heure actuelle, les stratégies thérapeutiques se portent sur des thérapies ciblées, permettant la modulation de l'expression de cytokines impliquées dans la MC. Des études cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'intérêt de nouveaux anticorps dirigés contre certaines cytokines pro-inflammatoires, comme par exemple l'Ustekinumab. L'Ustekinumab est un anticorps dirigé contre la sous-unité p40 communes aux IL-12 et IL-23. L'IL-12 intervient dans la réponse inflammatoire de la MC et son expression dans l'intestin des patients est corrélée à l'expression de TNF et d'IFNγ [12]. L'expression de l'IL-23 est aussi augmentée dans la MC, où elle induit l'expression d'IL-6 et d'IL-17 orientant les lymphocytes T vers un phénotype Th17 [13]. Une étude de phase II a montré que des patients traités à l'Ustekinumab montraient une réponse positive dans 53% des cas, contre 30% dans le groupe placebo à 6 semaines [14].

Les cellules souches sont aussi une voie de recherche en plein essor dans le traitement des MICI. En effet, ces cellules possèdent un fort pouvoir de régénération des tissus grâce à leur potentiel pluripotent, qui leur permet de se différencier aussi bien en cellules épithéliales intestinales qu'en cellules immunitaires. Cette capacité peut entraîner la restauration de l'épithélium intestinal et le rééquilibrage de la balance immunitaire chez des patients développant une colite. Plusieurs essais cliniques ont montré une action bénéfique des cellules souches sur la réparation tissulaire intestinale, ouvrant la voie à une potentielle utilisation dans la rémission à long terme des MICI.

d) Les traitements d'appoints

Les protocoles cliniques montrent que les traitements anti-infectieux sont utiles dans le traitement de certains sous-groupes de patients atteints de la MC. En particulier, le

métronidazole est efficace pour les patients présentant des atteintes coliques ou des fistules péri-anales, mais des doses importantes (jusqu'à 750mg, 3 fois/jour) sont nécessaires et potentiellement neurotoxiques. La ciprofloxacine et la clarithromycine peuvent être utilisées en alternative au métronidazole.

e) La chirurgie

La chirurgie ne guérit pas la MC. Les poussées évolutives peuvent conduire à des complications pouvant nécessiter de la chirurgie : occlusion, perforation, abcès, fistules….Dans les deux années suivant le diagnostic d'une MC, 45% des patients vont subir une intervention chirurgicale et 90% vont subir une résection chirurgicale au moins une fois au cours de l'évolution de leur maladie.

Figure 6 : Options thérapeutiques pour le traitement de la MC (d'après Podolsky, *IBD*, 2002 [5]). PO : *per os* ; IV : intraveineux.

Sévérité de la maladie	Traitement
Légère	Aminosalicylés PO Métronidazole PO Budésonide PO
Modérée	Corticoïdes PO (Budésonide si atteinte iléale ou du côlon droit) Azathioprine ou 6-mercaptopurine PO
Sévère	Corticoïdes PO ou IV Methotrexate IV Infliximab IV
Réfractaire	Infliximab IV
Péri-anale	Antibiotiques PO Infliximab IV Azathioprine ou 6-mercaptopurine PO
Rémission	Possibilité Azathioprine ou 6-mercaptopurine PO

7) Mécanismes inflammatoires :

La MC est communément admise comme un déséquilibre du système immunitaire muqueux, dirigé contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des individus génétiquement prédisposés. La dérégulation du système immunitaire muqueux est caractérisée par une cascade de mécanismes. La stimulation anormale des cellules résidentes de la muqueuse intestinale est à l'origine de l'activation des voies de transduction, notamment NF-κB. Cette activation permet la production de médiateurs inflammatoires (cytokines) impliqués dans le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires du sang vers la paroi intestinale via la surexpression de molécules d'adhésion. Ce mécanisme aboutit à la formation d'un infiltrat de cellules inflammatoires dans la paroi intestinale. Enfin l'inhibition des mécanismes d'apoptose entrainera une augmentation de la survie de ces cellules inflammatoires et donc la chronicité de l'inflammation.

Les deux principales voies de transduction impliquées dans les phénomènes inflammatoires sont les voies de NF-κB/IκB (Inhibitor of nuclear factor κB) et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). L'hétérodimère NF-κB/IκB est présent dans le cytoplasme des cellules. Après activation de la cellule, une cascade de phosphorylation entraîne la dégradation de la protéine inhibitrice IκB et la translocation de NF-κB vers le noyau de la cellule, où il va induire l'expression de cytokines inflammatoires telles que le TNF (Tumor Necrosis Factor) et L'IL-1β (Interleukine 1β). Les MAPK sont des facteurs de transcription cytoplasmique constitués de plusieurs modules activés par des facteurs de stress. Des modèles expérimentaux de colite ont mis en évidence l'augmentation de l'activation des voies NF-κB et MAPK dans la MC [15].

Les modèles expérimentaux de colite et l'étude des patients atteints de MICI ont permis de mettre en évidence le rôle central des cytokines pro-inflammatoires dans les lésions intestinales chroniques. Les cytokines pro-inflammatoires impliquées sont principalement le TNF, l'IL-6 et l'IL-1β. Chez les malades atteints de MC, l'expression de TNF est présente dans toutes les couches de l'épithélium intestinal, mais aussi dans les granulomes et la graisse mésentérique. La surexpression de TNF par les cellules épithéliales notamment est suffisante pour déclencher une colite chez la souris, et pourrait être l'élément déclencheur du processus inflammatoire de la MC [16]. Cette augmentation anormale des cytokines inflammatoires paraît néanmoins secondaire à l'inflammation puisqu'elle n'est pas retrouvée dans la muqueuse saine des patients atteints de MC [17]. L'IL-6 est impliqué dans le retard d'apoptose constaté chez les cellules T des patients atteints de MC, entretenant ainsi l'inflammation [18]. A ces cytokines vient s'ajouter l'IL-8 qui joue aussi un rôle dans les lésions de maladie de Crohn. Plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation d'IL-8

dans la muqueuse colique inflammatoire de patients atteints de MC, mais pas dans la muqueuse saine [19].

La stimulation de récepteurs cellulaires intestinaux, notamment les récepteurs bactériens, va modifier l'équilibre lymphocytaire de la muqueuse intestinale des patients passant d'un profil de tolérance Th2 à un profil inflammatoire Th1 et Th17 [20]. Les lymphocytes Th1 sont les lymphocytes pro-inflammatoires principaux et sont induits dans un contexte présentant de l'IL-12 et de l'IFNγ [21]. Ils produisent des cytokines inflammatoires comme l'IL-2, l'IFNγ ou le TNF et induisent le déclenchement des réponses immunitaires cellulaires mettant en jeu les lymphocytes T cytotoxiques. Ils se développent préférentiellement durant les infections par les bactéries intracellulaires et les maladies chroniques inflammatoires [22]. De plus, ils participent au recrutement des macrophages au niveau des sites d'infection et stimulent leur capacité antimicrobienne. Les lymphocytes Th17 ont été découverts récemment. Ils se caractérisent par la production d'IL-17 et nécessitent la présence d'IL-23 [23]. L'IL-17 induit la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-21, IL-6, IL-22, TNF…).

Figure 7 : Etat de l'expression de cytokines et chimiokines au cours de la MC et de la RCH (d'après Balfour, *Nature Genetics*, 2006 [24]). N : normal, ↑ : augmenté

Cytokines	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
Réponse innée :		
IL-1β	↑	↑
TNF	↑↑	↑
IL-6	↑	↑
IL-8	↑	↑
IL-12	↑	**N**
IL-18	↑	↑
IL-23	↑	**N**
IL-27	↑	**N**
Réponse adaptative :		
IFN-γ	↑	**N**
IL-5	**N**	↑
IL-13	**N**	↑
IL-17	↑	**N**
IL-21	↑	**N**

II) ETIOLOGIE DE LA MALADIE DE CROHN

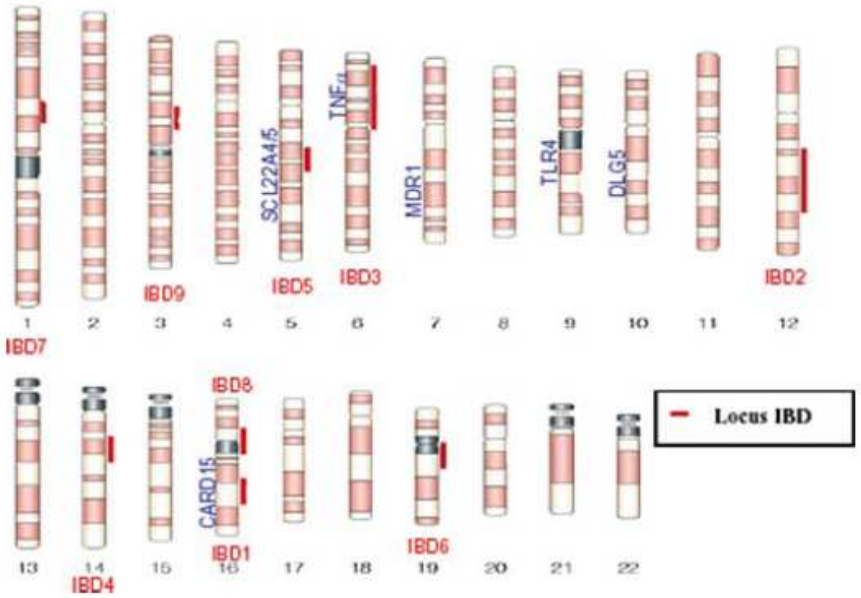
La MC est caractérisée par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale et la présence de granulomes. De nombreuses avancées ces dernières années ont permis de montrer que le déséquilibre immunitaire de la muqueuse intestinale à l'origine de la maladie est dû à la fois à des facteurs génétiques et à des facteurs environnementaux, même si le mécanisme précis reste encore largement inconnu [25, 26].

1) Les mutations génétiques dans la maladie de Crohn:

L'aspect génétique de la MC a toujours été une hypothèse très étudiée. En effet, 10 à 29% des patients atteints de MC présentent un antécédent familial [27]. Des études ont montré que le fait d'avoir un frère ou une sœur atteint de la MC augmentait le risque relatif (RR) d'un facteur de 30 à 40, et que la comorbidité était plus élevée chez les vrais jumeaux (50-58%) par rapport aux faux jumeaux (0-12%) [28, 29]. Ces observations indiquent clairement l'existence de facteurs de prédisposition génétiques.

Les études récentes sur l'origine de la MC ont souligné l'importance des mécanismes de l'immunité innée dans la pathogénie de la maladie. Une cartographie chromosomique des MICI a été établie. De nombreux gènes de susceptibilité déjà identifiés sont impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, la réponse immunitaire innée et/ou l'élimination des bactéries. Après avoir concentré les recherches sur un seul gène responsable, les chercheurs penchent plutôt aujourd'hui pour une hérédité polygénique de la maladie (Figure 8).

Figure 8 : Localisation chromosomique des différents loci IBD (Inflammatory Bowel Disease) de susceptibilité liés aux MICI (d'après Hugot, *NY Acad. Sci* 2006 [30]).



a) Le gène *NOD2 / CARD15*

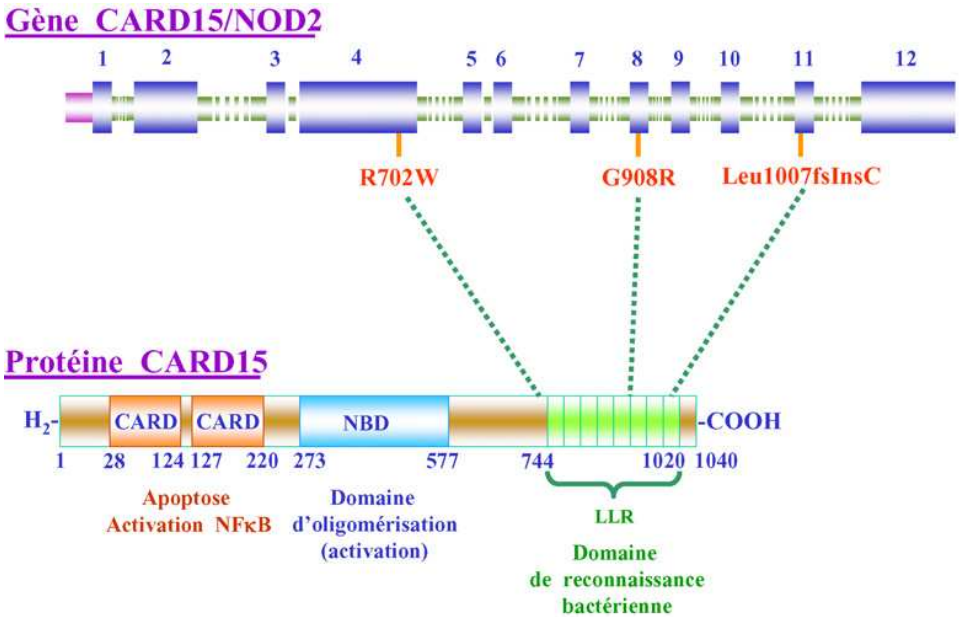
Le premier gène identifié et le plus étudié à l'heure actuelle est le gène *NOD2* (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2) aussi appelé *CARD15* (Caspase recruitment domain 15). Il a été découvert conjointement par deux équipes en 2001 par étude de liaison génétique sur des familles atteintes de MC. C'est le gène de susceptibilité le plus fortement associé à la MC [31, 32].

- Localisation chromosomique et structure

Le gène *NOD2* est situé en 16q12, dans la région péricentromérique du chromosome 16 (locus IBD-1) (Figure 8). *NOD2* code une protéine intra-cytoplasmique de 1040 acides aminés. La protéine NOD2 fait partie de la super-famille des PRR (Pathogen Recognition Receptor). On distingue trois grandes familles de PRR : les TLR (Toll Like Receptors) situés dans la membrane cellulaire, les RLR (Retinoic acid inductible gene1 Like Receptors) impliqués dans la reconnaissance des virus, et les NLR (NOD-like Receptors). Les NLR sont intra-cytoplasmiques et sont caractérisés par la présence d'un domaine LRR et d'un domaine NOD. Seul le domaine effecteur varie. NOD2 appartient à la famille des NLR.

NOD2 possède la structure caractéristique des protéines NLR : un domaine N-terminal CARD (Caspase Recruitment Domain), un domaine central NACHT ou NOD (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain) et un domaine C-terminal riche en leucine LRR (Leucine Rich Repeat) (Figure 9).

Figure 9 : Structure du gène et de la protéine NOD2/CARD15 (d'après Lamoril, *Immuno-analyse et Bio. Spéc.*, 2007 [33])



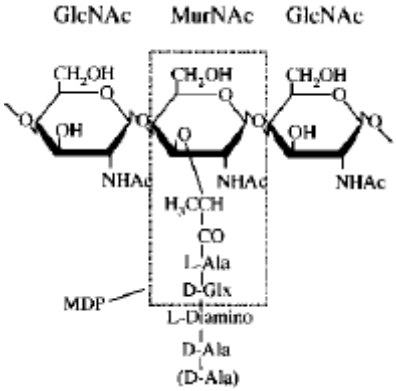
Le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance du ligand bactérien, le muramyl dipeptide (MDP), dérivé des peptidoglycanes (PGN) de la paroi bactérienne [34, 35]. C'est la liaison du domaine LRR avec son ligand qui libère le site actif NOD/NACHT de la protéine. Le domaine NOD, qui constitue le domaine catalytique de la protéine, est capable de lier un nucléotide de type ATP. L'activation de la protéine NOD2 par le MDP entraîne donc une dimérisation de NOD2 par le domaine NOD. Le domaine CARD est le domaine effecteur ; il permet la transmission du signal, notamment par son interaction avec la protéine Rick/Rip2 intervenant dans la cascade pro-inflammatoire NF-κB [25]. NOD2 fait donc partie d'un système de signalisation complexe dont la connaissance est encore incertaine.

- Ligand de la protéine NOD2

NOD2 appartient à une famille de protéines impliquées dans la réponse immunitaire innée de l'hôte vis-à-vis des agents bactériens. L'immunité innée permet la reconnaissance de structures microbiennes relativement invariantes et une réponse immédiate de l'organisme, à l'opposé de la réponse immunitaire adaptative. Le gène *NOD2* code un récepteur intra-cytoplasmique de la famille des NLR impliqués dans la reconnaissance des PAMP. Les PAMP sont des composants spécifiques du monde microbien, pas ou peu polymorphes, parmi lesquels on trouve le peptidoglycane (PGN) et le lipopolysaccharide (LPS). On distingue trois grandes familles de PRR : les TLR (Toll Like Receptors) situés dans la membrane cellulaire, les RLR (Retinoic acid inductible gene1 Like Receptors) impliqués dans la reconnaissance des virus, et les NLR. Les NLR sont intra-cytoplasmiques et sont caractérisés par la présence d'un domaine LRR et d'un domaine NOD ou NACHT. Seul le domaine effecteur varie.

NOD2 fait partie de la famille des NLR et reconnaît des molécules dérivées du PGN via son domaine LRR [36]. Le PGN est présent chez la très grande majorité des bactéries où il intervient dans la rigidité de la paroi bactérienne. Il forme une enveloppe fine chez les bactéries à Gram négatif et une enveloppe épaisse chez les bactéries à Gram positif. Le PGN est formé de chaînes de composés glucidiques alternant un acide N-acétyl-muramique (MurNAc) et un N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) reliées par des peptides. NOD2 reconnaît des produits de dégradation du PGN, dont le plus petit motif est le MDP, composé d'un acide N-acétyl-muramique et de deux peptides (Figure 10) [34].

Figure 10 : Représentation schématique de la structure répétitive du PGN de la paroi des bactéries Gram-positive et Gram-négative, dont le MDP est la signature minimale (d'après Girardin *et al*., *J. Biol. Chem*., 2003 [34]).



- Fonctions de la protéine NOD2

NOD2 est exprimé dans les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Paneth et les cellules épithéliales de l'intestin [31, 37]. NOD2 fait partie d'un réseau protéique complexe. Suite à l'activation de la protéine NOD2 par le MDP, le domaine CARD va former un complexe avec des protéines intra-cytoplasmiques. L'interaction la plus étudiée est celle de NOD2 avec Rick/Rip2. Rip2 est une serine-thréonine kinase qui interagit directement avec le domaine CARD de NOD2. Cette interaction est indispensable à l'action pro-inflammatoire de NOD2 via le NF-κB. Le recrutement de Rip2 initie une cascade d'événements qui impliquent TAK1 (TGF-β Activated Kinase 1), IKKg (Inhibitor of nuclear factor κB Kinase γ), IkB et c-rel, activant les voies de signalisation NF-κB, MAPK et JUNK (JUN N-terminal Kinase) [25]. Ces voies jouent un rôle central dans la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF, CCL2, IL-5…) et anti-inflammatoires (IL-10). En situation normale, la stimulation de NOD2 par le MDP oriente plutôt la réponse immunitaire vers un profil Th2, caractérisé par l'expression de l'IL-5 et l'IL-4, tandis que la stimulation des TLR par le LPS entraine l'expression de cytokines caractéristiques d'un profil Th1 (TNF, IL-6…) [38]. Néanmoins, en situation d'infection aiguë par un pathogène intestinal, la stimulation de NOD2 oriente la réponse immunitaire vers un profil Th17. L'axe NOD2/Th17 serait donc un élément central du contrôle des pathogènes intestinaux [39]. NOD2 est aussi exprimé au niveau des cellules de Paneth, où il participe à la synthèse des peptides antimicrobiens [37]. Enfin, une étude montre que la protéine NOD2 possède une activité antibactérienne propre, via son interaction directe avec le MDP bactérien. Le domaine LRR de NOD2 interagit directement avec la bactérie *in-vitro*, altère son métabolisme et détruit l'intégrité de sa membrane plasmique. Une activité antibiotique serait aussi exprimée par le domaine LRR d'autres protéines de la famille des NLR, ce qui suggère que le domaine

LRR est un motif conservé de l'immunité innée. Cette activité antibiotique disparait quand le gène *NOD2* porte les mutations associées à la MC [40]. NOD2 est donc impliquée dans la reconnaissance et l'élimination des bactéries intracellulaires [41, 42].

NOD2 intervient aussi dans d'autres mécanismes de défense contre les bactéries invasives. Des études montrent que l'activation de NOD2 est indispensable au mécanisme de l'autophagie dans les cellules dendritiques et les macrophages. NOD2 participe notamment à la formation du phagosome suite à l'entrée d'une bactérie invasive dans la cellule [43, 44].

NOD2 participe également à l'activation de l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multi-protéique qui active la caspase-1, responsable de la maturation et de la sécrétion de l'IL-1β ou de l'IL-18. Ce complexe est activé en cas d'agression bactérienne en particulier par des bactéries invasives. NOD2 interagirait directement avec la caspase-1 en association avec Nalp1 [45], mais le mécanisme exact reste à déterminer.

NOD2 serait aussi impliqué dans la modulation des récepteurs bactériens TLR2, TLR3 et TLR4 [46, 47]. Une étude sur modèle animal a montré que NOD2 aurait un effet inhibiteur sur la voie des TLR en limitant la réponse inflammatoire enclenchée par la liaison du TLR2 à son ligand bactérien [48]. La stimulation de NOD2 régulerait aussi l'expression du récepteur à l'IL-1β, diminuant la réponse inflammatoire. Inversement, la stimulation chronique par l'IL-1β diminuerait la tolérance induite par NOD2 [49]. La stimulation de NOD2 serait donc responsable de l'activation de l'inflammation en cas d'infection aiguë, mais induirait un phénomène de tolérance après une exposition prolongée à un organisme [50]. La perte de cette tolérance due aux mutations du gène *NOD2* pourrait expliquer l'hyperréactivité du système immunitaire inné vis-à-vis de la flore commensale dans la MC.

De plus, il semblerait que le récepteur NOD2 ne soit pas impliqué uniquement dans la régulation de la flore intestinale, mais jouerait aussi un rôle dans le développement de cette flore. En effet, des souris invalidées pour *NOD2* montrent une altération qualitative de la flore ainsi qu'une augmentation des taux microbiens des flores fécales et adhérentes, et cela à un stade précoce du développement. Les mutations de *NOD2* pourraient donc affecter le développement de la structure du microbiote intestinal très tôt dans la vie [51].

Enfin, NOD2 semble aussi impliqué dans la croissance des cellules épithéliales. En effet, des cellules épithéliales invalidées pour le gène *NOD2* ont montré une diminution de prolifération et une augmentation de l'apoptose [52]. Ce défaut de croissance des cellules épithéliales pourrait contribuer aux lésions observées dans la MC.

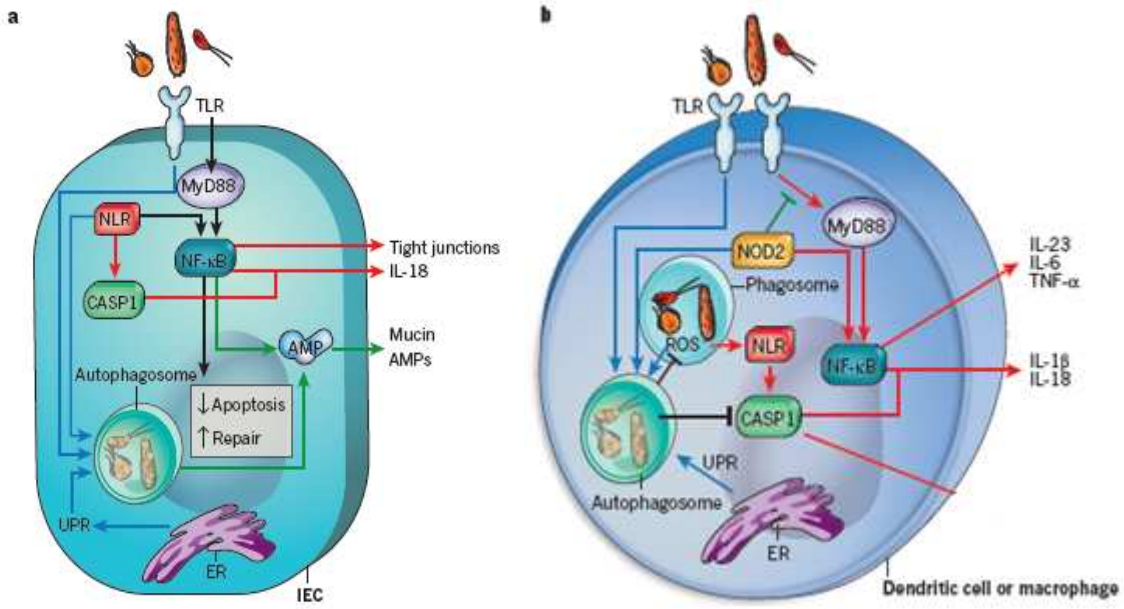


Figure 11 : Maintien de l'homéostasie intestinale et mécanismes de reconnaissance bactérienne par les cellules épithéliales intestinales (a) et les cellules dendritiques ou les macrophages (b). **a.** Dans les cellules épithéliales (IEC), la reconnaissance des PAMPs microbiens par les PRR, comme les TLR et les NLR, maintient l'homéostasie intestinale en stimulant l'expression des peptides antimicrobiens (AMPs) (flèches vertes), et en fortifiant les jonctions serrées (flèches rouges). De plus, le signal induit par les PRR stimule la réponse anti-apoptotique (flèches noires). L'autophagie, induite par les signaux des PRR (flèches bleues), agit en coopération avec les PRR pour augmenter la sécrétion des peptides antimicrobiens et des mucines (flèches vertes). Ces mécanismes participent à la clairance bactérienne. Une mutation de l'un des acteurs peut donc induire un défaut de la fonction barrière intestinale, augmentant la translocation bactérienne et exacerbant la réponse inflammatoire. **b.** Dans les cellules dendritiques et les macrophages, l'inflammation est induite par l'activation du NF-κB, provoquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-23, IL-6, TNF), et par l'activation de la caspase-1 (CASP1) induisant la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 (flèches rouges). Cette inflammation peut être régulée par la suppression du signal du TLR par NOD2 (ligne verte) et par la stimulation de l'autophagie par NOD2 (flèches bleues) atténuant l'activation de la caspase-1 (ligne noire). Un défaut de NOD2 peut donc contribuer à l'inflammation excessive observée dans la MC. (D'après Maloy et Powrie, *Nature*, 2011 [53])

- Polymorphismes de *NOD2*

Trois variants génétiques de *NOD2* ont été rapportés associés à la MC. Ces trois mutations indépendantes représentent 80% des mutations de ce gène : deux mutations faux-sens non conservatrices (R702W et G908R) et une mutation décalante (L1007fsinsC) générant une protéine tronquée de 32 acides aminés [54]. Trente à quarante pourcents des malades atteints de MC portent au moins une de ces mutations, contre 14% dans la population contrôle. Ce chiffre monte à 50% chez les caucasiens.

Quinze pour cent des malades sont homozygotes ou hétérozygotes composites [55, 56]. Plus de 40 nouveaux variants beaucoup plus rares ont été recensés à ce jour, mais ils sont présents chez quelques malades seulement.

L'association entre la présence de mutations *NOD2* et la MC a été établie par de nombreuses études dans des populations différentes. En l'absence de variant génétique fréquent identifié chez les asiatiques et les africains, la mutation du gène *NOD2* n'est pas associée à la MC dans ces populations. Chez les caucasiens, les variations génétiques de *NOD2* ne sont pas réparties de manière homogène. Ainsi, les mutations sont rares en Scandinavie mais fréquentes en Italie ou en Grèce [57]. Au niveau individuel, le risque relatif de déclencher une MC lorsqu'on est porteur d'une des trois mutations principales dépend du nombre et de la nature des mutations. Les odds ratios (OR) de MC sont respectivement de 2, 3 et 4,6 pour les variants R702W, G908R et 1007fsinsC à l'état hétérozygote, alors qu'ils sont respectivement de 3,3, 12 et 35 pour les mêmes variants à l'état homozygote [58].

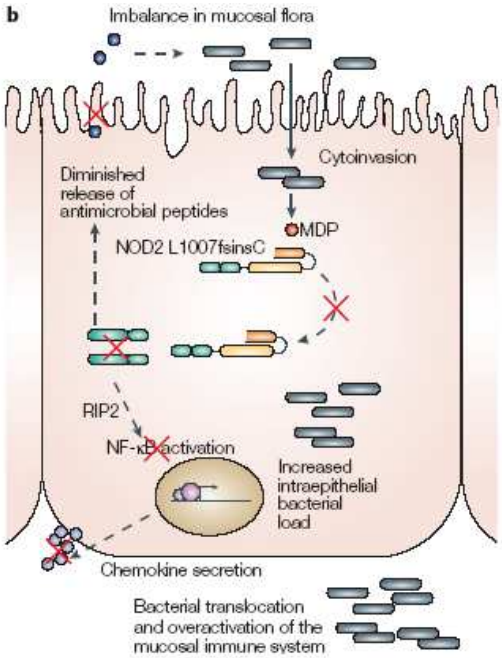
Le gène *NOD2* est à ce jour le facteur génétique le plus important de la MC, mais ce facteur reste modeste, même pour la mutation 1007fsinsC la plus à risque. Les études de corrélation génotype/phénotype ont clairement établi que les patients mutés pour le gène *NOD2* avaient un âge de début de maladie plus jeune de quelques années, qu'ils avaient plus souvent une atteinte iléale, et que la maladie était plus souvent de type sténosant ou fistulisant [59]. Les enfants atteints de MC et porteurs d'une mutation *NOD2* sont susceptibles de recourir plus tôt à la chirurgie que les autres [60]. Une étude récente a montré que la présence de mutation *NOD2* influe sur la prise en charge thérapeutique. En effet, un plus grand pourcentage de patients porteurs de mutations *NOD2* étaient réfractaires aux corticoïdes, mais répondaient bien à un traitement par immunosuppresseurs. A l'inverse, les patients porteurs du gène sauvage, étaient répondeurs aux corticoïdes et présentaient une meilleure réponse aux anti-TNF [61]. Malgré tout, à l'heure actuelle le génotypage systématique n'est pas recommandé.

- Effets des mutations *NOD2*

Plus de 90% des mutations du gène *NOD2* associées à la MC portent sur le domaine LRR. La perte de fonction de ce domaine entraîne une perte de réponse de la protéine NOD2 pour le MDP, renforçant l'idée d'un défaut de clairance bactérienne dans le déclenchement de la maladie, en cas de mutation de *NOD2* [62] (Figure 12). Une perturbation de l'immunité innée, via l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF ou l'Il-1β est aussi imputée à la mutation du gène *NOD2* [63, 64], ainsi qu'un défaut de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [65].

De plus, des patients porteurs d'une mutation sur le gène *NOD2* montrent une diminution de l'expression des défensines, des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth au niveau de l'iléon qui interviennent dans le maintien de l'homéostasie intestinale [66-68]. Cependant, cette hypothèse est controversée et une étude avance l'hypothèse que la diminution de l'expression des défensines est liée uniquement à l'apoptose des cellules de Paneth causée par l'inflammation intestinale [69]. Enfin, la mutation de NOD2 entraînerait une diminution de l'autophagie, renforçant le défaut de clairance bactérienne [43]. Ce défaut de clairance peut se traduire par une augmentation de la translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques. En effet une augmentation de la translocation bactérienne, responsable de péritonite bactérienne, a été associée aux mutations de *NOD2* chez des patients [70].

Figure 12 : Effet d'une mutation de *NOD2* sur l'épithélium intestinal (Schreiber *et al*, *Nat. Rev. Genet.*, 2005 [71]).



Néanmoins, les effets des mutations du gène *NOD2* sur l'immunité muqueuse restent incertains. Les mutations du gène conduisent-elles à une perte ou à un gain de fonction de la protéine ? La perte de fonction du domaine LRR due à la mutation 1007fsinsC empêcherait la reconnaissance du MDP par la protéine et donc préviendrait l'activation de la cascade NF-κB. La perte de fonction conduirait aussi au blocage de la sécrétion des α-défensines (peptides antimicrobiens) par les cellules de Paneth [66]. Cela modifierait la flore intestinale, et empêcherait le rétrocontrôle de NOD2 de s'exercer sur les récepteurs membranaires TLR (notamment TLR4), d'où une réponse inflammatoire exacerbée [72]. D'autres hypothèses évoquent une mutation gain de fonction provoquant une hyperréactivité de la protéine NOD2 au MDP et donc une

surexpression des cytokines pro-inflammatoires. Une étude réalisée sur des souris porteuses de la mutation L1007fsinsC humaine a montré une augmentation de l'expression de l'IL-1β allant dans le sens d'une mutation gain de fonction [64]. Mais cette hypothèse est controversée à cause de la différence observée entre la mutation humaine et la mutation murine de *NOD2*. En effet une étude a montré que des monocytes porteurs de la mutation humaine L1007fsinsC inhibent la transcription de l'IL-10, principale cytokine anti-inflammatoire, mais ne modifient pas l'expression de l'IL-1β, alors que la mutation murine correspondante montre un comportement inverse [73]. On ne peut donc pas affirmer aujourd'hui avec certitude comment les mutations du gène *NOD2* participent aux lésions de la MC.

- NOD2 et autres maladies

Les mutations du gène *NOD2* sont aussi impliquées dans le Blau Syndrome et la sarcoïdose, maladies auto-immunes de la peau et des articulations avec lésions granulomateuses sans atteinte intestinale. Ces mutations sont bien distinctes de celles de la MC. Les mutations concernent principalement le domaine NACHT/NOD de la protéine NOD2. Elles sont associées à un gain de fonction entraînant une sur-activation de la voie NF-κB et une réponse augmentée à la stimulation par le MDP [74].

Ces constatations rapprochent la MC des autres maladies inflammatoires chroniques et permettent une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie.

b) Les autres gènes candidats associés au développement de la maladie de Crohn

Au fur et à mesure, les analyses de liaisons génétiques ont montré leur limite dans l'identification de gènes de prédisposition aux maladies complexes comme la MC. Une étude de Rish et Merikangas [75] a montré l'intérêt du criblage du génome entier par étude d'association à l'aide de marqueurs. Ce système permet la détection de gènes de prédisposition à l'aide de cohortes de patients de l'ordre de quelques milliers. Le criblage du génome entier ne nécessite pas en effet de paires de frères/sœurs atteints mais des malades isolés, ce qui permet de rassembler des cohortes de patients suffisamment grandes.

Ces dernières années, ces études d'association sur génome entier (GWAS) ont permis d'identifier d'autres gènes candidats au déclenchement de la MC parmi lesquels :

- Les gènes situés sur le locus IBD5 codant pour les IL-3, 4, 5 et 113 [76]

- Le gène *XBP1* codant un facteur de transcription impliqué dans le stress du réticulum endoplasmique et dont l'invalidation provoque l'apoptose des cellules de Paneth [77]

- Le gène codant NLRP3, une protéine constituant l'inflammasome [78]

- Certains gènes impliqués dans la réponse Th17 et des gènes codant pour le récepteur de la cytokine pro-inflammatoire IL-23, dont l'expression est augmentée dans la MC [79].

Un des derniers groupes de gènes de prédisposition à la MC identifié par GWAS concerne des gènes impliqués dans le processus de l'autophagie [80]. L'autophagie intervient dans la dégradation et le recyclage des pathogènes intracellulaires. L'autophagie débute par la formation d'un autophagosome qui emprisonne le pathogène cible avant de fusionner avec un lysosome. L'autolysosome résultant de cette fusion va aboutir à la dégradation de son contenu et au recyclage des particules obtenues. L'autophagie contribue à l'immunité innée et adaptative. Au moins deux gènes de prédisposition à la MC participant à ce mécanisme ont été identifiés : *ATGL16L1* et *IRGM*. ATG16L1 intervient dans la formation du phagosome. Des souris invalidées pour le gène *ATG16L1* meurent rapidement après la naissance. Mais des souris chimériques dont les cellules hématopoïétiques sont invalidées pour *ATG16L1* sont caractérisées par une élévation des taux d'IL1β et d'IL18 et sont plus sensibles à la colite induite par le DSS (Dextran sodium sulfate) [81]. De même, des cellules de patients porteurs d'une mutation du gène *ATG16L1* montrent une augmentation de l'expression de l'IL-1β et de l'IL-6, notamment lorsqu'elles sont stimulées par le ligand de NOD2 [82]. Une autre étude montre qu'une réduction du taux d'expression d'ATG16L1 chez la souris entraîne une anomalie des cellules de Paneth, anomalies retrouvées chez les patients atteints de MC et porteurs de mutation du gène *ATG16L1* [83]. Enfin, plusieurs études indépendantes montrent une association entre les mutations des gènes *NOD2* et *ATG16L1* dans le mécanisme de l'autophagie [43, 44, 84]. En ce qui concerne IRGM, il joue un rôle dans la stimulation de l'autophagie par l'IFNγ [83]. Une étude a montré une surexpression d'un microARN dans l'intestin des patients atteints de MC. Ce microARN, miR-196, est responsable d'une diminution de l'expression du gène *IRGM* protecteur, mais pas du gène muté. L'association de la MC avec *IRGM* serait donc liée à l'altération de la fonction d'IRGM par miR-196, provoquant une altération de l'autophagie [85].

La plupart des gènes de prédisposition à la MC sont donc impliqués dans la clairance des pathogènes cellulaires et dans l'immunité innée (Figure 13).

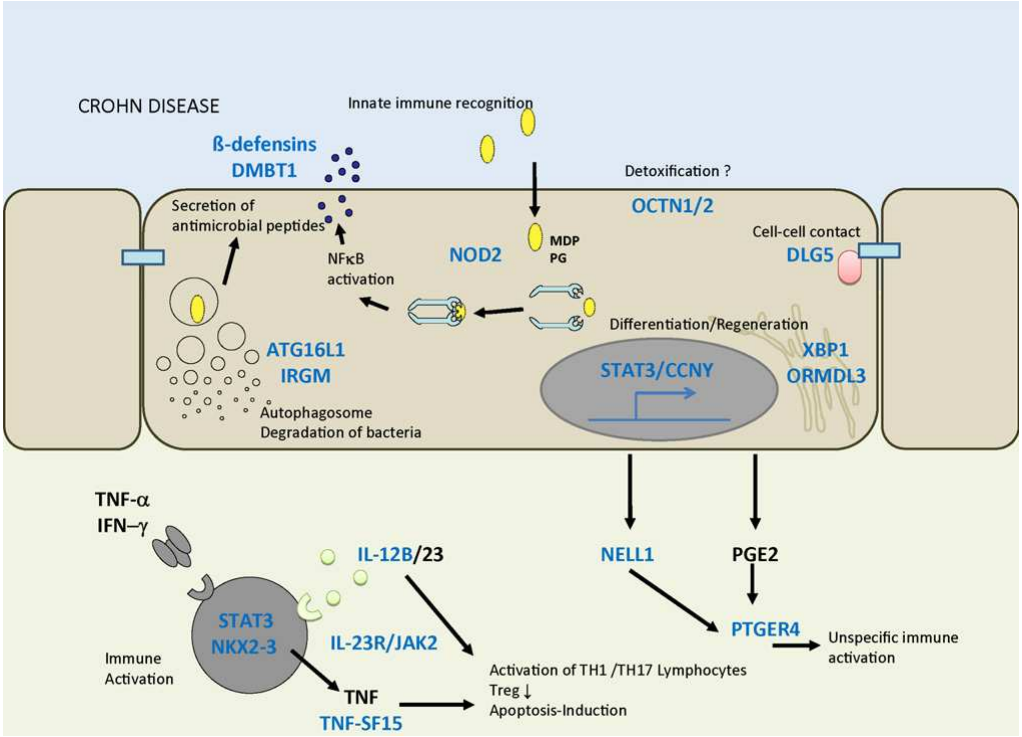


Figure 13 : Carte des risques moléculaires prédisposant à la MC. Le schéma résume une sélection d'associations génétiques récentes avec leur localisation et leur fonction supposées, pouvant être mutées dans la MC (d'après Rosenstiel, *Sem. Immunol.*, 2009 [86]).

Néanmoins, à elle seule l'hypothèse génétique n'explique pas le développement de la MC et de nombreux arguments plaident en faveur de l'intervention de facteurs environnementaux dans la genèse de cette maladie.

2) La barrière intestinale dans la maladie de Crohn :

La muqueuse intestinale représente la plus grande surface d'échange du corps humain. Elle est constamment soumise à des agressions par des facteurs environnementaux et à la pression de la flore intestinale commensale. La barrière intestinale joue un rôle protecteur vis-à-vis de la pénétration dans l'organisme des microorganismes, des virus, des antigènes et des toxines, contenus en grande quantité dans la lumière intestinale. La barrière intestinale possède 4 axes de défense : un axe mécanique correspondant au péristaltisme intestinal, un axe écologique correspondant à la pression de la flore intestinale, un axe épithélial comprenant les cellules de l'épithélium et leurs sécrétions, et un axe immunitaire correspondant au système immunitaire muqueux. Ces fonctions sont en perpétuelles relations, permettant le maintien de l'homéostasie intestinale (Figure 14).

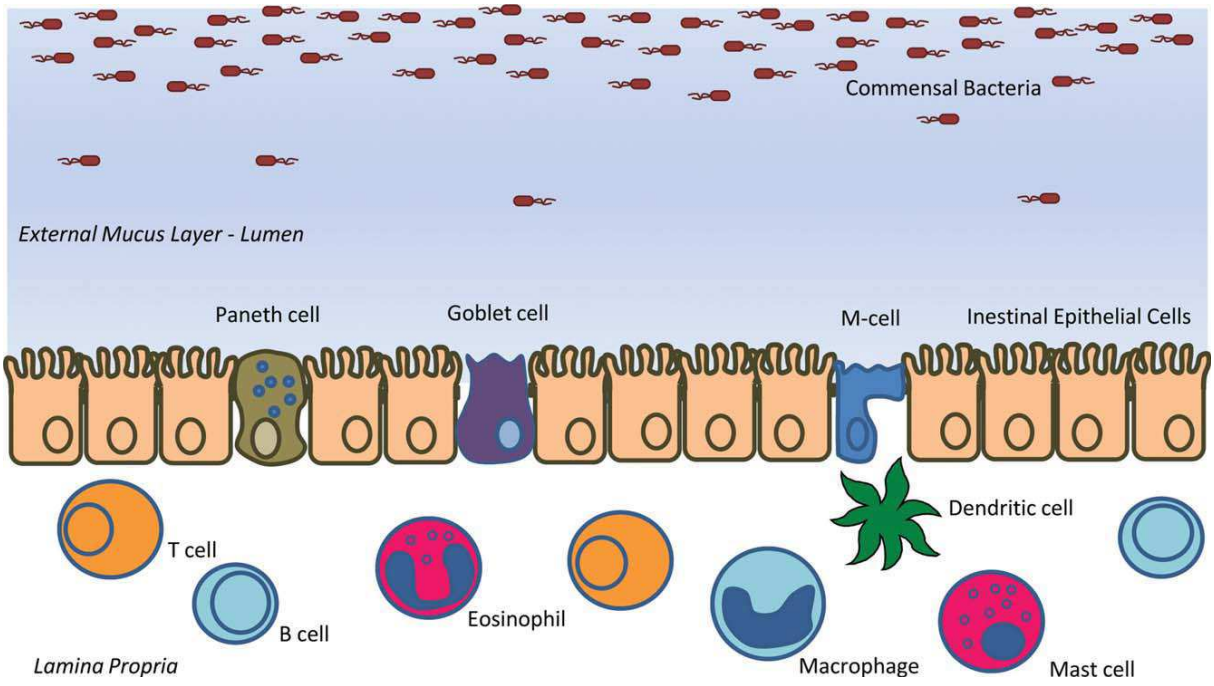


Figure 14 : Composition de la barrière intestinale. (D'après Salim, *IBD*, 2011 [87]).

a) Le microbiote intestinal

- Mise en place de la flore intestinale

Un être humain adulte héberge 10^{14} bactéries dans son tractus digestif, soit 10 fois plus que de cellules eucaryotes composant son corps. La colonisation de la surface digestive commence au cours de la naissance. En l'absence des mécanismes immunologiques spécifiques de l'adulte, le tractus digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif, dans lequel les niveaux de colonisation atteignent rapidement 10^{11} bactéries par gramme de selles. L'exposition à des micro-organismes d'origine maternelle (fécaux, vaginaux et cutanés) et environnementale, de même que ceux issus de l'alimentation constitue la principale source de colonisation bactérienne. Parfois, une antibiothérapie précoce ou un stress important sont susceptibles d'induire des perturbations significatives. Comme vu précédemment, la mise en place de la flore digestive est sous l'influence de récepteurs intestinaux, notamment NOD2 [51]. Les premiers mois de la vie sont donc cruciaux pour l'acquisition de la flore digestive qui ne se stabilise que vers l'âge de deux ans [88]. Il s'installe alors un gradient de concentration allant de 10^4 Unités Formant des Colonies (UFC) par gramme de contenu intestinal au niveau du jéjunum contre 10^7 au niveau de l'iléon terminal, majoritairement représenté par des bactéries aéro-anaérobies facultatives, et jusqu'à 10^{11} UFC dans le côlon . Les bactéries anaérobies strictes sont alors 1000 fois plus présentes que les bactéries aéro-anaérobie facultatives au niveau du côlon. L'amélioration de l'hygiène au cours du dernier siècle dans les pays développés a

modifié la dynamique de colonisation en retardant l'implantation de certaines espèces commensales, telles qu'*Escherichia coli*, par rapport aux pays en développement [89]. Ces modifications de la dynamique de la flore au cours de la petite enfance, comme un appauvrissement de la diversité bactérienne, peuvent conduire à des pathologies plus générales, comme des allergies [90].

- Diversité de la flore intestinale

Chaque adulte héberge dans ses selles environ un millier d'espèces bactériennes différentes dont la plus grande partie (environ 80%) est propre à chaque individu [91]. Si la diversité des espèces du microbiote permet de déterminer une empreinte fécale essentiellement spécifique d'un individu, la composition phylogénétique de la flore montre des groupes constants retrouvés chez tous les individus. Les nouvelles techniques moléculaires ont permis d'affiner la connaissance de la diversité de la flore intestinale en regroupant les bactéries en quatre grands groupes. Le groupe des Firmicutes est le plus représenté (14 à 31% des bactéries). Il comprend des espèces appartenant aux genres *Clostridium, Eubacterium, Ruminococcus, Butyrivibrio.* Le genre *Clostridium leptum*, avec les espèces *Faecalibacterium prausnitzii* et *Ruminococcus albus* est très souvent dominant (16 à 22%) [92]. Le groupe des Bacteroidetes comprend les genres *Bacteroides* et *Prevotella*. Il est toujours présent et partage la dominance avec les Firmicutes (9 à 42%). Le phylum des Actinobacteria est moins souvent détecté comme dominant mais rassemble des bactéries essentielles. Il comprend notamment les Bifidobactéries (0,7 à 10%). Enfin le phylum des Proteobacteria est essentiellement représenté par les entérobactéries (0,4 à 1%) [93]. Les espèces bactériennes observées sont strictement associées à l'écosystème intestinal et sont très adaptées à leur hôte [94]. Néanmoins, la composition du microbiote diffère selon le site digestif et seule la flore fécale est largement étudiée. En effet la flore luminale varie quantitativement et qualitativement tout le long de l'intestin. De plus, il existe des différences de dominance d'espèces entre la flore luminale et la flore adhérente au mucus [91]. Même si la difficulté d'accès à la flore adhérente la rend plus compliquée à étudier, des études ont montré que la flore adhérente au mucus est relativement stable de l'iléon au rectum et stable dans le temps pour un individu donné [95].

- Le métagénome

L'étude du métagénome, qui comprend non seulement l'étude des phylums bactériens, mais aussi l'étude du pool génétique de la communauté microbienne, permettrait d'appréhender le potentiel fonctionnel du microbiote humain. La grande

majorité des bactéries intestinales étant non cultivables, leurs fonctions demeurent inconnues. Le développement de techniques de séquençage contribue au développement des ces connaissances. Le programme MetaHIT a permis de grandes avancées dans l'identification des caractères génomiques conservés et variables de l'écosystème intestinal. Le catalogue MetaHIT contient 3,3 millions de gènes non redondants, soit 150 fois plus que notre propre génome, correspondant à près de 1000 espèces bactériennes, réparti sur trois continents. MetaHIT a permis d'identifier les associations entre les gènes microbiens et les phénotypes humains, connues sous le nom d'enterotypes. Il existerait 3 enterotypes principaux : *Bacteroides, Ruminococcus et Prevotella* [96]. L'étude a établi que près de 40% des gènes bactériens portés par un individu sont partagés avec au moins la moitié des autres individus, d'où la notion de gènes communs. Au niveau des espèces bactériennes, 57 espèces étaient présentes chez 90% des sujets, principalement issues des phylums Firmicutes et Bacteroidetes. L'étude a aussi montré que les fonctions bactériennes les plus abondantes dans le tube digestif n'étaient pas toujours exprimées par les phylums les plus représentés mais aussi par les bactéries peu abondantes, comme par exemple *E. coli* qui exprime 90% des protéines impliquées dans l'assemblage des pili bactériens [96]. Ce programme devrait permettre le développement d'outils diagnostic et pronostic indispensable à l'amélioration de la santé humaine.

- Stabilité de la flore intestinale

Chaque individu possède une flore digestive spécifique et stable dans le temps, ce qui laisse penser que le microbiote est une entité structurée et fonctionnelle. De nombreux facteurs peuvent avoir une incidence sur la stabilité du microbiote intestinal en modulant les niches écologiques et en favorisant les relais de dominance, c'est-à-dire en permettant à une espèce de devenir majoritaire en rassemblant les conditions favorables à son expansion. Le temps de transit, le pH, la qualité et la quantité des substrats exogènes et la qualité du mucus peuvent influer sur la stabilité des communautés microbiennes, mais il semble difficile d'induire des modifications durables dans les populations dominantes. En effet, l'administration de probiotiques conduit à des modifications transitoires de l'équilibre intestinal. Même un stress majeur, comme un traitement antibiotique, peut être suivi d'un retour à l'état initial en un mois environ [97]. Cette capacité de résilience du microbiote intestinal suppose une adaptation très fine entre l'hôte et son microbiote. Le microbiote intestinal ainsi est capable de s'adapter aux changements d'environnement subis par l'hôte, comme une migration géographique vers un climat différent. Dans ce cas on constate que la flore de l'expatrié se modifie pour se rapprocher de celle des autochtones [98].

- Fonction de la flore intestinale

Les bactéries du tractus digestif ont plusieurs fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie intestinale ; elles ont une action sur le métabolisme de l'hôte (glucides, lipides, protéines, gaz), elles forment une barrière protectrice vis-à-vis des pathogènes exogènes et endogènes par compétition pour les nutriments et les sites d'adhérence épithéliaux, elles participent à la production de bactériocines et à la diminution du pH du côlon par production d'hydrogène. La flore intestinale exerce également une action sur la maturation du système immunitaire lymphoïde associé à l'intestin (GALT : Gut-associated lymphoid tissues). En effet, la stimulation permanente du système immunitaire de l'hôte par le microbiote intestinal est nécessaire à son développement et au maintien de l'homéostasie intestinale [99]. Le système immunitaire intestinal doit d'une part développer une réponse protectrice vis-à-vis des pathogènes (virus, bactéries, parasites) et d'autre part induire une tolérance vis-à-vis de la flore commensale. Il a été démontré que des souris axéniques (au tube digestif stérile) présentent de nombreuses anomalies non seulement au niveau du GALT (plaques de Peyer atrophiées, diminution des lymphocytes intra-épithéliaux…) mais aussi au niveau général (rate et ganglions atrophiés) [100].

La présence d'un biofilm bactérien sur la muqueuse intestinale empêche donc l'implantation de bactéries pathogènes, tout en permettant les échanges avec la flore commensale. Ces échanges sont régulés par la présence de récepteurs membranaires (TLR…) ou intracellulaires (NOD…) au niveau de l'épithélium intestinal et des cellules de l'immunité innée reconnaissant des éléments communs au monde bactérien.

b) Les cellules épithéliales

L'épithélium intestinal est issu d'un pool de cellules souches pluripotentes présentes au niveau des cryptes de l'intestin, et donnant naissance à quatre types cellulaires différenciés. Les cellules absorptives, ou entérocytes, représentent la très grande majorité de la population épithéliale intestinale. Les trois autres types sont des cellules sécrétrices : les cellules caliciformes (productrice de mucus), les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. L'ensemble forme un épithélium polarisé constitué d'une monocouche de cellules épithéliales.

Les entérocytes représentent environ 80% de la population totale de l'épithélium intestinal. Ce sont des cellules polarisées présentant une bordure en brosse à l'extrémité apicale. Elles assurent l'absorption, le métabolisme et le transfert des nutriments, depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation sanguine.

Les cellules entéroendocrines, sont plus petites et beaucoup moins nombreuses. En réponse aux nutriments, elles sécrètent dans la circulation générale des hormones et des peptides tels que la substance P et la somatostatine.

Les cellules caliciformes, ou mucosécrétrices (environ 5%), sont des glandes exocrines. Ces cellules assurent la synthèse des différents composants du mucus, comme les mucines. Au sein de l'épithélium colique, la proportion des cellules caliciformes est fortement augmentée (environ 15%).

Les cellules de Paneth assurent la défense non spécifique contre les micro-organismes dans l'intestin. Lors de l'exposition à des bactéries ou à des antigènes microbiens, ces cellules sécrètent des peptides antimicrobiens comme les défensines dans la lumière. Ces cellules ne sont pas retrouvées en condition physiologique au niveau du côlon.

En plus de ces quatre types cellulaires différenciés, l'épithélium intestinal abrite, au niveau des plaques de Peyer, un autre type cellulaire spécialisé, les cellules M. Ces cellules sont de type épithélial, mais leur origine est encore mal élucidée.

c) Les défensines

Les défensines sont une classe de peptides antimicrobiens. Au niveau de l'iléon, les défensines sont stockées dans les granules sécrétoires des cellules de Paneth. Plusieurs travaux ont montré une diminution de l'expression des défensines dans les cellules de Paneth chez des patients atteints de MC. Comme vu au chapitre précédent, un lien a été établi entre les mutations du gène *NOD2* et la diminution de l'expression des défensines dans la MC [66]. Les défensines sont intimement liées au pouvoir antibactérien de NOD2. Le récepteur NOD2 est notamment impliqué dans la régulation de l'expression de l' α-défensine HBD-2. L'expression de HBD-2 est plus importante dans les zones inflammatoires que dans les zones non inflammatoires [67]. La stimulation de NOD2 par le MDP entraine aussi la sécrétion de la défensine HNP-1, absente en présence de la mutation *NOD2* L1007insC [68]. Mais d'autres études montrent que l'expression de défensines ne dépend pas du statut NOD2 du patient, mais serait corrélée à une diminution du nombre de cellules épithéliales au cours de l'inflammation [69].

d) Le mucus

Le mucus constitue une fine couche recouvrant la surface de l'ensemble de l'épithélium intestinal. Son rôle est de protéger les cellules épithéliales en les isolant de la lumière intestinale et de son contenu. Le mucus épithélial se compose de 2 couches : la couche externe, à laquelle adhère la majorité des bactéries de la flore intestinale, et la

couche interne, plus visqueuse, stérile car riche en peptides antimicrobiens, en contact avec les cellules épithéliales. Le mucus est constamment sécrété par les cellules caliciformes pour pallier à l'érosion de la couche externe. Le mucus est principalement composé de mucines polymérisées, principalement issues de l'expression du gène *MUC2*. L'importance de la barrière de mucus a été illustrée chez les souris déficientes pour *MUC2*, où des bactéries ont été retrouvées en contact direct avec les cellules épithéliales intestinales, probablement à l'origine de la colite spontanée développée par ces souris [101]. Les patients atteints de MC montrent une perte de la stérilité de la couche interne du mucus, exposant les cellules épithéliales à la flore commensale [102]. La diminution de concentration des peptides antimicrobiens dans le mucus des patients porteurs de mutations *NOD2* pourrait expliquer l'invasion du mucus par les bactéries de la flore commensale.

e) Les jonctions intercellulaires

La perméabilité de la barrière intestinale est régulée par les jonctions intercellulaires. Les jonctions serrées notamment permettent de fermer les espaces entre les cellules en modulant la perméabilité paracellulaire et la perméabilité transcellulaire. Les jonctions serrées (Zonula Occludens ou ZO) sont composées de protéines transmembranaires qui assurent une perméabilité sélective : occludine, claudines et JAM (Junction Adhesion Molecule), associées à des protéines cytoplasmiques. La famille des claudines compte 24 membres. Le ratio de ces différentes claudines dans la jonction serrée définit la sélectivité aux ions de la jonction [103]. L'occludine est une protéine unique. Elle se situe à proximité des jonctions constituées par les claudines. Elle interagit avec les cellules voisines via ses domaines extracellulaires pour établir le contact cellule-cellule. Une étude récente a montré que l'occludine représentait une cible importante dans les altérations de la barrière induites par les cytokines [104].

Les complexes jonctionnels sont primordiaux dans le maintien de la barrière, où ils sont associés à la régulation de la perméabilité intestinale. Le défaut de barrière inclut donc une augmentation de la perméabilité paracellulaire qui entraîne une augmentation du flux entre les jonctions, pouvant également provenir de l'altération des cellules épithéliales dans des situations d'apoptose, d'érosion et d'ulcération.

L'augmentation de la perméabilité intestinale est un phénomène connu dans les MICI. L'expression de la claudine-5, de la claudine-8 et de l'occludine sont diminuées chez les patients atteints de MC [105]. Chez ces mêmes patients, une augmentation de la formation de pores par la claudine-2 est observée, cette claudine étant connue pour augmenter le passage des ions et des petites molécules non chargées. L'augmentation de l'expression de cette claudine est associée à un écartement plus important des

jonctions serrées et donc d'un accroissement de la perméabilité paracellulaire intestinale [105].

f) Le système immunitaire muqueux

Afin de maintenir l'homéostasie intestinale, c'est à dire reconnaître et éliminer les micro-organismes entériques potentiellement dangereux et maintenir une tolérance vis-à-vis des bactéries commensales, le tractus intestinal possède un réseau lymphoïde complexe, le GALT (tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive) [106]. Le GALT comprend plusieurs structures disséminées le long du tractus digestif, incluant la *lamina propria* et les lymphocytes intraépithéliaux (IEL), et des structures plus organisées comme les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN), les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les plaques des cryptes. Le GALT est le plus grand organe de l'immunité, et contient à lui seul plus de 80% des cellules immunitaires de l'organisme. La structure et la localisation de ses cellules immunitaires en font une barrière efficace qui s'oppose au passage ou à la diffusion des bactéries et toxines de la lumière intestinale vers l'organisme [107].

Le récepteur NOD2, dont les mutations sont retrouvées chez 40% des malades atteints de MC, est impliqué dans le maintien de l'homéostasie des plaques de Peyer. En effet, des souris invalidées pour NOD2 montrent une augmentation de la sécrétion de TNF, ainsi que de la translocation bactérienne au niveau des plaques de Peyer, corrigées en présence d'un traitement antibiotique [108]. NOD2 jouerait donc un rôle régulateur entre le microbiote et les cellules immunitaires des plaques de Peyer.

g) La graisse mésentérique

Le tissu adipeux mésentérique constitue une large surface d'échange entourant les viscères. Il est responsable non seulement du stockage de l'énergie sous forme d'adipocytes, mais aussi de la sécrétion de nombreuses hormones et cytokines [109]. Au cours de la MC, on constate des modifications de ce tissu tant au niveau structurel que fonctionnel. En effet les patients atteints de MC montrent une hypertrophie du tissu adipeux mésentérique, ainsi que l'apparition de graisse « rampante » (creeping fat) entourant les zones enflammées de l'intestin [109]. Une étude montre que ce « creeping fat » aurait perdu son profil sécrétoire adipeux au profit d'un profil inflammatoire [110]. De plus, Behr *et al.* émettent l'hypothèse que la graisse mésentérique pourrait être un réservoir bactérien à l'origine de l'inflammation intestinale [111]. Malgré tout, la graisse mésentérique reste peu étudiée [112].

Des études ont montré une augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients atteints de MC, supposant une perturbation de la fonction de barrière. Cette augmentation est également observée chez les membres sains de la famille des malades [113]. De plus, il a été montré que l'augmentation de perméabilité intestinale chez les patients en rémission était facteur de rechute de la maladie [114].

La dégradation de la barrière épithéliale serait un facteur essentiel au déclenchement de la MC, en permettant l'invasion bactérienne dans la muqueuse intestinale et en rendant possible une interaction excessive entre le microbiote intestinal et le système immunitaire muqueux [87] (Figure 15).

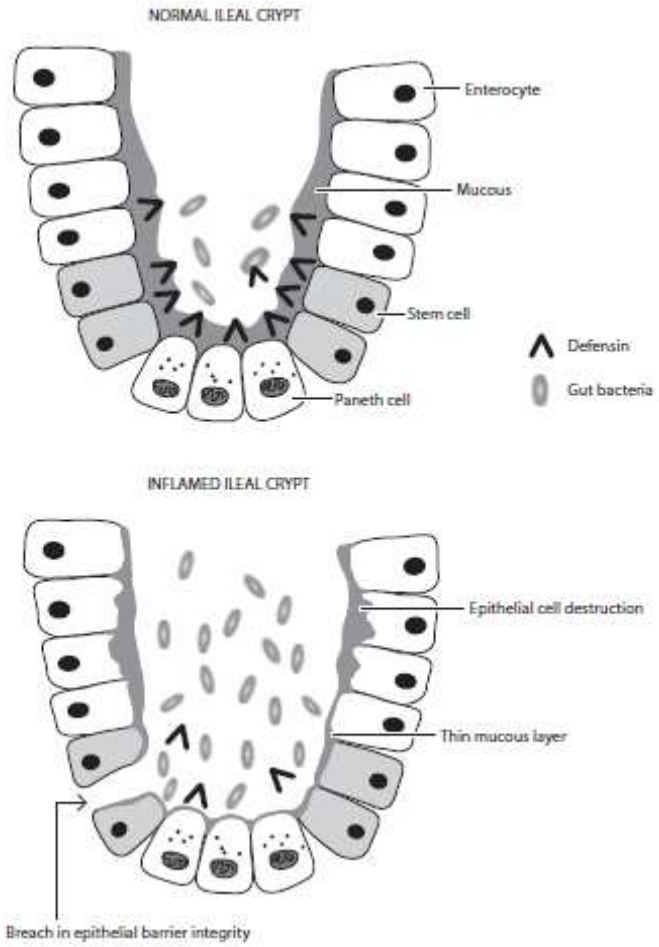


Figure 15 : Représentation d'une crypte iléale montrant l'équilibre entre bactéries intestinales et système immunitaire muqueux. L'inflammation se traduit par une diminution des défensines, une augmentation des bactéries intestinales, une érosion de la couche de mucus et une destruction des cellules épithéliales. (D'après Ramasundara *et al.*, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009 [115]).

3) Les micro-organismes intestinaux dans la maladie de Crohn :

La localisation des lésions de la MC et les nombreux arguments cliniques et expérimentaux associés ont bien vite dénoncé les micro-organismes intestinaux comme agents promoteurs de la MC.

a) Implication de la flore intestinale dans la MC

- Arguments cliniques

La flore bactérienne joue un rôle prépondérant dans l'étiologie de la MC. Plusieurs études ont montré que la concentration des bactéries associées à la muqueuse était significativement plus élevée chez les malades atteints de MICI que chez les sujets témoins [116]. La réintroduction du contenu de l'intestin grêle dans le côlon de malades atteints de MC et traités par chirurgie avec iléostomie et colostomie induit l'inflammation du côlon, sauf si le contenu était rendu stérile par filtration des particules de taille supérieure à 0,22 µm [117]. Une autre étude montre qu'après résection de l'iléon terminal, la récidive arrive chez 70% des malades dans les six mois suivant le rétablissement de la continuité digestive et pas chez les patients avec iléostomie [118]. Suite à ces constatations, une amélioration de la colite suite à un traitement par antibiotiques (métronidazole, ciprofloxacine) ou par probiotiques (*E coli* Nissle, *Saccharomyces boulardii…*) a pu être établie [119, 120].

- Modèles animaux

Des modèles expérimentaux viennent aussi étayer l'hypothèse d'une intervention de la flore dans le développement des MICI. Des modèles murins de colite expérimentale ont ainsi montré que la présence de la flore intestinale est indispensable au développement des lésions chez des souris invalidées pour le gène de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire [121, 122]. Une seconde expérience a montré que toutes les bactéries n'ont pas le même potentiel inflammatoire et ne déclenchent pas le même type de colite. Des souris IL-$10^{-/-}$ monoxénique pour *E. coli* présenteront une colite proximale alors que *Enterococcus faecalis* induira une colite distale [123]. Chez ces mêmes souris IL-$10^{-/-}$, une étude a montré que l'injection intra-rectale de *Lactobacillus sp.* prévenait l'apparition de la colite [124]. Ces résultats suggèrent que le développement de l'inflammation intestinale qui caractérise les MICI serait associé à une modification de la flore et que sa restauration aurait un intérêt thérapeutique.

- Perte de la tolérance vis-à-vis de la flore commensale

Chez l'homme sain, les lymphocytes extraits de la muqueuse intestinale sont normalement tolérants à la flore homologue, mais prolifèrent et s'activent au contact d'une flore hétérologue. Dans la MC active, les lymphocytes extraits de côlon lésés, mais pas de côlon sain, s'activent également en présence d'une flore homologue. Cette rupture de tolérance vis-à-vis de la flore commensale du sujet serait secondaire à l'apparition des lésions et jouerait un rôle dans l'entretien de l'inflammation [125]. De plus, de nombreux anticorps dirigés contre des antigènes de bactéries commensales ont été retrouvés dans le

sérum de patients atteints de MC. La présence d'anticorps anti-Omp (protéine de la membrane externe des *E. coli*) et d'ASCA (dirigés contre *Saccharomyces cerevisiae*) est associée à des formes sévères de la maladie [126].

- Perturbation de la translocation bactérienne

La translocation bactérienne, qui consiste en un passage de bactéries vivantes de la lumière intestinale vers les ganglions mésentériques puis vers la circulation sanguine, semble aussi être perturbée au cours de la MC. En effet de l'ARN bactérien a été plus souvent retrouvé dans des ganglions mésentériques de patients atteints de MC par rapport à des patients contrôles (28% vs 14%) [127]. De plus, la translocation bactérienne, en particulier celle d'*E. coli*, augmenterait le risque d'inflammation systémique postopératoire chez les patients atteints de MC [128]. Enfin, une étude de biopsies de patients atteints de MC a montré une augmentation de la translocation bactérienne chez les porteurs de mutation *NOD2*, via une altération des jonctions cellulaires [129]. Ces éléments suggèrent une perturbation de la fonction barrière intestinale, permettant la pénétration en profondeur de bactéries potentiellement pathogènes.

- Pathogènes candidats

De nombreux arguments cliniques et expérimentaux ont montré l'implication d'agents infectieux, notamment des bactéries invasives dans le déclenchement et/ou la persistance des lésions [130]. Une étude récente émet aussi l'hypothèse de l'intervention de virus dans le déclenchement de la MC [131]. Bien que l'implication d'un agent pathogène particulier dans le développement des MICI soit peu probable, la piste infectieuse reste d'actualité. Plusieurs agents infectieux ont été incriminés par le passé comme le virus de la rougeole, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica, Candida albicans* [132, 133]. Certains d'entre eux ont été abandonnés au vu du manque d'arguments scientifiques en leur faveur. D'autres persistent à l'image de *Mycobacterium avium paratuberculosi*s (MAP), un pathogène intracellulaire responsable d'une zoonose entraînant une entérite granulomateuse présentant des caractéristiques similaires à celles de la MC chez l'homme [134]. MAP a été isolé dans différentes sortes d'échantillons provenant de malades atteints de MC (muqueuse, sang) [135]. Cependant son rôle dans le déclenchement des MICI n'est pas encore démontré.

L'ensemble des ces observations, renforcées par l'association de la MC avec des gènes impliqués dans la reconnaissance et/ou la clairance bactérienne (voir chapitre précédent), est en faveur du rôle clef du microbiote intestinal dans la MC. Son déséquilibre (dysbiose) est fortement suspecté comme facteur aggravant ou causal des MICI.

b) La dysbiose chez les patients atteints de Maladie de Crohn

La modification de la flore bactérienne intestinale est bien documentée dans de nombreuses pathologies comme le syndrome de l'intestin irritable [136], l'obésité [137], le diabète [138] ou les allergies [139]. La dysbiose dans la MC est un facteur reconnu, même si un lien de causalité ne peut être véritablement établi [140, 141]. La flore intestinale est un subtil équilibre entre bactéries commensales et pathogènes, défini par la génétique de l'hôte et l'action du système immunitaire muqueux [142]. L'amélioration des techniques moléculaires a permis d'appréhender le microbiote dans son ensemble. Bien que l'étude de la flore adhérente soit plus pertinente dans l'étude de la MC, la flore fécale, plus facile d'accès, est encore largement étudiée. Des études comparant des patients atteints de MC et des patients sains ont montré une augmentation de la concentration bactérienne adhérente à la muqueuse par rapport aux sujets sains concernant à la fois les bactéries anaérobies et aérobies facultatives [116, 143]. Comme vu précédemment, un défaut de la fonction barrière de l'intestin permettrait aux bactéries d'envahir la muqueuse et de coloniser les cryptes intestinales, normalement stériles [144]. Plusieurs études indépendantes ont montré une diminution des bactéries du groupe des *Firmicutes* aussi bien dans la flore fécale que dans la flore adhérente à la muqueuse, et en particulier *Faecalibacterium prausnitzii.* Cette dernière bactérie aurait des propriétés anti-inflammatoires et son absence dans la flore intestinale des patients opérés serait prédictive de rechute. *F. prausnitzii* serait l'espèce la plus sous-représentée chez les malades atteints de MC par rapport aux sujets sains [143, 145]. A cette diminution des bactéries bénéfiques, comme les Bifidobactéries ou *F. prausnitzii*, s'ajoute une augmentation de bactéries potentiellement pathogènes, comme les *Bacteroides* et les entérobactéries, notamment les *E. coli* entéro-adhérents chez plus de 50% des patients [146-149].

De plus, une diminution de la diversité générale des flores fécale et adhérente a été constatée chez les malades atteints de MC en phase active [150, 151]. Néanmoins, les études ne montrent pas de différence de flore entre zone lésée et zone saine chez les malades atteints de MC [152]. Ces modifications sont propres à la MC et sont différentes des autres maladies inflammatoires de l'intestin [153]. Enfin il existe une instabilité de flore entre les périodes de poussée et de rémission, alors que le microbiote intestinal d'un sujet sain adulte reste particulièrement stable au cours de sa vie [148].

Un déséquilibre de la flore normale survenant avant un premier épisode de MC serait donc un facteur environnemental essentiel dans l'histoire de la maladie. La combinaison d'une densité bactérienne supérieure près de la muqueuse, de populations plus importantes de bactéries potentiellement pathogènes et de la diminution de bactéries anti-inflammatoires favoriserait l'entretien du déséquilibre de la flore. Une étude a montré que l'expression de

NOD2 dépend de la présence d'une flore commensale, et que NOD2 joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie intestinale en limitant la colonisation iléale par des bactéries pathogènes [154]. De plus, une étude clinique associe les mutations des gènes *NOD2* et *ATG16L1* aux modifications de flore observées chez les patients atteints de MC [155]. Chez les sujets génétiquement prédisposés, une plus grande susceptibilité aux pathogènes induirait une réponse immunitaire muqueuse dérégulée conduisant à une perte de tolérance vis-à-vis de la flore commensale et à une inflammation intestinale. Une dysbiose générale, permettant l'implantation d'un pathogène invasif spécifique, favoriserait ainsi une boucle colonisation/inflammation.

c) Association entre maladie de Crohn et *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC)

- *Escherichia coli* et maladie de Crohn

Escherichia coli est la bactérie à Gram négatif aéro-anaérobie la plus représentée au niveau de la flore intestinale commensale. Elle joue un rôle important dans la stabilité de la flore luminale et dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Bien que normalement non pathogènes et non invasives sauf en cas d'atteinte de la barrière intestinale, certaines souches ont acquis des facteurs de virulence leur permettant d'adhérer à la muqueuse, de proliférer avec un potentiel invasif et de déclencher toutes sortes de pathologies (*E. coli* entéro-hémorragique, *E. coli* entéro-toxinogènique, *E. coli* entéro-invasif…) [156]. Ces souches pathogènes induisent au contact de l'hôte une réponse inflammatoire cellulaire avec sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et recrutement des polynucléaires neutrophiles. La détection par l'hôte de *E. coli* est assurée par les récepteurs TLR5 reconnaissant la flagelline bactérienne et par les récepteurs intracellulaires NOD reconnaissant des éléments du PGN, comme le MDP [34, 157].

Au cours des MICI, une augmentation du nombre de *E. coli* adhérents à la muqueuse au niveau de lésions iléales est observée (50 à 100 % du nombre total de bactéries) [158]. Une autre étude sur des biopsies rectocoliques de patients atteints de MC montre une augmentation de *E. coli* chez les malades, et une concentration plus importante de *E. coli* virulents parmi eux [149]. La présence d'antigènes de *E. coli* est retrouvée dans 57% des prélèvements intestinaux de patients atteints de MC et le marquage par anticorps spécifiques de *E. coli* est observé dans les macrophages de la lamina propria et dans les ganglions mésentériques. Plusieurs études indépendantes ont retrouvé la présence de *E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2, c'est à dire possédant des propriétés d'invasion, adhérent à la muqueuse ou au sein de la muqueuse de patients atteints de MICI [159, 160].

- Identification et propriétés d'AIEC

Un nouveau pathovar de *Escherichia coli* capable d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales a été identifié au niveau des lésions iléales de patients atteints de MC [161]. Cette bactérie, ne possédant pas les caractéristiques de virulence des autres *E. coli* pathogènes, a été nommée AIEC, pour *Escherichia coli* adhérent et invasif (sérotype O83:H1). Cette bactérie se retrouve avec une fréquence de 36,4% dans l'intestin des malades atteints de MC, principalement au niveau iléal, contre 6.2% chez les sujets sains [162]. Une étude sur des biopsies de côlon et d'iléon de patients atteints de MC et d'individus contrôles a montré une richesse équivalente en *E. coli* entre les 2 groupes, mais une plus haute prévalence et une plus grande diversité des AIEC chez les patients atteints de MC par rapport aux contrôles (51,9% vs 16,7%) [163]. De plus, l'identification de souches d'AIEC dans l'intestin de jeunes patients atteints de MC pédiatrique à été récemment démontrée [164].

La souche type LF82 a été la première et est donc la plus étudiée des souches d'AIEC. AIEC possède des propriétés d'adhésion et d'invasion de la muqueuse intestinale unique, ainsi que la capacité à survivre et à se multiplier dans les macrophages sans induire d'apoptose (Figure 16) [165]. AIEC serait responsable de l'inflammation de la muqueuse intestinale via un emballement de la réponse immunitaire. En effet, les macrophages infectés par les souches d'AIEC LF82 sécrètent des taux importants de TNF [165, 166]. La réplication de LF82 dans les phagolysosomes des macrophages serait même indispensable à la survie de la bactérie dans la cellule, et serait potentialisée par la sécrétion de TNF [167, 168]. *E. coli* avait déjà été impliquée dans la formation de granulomes puisque des antigènes et de l'ADN bactérien de *E. coli* avaient été mis en évidence au sein de granulomes issus de malades atteints de MC. Dans un modèle de granulome expérimental, la souche AIEC LF82 entraine l'agrégation des macrophages infectés, et le recrutement des lymphocytes [169].

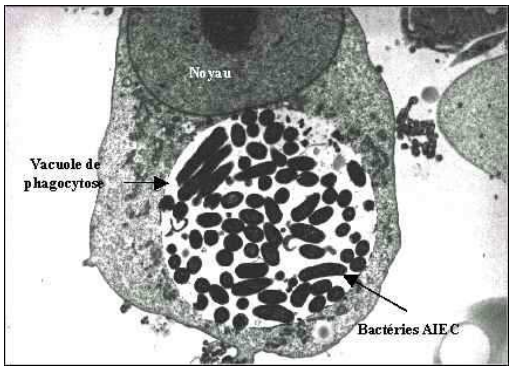


Figure 16 : Visualisation d'*E. coli* AIEC dans une vacuole de phagocytose de macrophage par microscopie électronique (Glasser, *et al., Infect. Immun.*, 2001 [165]).

La souche AIEC LF82 serait aussi impliquée dans l'augmentation de la perméabilité intestinale *via* une altération des jonctions serrées de la Zonula Occludens. L'infection d'une monocouche de cellules polarisées par LF82 entraine une rupture de la barrière épithéliale avec une augmentation de la perméabilité cellulaire et une réorganisation des protéines de jonction cellulaire [170], caractères retrouvés chez les patients atteints de MC.

AIEC a donc tous les facteurs requis pour coloniser la muqueuse intestinale, traverser la barrière épithéliale, interagir avec les macrophages résidents, induire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et entretenir un état inflammatoire conduisant à des lésions chroniques [171].

- Facteurs de virulence d'AIEC dans la maladie de Crohn

Malgré le séquençage complet du génome de plusieurs souches d'AIEC, les gènes de virulence de ce nouveau groupe sont encore mal connus [172]. L'étude du génome de la souche LF82 montre des similitudes avec de nombreuses souches pathogènes. Selon cette étude, AIEC LF82 pourrait dériver d'une souche d'ExPEC (Extra-intestinal Pathogenic *E. coli*) ayant acquis des caractères de virulence de *Salmonella* et de *Yersinia* [173]. La capacité de la souche LF82 à former un biofilm stable a conduit les recherches vers les facteurs d'adhésion et d'invasion de la bactérie, contribuant à sa virulence [174].

Une étude récente montre que la souche AIEC LF82 est capable d'adhérer à la bordure en brosse d'entérocytes de souris exprimant le récepteur humain CEACAM6, et que l'expression de ce récepteur est augmentée suite à l'infection par AIEC de cellules caco2 [175]. CEACAM6 est surexprimée chez 35 % des malades atteints de MC, principalement au niveau iléal, lieu de forte prévalence de la bactérie AIEC. Chez les malades prédisposés exprimant anormalement CEACAM6 au niveau iléal, AIEC potentialiserait sa propre colonisation de l'épithélium en augmentant l'expression de CEACAM6 via la sécrétion de TNF [176]. De même, la protéine Gp96, marqueur du stress du réticulum endoplasmique, est surexprimée à la surface apicale des cellules épithéliales chez 50% des patients atteints de MC. Une étude a montré que Gp96 interviendrait dans le mécanisme d'invasion de la souche LF82 via sa protéine membranaire OmpA [177].

Enfin, le LPF (Long Polar Fimbriae) est impliqué dans l'invasion des plaques de Peyer via les cellules M. L'érosion des plaques de Peyer est considérée comme un stade précoce de la MC. Une souche d'AIEC LPF-négative est beaucoup moins capable d'adhérer aux plaques de Peyer et de transloquer via les cellules M. La prévalence de souches d'AIEC arborant l'opéron *lpf* est plus élevée chez les patients atteints de MC. Cette capacité pourrait expliquer les lésions précoces observées au niveau des plaques de Peyer [178]. Néanmoins, ces résultats sont à modérer par une étude récente montrant que la souche LF82 adhérait de la même façon à des biopsies de patients atteints de MC ou de contrôle sain, avec une

préférence iléale pour les contrôles sains. Les facteurs permettant l'adhésion de la LF82 ne joueraient donc pas un rôle déterminant dans le déroulement de la MC, orientant vers une altération d'autres fonctions de l'hôte [179].

Une autre étude utilisant un modèle de nématode a montré l'importance d'autres gènes dans la pathogénicité de la LF82. En effet l'invalidation du gène *Hfq* codant pour une chaperone impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de la souche LF82 empêche l'invasion de *C. elegans* par la bactérie. Les mutants *LF82Δhfq* ne sont plus mobiles, ne peuvent plus envahir les cellules et sont plus sensibles au stress, introduisant un nouveau facteur de pathogénicité de la LF82 [180].

- AIEC et barrière intestinale

L'homéostasie intestinale se caractérise par une réponse immunitaire vis-à-vis des pathogènes et par une tolérance vis-à-vis de la flore commensale. La présence d'un biofilm bactérien sur la muqueuse intestinale empêche donc l'implantation de bactéries pathogènes. *E. coli* AIEC se heurte donc à la flore commensale pour envahir la muqueuse intestinale. En effet, il a été démontré que la souche AIEC LF82 ne pouvait plus envahir des cellules Caco-2 recouvertes de *Lactobacillus casei* [181], ainsi que des cellules épithéliales pré-incubées ou co-incubées avec une souche d'*E. coli* non pathogène, *E. coli* Nissle 1917 [182, 183]. *E. coli* AIEC ne serait donc capable d'envahir les cellules épithéliales uniquement si le biofilm est inefficace ou absent. Comme vu précédemment, la dysbiose de la flore intestinale est une caractéristique de la MC. L'implantation d'AIEC dans la muqueuse intestinale pourrait être une conséquence de ce déséquilibre associé à une mutation génétique diminuant la clairance bactérienne.

- Association entre AIEC et mutations génétiques

Nous avons décrit dans le paragraphe précédent l'implication des principaux gènes de susceptibilité associés à la MC dans la reconnaissance d'éléments bactériens et les interactions avec le système immunitaire : *NOD2, IL23R* et *Th17, ATG16L1*…. Des études non publiées de notre laboratoire ont montré une augmentation de la présence *d'E. coli* dans les selles de patients porteurs d'une mutation du gène *NOD2*. Cette augmentation de la colonisation intestinale par *E. coli* est plus importante chez les patients homozygotes pour la mutation. Des tests d'invasion ont montré que ces patients étaient porteurs de souches invasives. L'expression iléale des α-défensines dans la MC est diminuée en cas de mutation du gène *NOD2,* participant à la défaillance de la barrière antibactérienne [66]. De plus, des monocytes invalidés pour le gène *NOD2* et infectés par la souche AIEC LF82 présentent une altération de la réponse immunitaire précoce conduisant à une diminution de la clairance bactérienne [184]. Il existerait aussi un lien entre les mutations des gènes *ATG16L1* et

IRGM, liées à un défaut d'autophagie, et la colonisation par AIEC chez les patients atteints de MC. En effet, des macrophages déficients pour les gènes de l'autophagie ont montré une plus grande réplication d'AIEC LF82 dans les phagolysosomes, alors que cette déficience n'influe pas sur les autres types *d'E. coli* [185]. Enfin le polymorphisme de *NOD2* et d'*ATG16L1* est préférentiellement associé à la forme iléale de la MC, tout comme la localisation de la bactérie AIEC est principalement iléale. Il existerait donc une association spécifique entre ces mutations et la colonisation par la bactérie AIEC.

4) Les facteurs associés à l'environnement dans la maladie de Crohn :

L'augmentation de la fréquence des MICI dans les pays développés au cours des cinquante dernières années et l'émergence de ces maladies dans les pays en développement parallèlement à leur occidentalisation, orientent vers la recherche de facteurs environnementaux liés à l'altération de l'environnement et aux nouveaux comportements alimentaires. Le faible taux de concordance entre les vrais jumeaux, l'hétérogénéité spatiale de la MC et les gradients existant à l'intérieur d'un même pays confortent cette hypothèse. L'étude des populations migrantes de pays à faible incidence vers des pays à forte incidence et la fréquence des formes conjugales permettent de dégager des facteurs qui favoriseraient la survenue de la maladie [8]. En effet, l'augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients atteints de MC est retrouvée chez 23% des conjoints de malades, alors qu'elle n'est qu'à 3% chez les contrôles [186]. De plus, des études familiales ont montré qu'un tiers des enfants asymptomatiques de patients atteints de MC avaient des concentrations fécales de bactéries anaérobies augmentées par rapport à des contrôles sains [187]. Néanmoins, la modification de l'incidence de la MC chez les populations migrantes n'est réelle que chez les sujets migrants durant l'enfance, ce qui oriente les recherches vers des facteurs intervenant dans la jeunesse [188].

a) Les facteurs reconnus : le tabac et l'appendicectomie

Le tabac est maintenant connu pour favoriser l'apparition de la MC. En effet, les fumeurs ont deux fois plus de risques de développer une MC que les non fumeurs. De plus, la consommation de tabac pendant la maladie aggrave les symptômes avec une augmentation du nombre de poussées (+50%), une colite plus sévère, des risques de complication plus importants, et des récidives plus fréquentes [189]. L'arrêt de la consommation de tabac est bénéfique sur le déroulement de la maladie dès la première année. C'est pourquoi l'arrêt du tabac est vivement recommandé chez les malades.

L'appendicectomie augmente le risque d'apparition de MC en fonction du sexe, de l'âge du patient au moment de l'opération et des complications liées à l'appendicite [190]. En effet,

les patients avec un antécédent d'appendicite perforée ont un pronostic de MC plus mauvais avec une colite plus agressive et un recours à la chirurgie plus important. L'augmentation du risque perdure plus de 20 ans après l'appendicectomie, notamment en cas d'appendicite perforée (RR : 2,11). Néanmoins, les patients opérés avant l'âge de 10 ans ont un risque moindre de déclarer une MC (RR : 0,48).

b) Les facteurs alimentaires et la pollution

La modification des habitudes alimentaires est depuis longtemps un argument avancé comme facteur de risque des MICI. L'apparition de la MC dans les pays en développement qui adoptent un mode de vie occidental a conduit les chercheurs dans cette direction. Des études ont montré que l'augmentation de consommation de produits industriels, de graisse animale, et surtout de sucre (RR : 3,4-4,6), ainsi que les microparticules issues de la pollution pouvaient concourir à l'apparition de la maladie [191]. Une étude japonaise a montré qu'un régime semi-végétarien riche en fibres préviendrait le risque de rechute de MC sur 2 ans [192], et une étude canadienne a montré qu'un régime riche en légumes, fruits, poissons et acides gras de type oméga-3, protégerait du risque de développer une MC chez les enfants [193]. Ces différents composés alimentaires pourraient agir soit directement sur le système immunitaire intestinal, soit en modifiant la composition de la flore intestinale [194].

La pollution industrielle est un facteur avancé pour expliquer l'explosion de la MC dans les pays développés. L'hétérogénéité spatiale de la MC dans les différentes régions de France et en particulier le Nord-Pas-de-Calais plaide en faveur de facteurs liés à l'activité industrielle. Les polluants incriminés regroupent le dioxyde de souffre, les oxydes nitriques, le monoxyde de carbone, les composés organiques volatils et les métaux toxiques, notamment l'aluminium. Plusieurs d'entre eux sont déjà reconnus pour leurs propriétés pro ou anti-inflammatoires [195]. Ces microparticules issues de la pollution se retrouvent au niveau intestinal via la nourriture et l'eau potable, et pourraient donc participer au déclenchement de l'inflammation intestinale.

c) L'hypothèse de l'hygiène

L'amélioration des conditions de vie au cours du XXème siècle et la diminution de l'exposition aux agents pathogènes pendant l'enfance ont conduit à une diminution de l'incidence des maladies infectieuses. Parallèlement la prévalence des MICI a augmenté pendant la même période [196]. Des études pédiatriques ont montré que le contact avec les animaux de la ferme, la compagnie d'un animal domestique avant 5 ans ou la consommation régulière de l'eau du robinet, protégeraient de l'apparition de la MC à l'âge adulte [197]. Paradoxalement, les infections intestinales ont aussi été incriminées comme facteur de risque des MICI. Plusieurs études notaient une fréquence quatre fois plus importante des

infections périnatales, ainsi qu'un plus grand nombre de gastroentérites et de diarrhées infectieuses durant l'enfance des patients développant par la suite une MICI [198-200]. Une étude clinique montre notamment une corrélation entre des antécédents de gastroentérites à *Salmonella* et *Campylobacter* et l'apparition de MICI dans les années qui suivent [201].

d) Les antibiotiques

L'augmentation de l'utilisation des antibiotiques durant les 50 dernières années dans les pays industrialisés est corrélée à l'augmentation de cas de MC. Les antibiotiques sont connus pour être des perturbateurs temporaires de la flore intestinale, entraînant un rebond anarchique de cette flore après l'arrêt du traitement. Ce déséquilibre peut perdurer plusieurs mois selon la durée et l'intensité du traitement [202]. Une étude récente a montré qu'une semaine après l'arrêt d'un traitement antibiotique ayant provoqué une perturbation profonde du microbiote, la flore intestinale tendait à retrouver un état stable mais montrait une composition différente de l'état initial [203]. La prise d'antibiotiques avant le déclenchement de la maladie a été associée à la MC dans de nombreuses études cliniques. En effet, des patients atteints de MC ont reçu plus d'antibiotiques dans les 2 à 5 ans précédant le diagnostic de la maladie par rapport à des témoins sains [204]. Une autre étude a montré que l'exposition à une maladie infectieuse nécessitant l'usage d'antibiotiques avant l'âge de 5 ans augmentait le risque de survenue de MC à l'âge adulte [205]. Enfin, une étude de Shaw *et al*. a montré que des enfants atteints de MC avaient 3 fois plus de chance d'avoir reçu des antibiotiques pendant la première année de leur vie [206]. Ces données rétrospectives ont été confirmées par une étude prospective récente montrant que la consommation d'antibiotiques dans l'enfance augmentait le risque d'apparition de MC pédiatrique, en corrélation avec le nombre de prise des médicaments [207].

Les antibiotiques pourraient donc être responsables d'une rupture de la fonction barrière intestinale. Une étude a montré qu'un traitement antibiotique préalable à une infection par *Salmonella typhimurium* chez la souris entrainait une modification qualitative de la flore intestinale, sans modification quantitative. Cette seule perturbation de la flore était responsable d'une plus grande pathogénicité de la bactérie [208]. De même, un traitement antibiotique préalable à une infection par *Citrobacter rodentium* aggrave la colite chez les souris, en provoquant des modifications qualitatives de la flore intestinale et en réduisant l'épaisseur de la couche de mucus [209]. Ces données suggèrent que la perturbation du microbiote intestinal par les antibiotiques peut provoquer une rupture de l'homéostasie intestinale en détruisant les bactéries protectrices contre les pathogènes intestinaux.

Associé à une mutation d'un gène impliqué dans la clairance bactérienne et à une possible augmentation de la translocation bactérienne, un tel déséquilibre de la flore pourrait

conduire à l'implantation de bactéries à pouvoir pathogène plus élevé et à une activation inadaptée du système immunitaire vis-à-vis de la flore endogène, provoquant une inflammation chronique et la formation de granulomes, premiers stades de la maladie.

e) Autres facteurs d'inflammation

Il est peu probable que la seule présence de facteurs génétiques ou environnementaux soit responsable du déclenchement de la MC. Une inflammation aiguë, associée aux facteurs précédemment cités pourrait conduire à l'emballement du système immunitaire et au développement de l'inflammation chronique caractéristique de la MC

- Les médicaments

De nombreux médicaments peuvent être à l'origine d'une inflammation aiguë. Les plus étudiés sont l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). De nombreuses études ont montré le potentiel inflammatoire de ces composés sur la muqueuse intestinale. Les AINS et l'aspirine ont ainsi été associés à l'apparition de lésions gastroduodénales, allant de l'érosion à l'ulcère [210]. Une corrélation entre la prise régulière d'aspirine et l'apparition d'une MC a été récemment démontrée [211]. Ces médicaments sont courants et fréquemment utilisés par la population dans le traitement de la douleur.

- Le stress

Le stress aurait aussi son rôle à jouer dans la survenue et la rechute de la MC. L'exposition de souris à un stress social modifie la stabilité et la composition de la flore intestinale avec une diminution des *Bacteroides* au profit des *Clostridium*. Le stress augmente aussi la translocation bactérienne, ainsi que l'expression de cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et MCP-1 [212]. Des modèles animaux ont aussi montré une influence du stress sur le déclenchement et la réactivation d'une inflammation [213]. Mais cela n'a pas été confirmé chez l'homme.

L'étiologie de la MC reposerait donc sur un déséquilibre de la flore intestinale commensale, potentialisé par un désordre immunitaire chez des patients génétiquement prédisposés. Ce déséquilibre permettrait à des bactéries pathogènes, comme *E. coli* AIEC, de coloniser les macrophages intra-épithéliaux, provoquant une inflammation persistante responsable de l'apparition de granulomes (Figure 17).

Une destruction momentanée de la flore intestinale normale par des antibiotiques, et donc une diminution de la fonction barrière, permettrait l'invasion de l'épithélium intestinal par des bactéries pathogènes et notamment les AIEC. Une mutation du gène *NOD2*, responsable d'une diminution de la clairance bactérienne, et une possible translocation d'AIEC vers les ganglions mésentériques, conduiraient à une activation inadaptée du système immunitaire vis-à-vis de la flore endogène, provoquant une inflammation chronique et la formation de granulomes, premiers stades de la maladie.

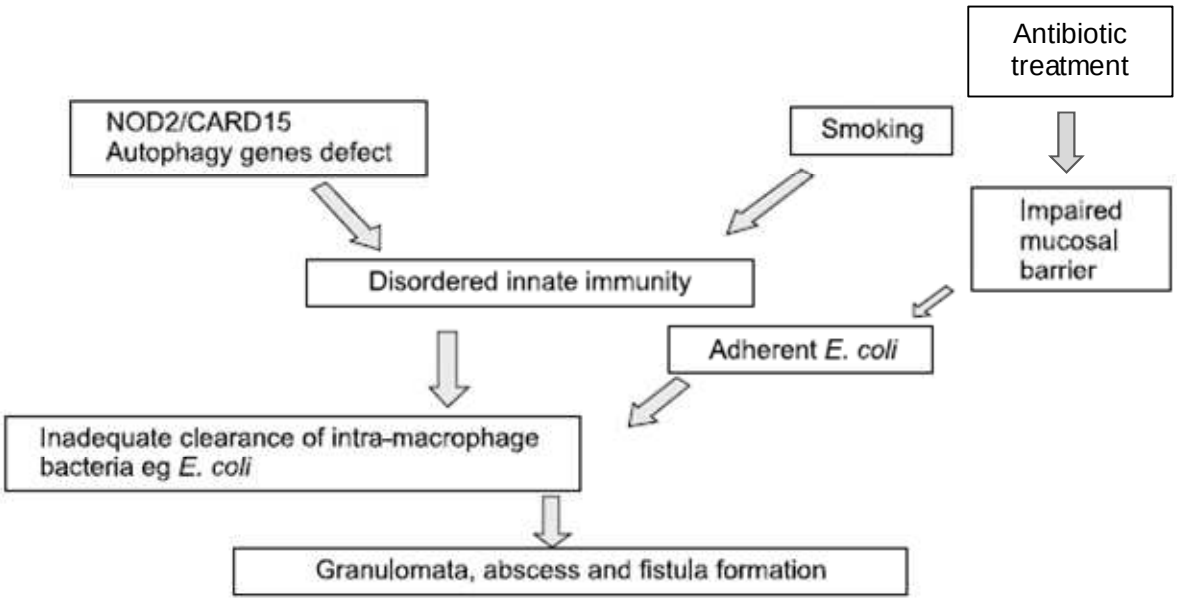


Figure 17 : Un modèle possible de pathogénèse de la MC. (d'après Friswell *et al.*, *Gut Liver*, 2010 [214]).

III) MODELES ANIMAUX UTILISES DANS L'EXPLORATION DES MICI

La compréhension des mécanismes conduisant à la survenue des MICI a été permise grâce à l'étude de modèles animaux développant des colites inflammatoires. Il existe des animaux présentant une colite spontanée, mais la plupart sont des animaux génétiquement modifiés. Ces animaux peuvent être invalidés pour un gène (animaux Knock-out) ou exprimer anormalement un gène (animaux transgéniques). D'autres développent des colites induites soit par le transfert de cellules activées (transfert de lymphocytes T chez la souris immunodéficiente SCID), soit par des agents chimiques (indométacine, acide trinitrobenzène sulfonique…), soit par des agents infectieux (*Citrobacter rodentium*…). La majorité des lésions chroniques induites dans ces modèles est située dans le côlon.

1) Les modèles d'inflammation spontanée :

Il s'agit de souris n'ayant subi aucune induction chimique de colite ou de modification génétique, et qui développent de manière spontanée une inflammation intestinale.

a) Les souris *SAMP/Yit*

Cette souche murine développe de manière spontanée une inflammation intestinale transmurale localisée au niveau de l'iléon semblable à la MC [215]. La progression de la colite ainsi que l'augmentation de la perméabilité intestinale sont de type Th1- et Th2-dépendantes. Dans ce modèle, une altération des cellules de Paneth ou des cellules caliciformes est également observée, et pourrait jouer un rôle dans l'initiation de l'inflammation. A trois semaines de vie, une augmentation de la perméabilité intestinale est observée chez ces souris.

2) Les modèles génétiquement modifiés :

Dans la plupart de ces modèles, les lésions intestinales chroniques sont associées à une augmentation de la synthèse de cytokines inflammatoires de type Th1 (TNF, IL-2, IFNγ…). Néanmoins, des études ont mis en évidence l'importance des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 impliquées dans la susceptibilité aux infections bactériennes) dans l'induction des lésions coliques aiguës [216]. Plusieurs travaux ont montré que les souris transgéniques pour les cytokines inflammatoires ne développent pas de colite spontanée, et que des animaux invalidés pour ces mêmes gènes peuvent encore développer une réponse inflammatoire mais sont plus sensibles aux infections [217, 218].

a) Les souris IL10$^{-/-}$

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire indispensable, chargée de contrer la fonction des cellules à profil Th1 et des macrophages. Les souris invalidées pour l'IL-10 présentent une inflammation pouvant toucher l'ensemble de l'intestin, mais plus particulièrement le colon proximal. En condition exempte de pathogènes spécifiques (SPF), ces souris développent une inflammation moins sévère et plus limitée que des souris élevées en condition normale, suggérant que dans ce modèle, la flore joue un rôle crucial dans le développement de l'inflammation [219].

b) Les souris Muc2$^{-/-}$

La mucine Muc2 est le constituant principal de la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal, en particulier le côlon. Le défaut de sécrétion de mucus chez les souris Muc2$^{-/-}$ entraine une colite spontanée qui s'aggrave avec l'âge de la souris [220]. L'érosion du mucus expose les cellules épithéliales au contenu luminal. En effet, des bactéries ont été retrouvées dans la couche interne de mucus, montrant l'importance de la présence d'une flore intestinale dans ce modèle [101].

3) <u>Les modèles de colites induites chimiquement :</u>

Les colites chimio-induites sont fréquemment utilisées chez les rongeurs sains ou génétiquement modifiés pour faciliter l'apparition des symptômes associés aux MICI ainsi que pour obtenir une meilleure reproductibilité. Il existe deux modèles de colite chimique : un agissant par toxicité directe sur la barrière intestinale, l'autre provoquant une réaction d'hypersensibilité du système immunitaire muqueux.

a) Perturbation de la barrière intestinale : le Dextran Sulfate Sodium

Le Dextran Sulfate Sodium (DSS) est généralement apporté via l'eau de boisson des animaux, pendant 4 à 7 jours. Il induit une colite très reproductible pouvant être chronique ou aigüe suivant la dose, la durée de traitement et le fond génétique des animaux. Les symptômes observés chez les animaux après traitement sont proches de ceux observés au cours des MICI : perte de poids, sang dans les selles, diarrhées, ulcérations, érosion des cellules constituant la barrière intestinale et une importante infiltration de lymphocytes et de granulocytes [221]. Le mécanisme d'action du DSS est encore mal connu, mais il est généralement établi que le DSS est directement toxique au niveau basal des cryptes, ce qui va compromettre l'intégrité de la barrière intestinale et entraîner une intrusion des bactéries au niveau de la muqueuse. Il a récemment été démontré que l'inflammation causée par le DSS proviendrait d'une accumulation de

bactéries dans la couche de mucus adjacent à la muqueuse intestinale. En supprimant le mucus protecteur, le DSS permettrait un contact direct entre les cellules de la muqueuse et les bactéries induisant une réponse inflammatoire [222].
Le modèle DSS est couramment utilisé afin d'étudier la réponse du système immunitaire inné ainsi que les mécanismes de perturbation de la barrière intestinale lors de la colite. En effet, l'inflammation aiguë liée au DSS est de profil Th1/Th17 (TNF, IL-17, IL-6), alors que l'inflammation chronique implique plutôt une réponse de type Th2 (IL-4, IL-10) [223]. Enfin, une répétition des cycles de traitements au DSS entraîne le développement de tumeurs colorectales chez la souris, évolution également observée de façon significative chez les patients atteints de MICI [224].

Enfin, une étude récente associe une inflammation aiguë et une infection par la bactérie AIEC aux signes de la MC. Carvalho *et al.* montrent que la souche AIEC LF82 potentialise une inflammation colique induite par du DSS [225]. En présence d'un agent inducteur de colite, la souche AIEC LF82 aggraverait les signes cliniques de colite (perte de poids, présence de sang dans les selles…) et diminuerait le taux de survie des souris à 14 jours. La souche AIEC LF82 augmenterait aussi l'expression des cytokines inflammatoires IL-1β et IL-6 en présence de DSS.

b) Hypersensibilisation par un haptène : TNBS/DNBS

L'administration intra-rectale d'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) ou de 2,4-dinitrobenzène sulfonique (DNBS) à des souris ou des rats sains, induit une colite expérimentale, majoritairement localisée au niveau du côlon distal. Le TNBS/DNBS, par son action d'haptène, va rendre les protéines du côlon ou du microbiote immunogènes pour le système immunitaire de l'hôte, activant les cellules T. Une dose unique de TNBS/DNBS entraîne une réaction inflammatoire aigüe caractérisée par l'augmentation des cytokines de type Th1 et Th17, incluant l'IFN-γ, le TNF, l'IL-12 et l'IL-17, dans les 2-3 jours post-instillation [223]. Une infiltration de neutrophiles et de macrophages au sein de la muqueuse et de la sous-muqueuse est également observée [226]. Renouvelée plusieurs jours de suite, cette inflammation devient chronique.
Ce modèle est préféré pour son action rapide et sa localisation uniquement colique de l'inflammation dans l'étude des mécanismes de tolérance intestinale ou de profil de sécrétion des cytokines. Néanmoins, ce modèle est variable d'un fond génétique murin à l'autre et dépend également du protocole d'administration.

4) Les modèles de colite infectieuse chez la souris :

Les modèles de colite induite par des agents infectieux sont moins utilisés et servent surtout à évaluer l'impact de la flore intestinale sur le déroulement de la colite et à mesurer la réponse aux traitements influant sur la flore, comme les antibiotiques ou les probiotiques. Il existe des modèles variés de colite infectieuse, mais les plus fréquemment cités sont les colites à *Citrobacter rodentium* [227], *Salmonella typhimurium* [228] ou encore *Helicobacter hepaticus* [229]. Ces modèles montrent une inflammation aiguë de localisation variable dans l'intestin, avec une infiltration de cellules immunitaires et une augmentation des cytokines inflammatoires, allant parfois jusqu'au cancer colorectal.

La plupart des modèles expérimentaux d'inflammation intestinale sont fortement dépendants de la présence d'une flore commensale et de l'environnement des animaux, notamment les colites induites par des agents chimiques. En effet l'inflammation intestinale est absente chez les souris axéniques [121].

Les découvertes récentes concernant de nouveaux gènes impliqués dans le déclenchement de la MC vont permettre l'émergence de nouveaux modèles animaux. Ces modèles animaux sont nécessaires à une meilleure compréhension des MICI, en permettant des avancées concernant le rôle de la régulation immunitaire et celui de la flore intestinale dans le déclenchement de la MC. Néanmoins, les modèles animaux actuels sont variables et ne sont pas capables de reproduire exactement les caractéristiques pathologiques de la MC, établissant des précautions à prendre au moment d'extrapoler les données du modèle expérimental à l'homme (Figure 18).

Figure 18 : Quelques exemples de modèles animaux de colite expérimentale (d'après Wirtz et Neurath, 2007 et Rosenthiel, 2009 [86, 230]).

Type	Phénotype murin	Mécanisme proposé	Importance de la flore intestinale
1) Modèles touchant à l'intégrité de la barrière intestinale			
- DSS	Colite aigüe	Toxicité directe	Oui
- TNBS/oxazolone	Colite aigüe	Exacerbation de la réponse Th1	Oui
- Souris N-cadherin Tg	Colite spontanée	Défaut des protéines de jonction	Oui
- Souris keratin8$^{-/-}$	Colite spontanée	Défaut des protéines de jonction	Oui
- Souris MDR1$^{-/-}$	Colite spontanée	Altération des cellules épithéliales	Oui
- Souris IKK-γ (NEMO)$^{-/-}$	Colite chronique spontanée	Activation chronique du facteur de transcription NF-κB	?
- Souris SAMP1/Yit	Iléite spontanée	Défaut de perméabilité intestinale	?
- Souris Muc2$^{-/-}$	Colite spontanée	Défaut de la synthèse de mucus	Oui
2) Modèles touchant le système immunitaire inné			
- Souris STAT3$^{-/-}$	Entérocolite spontanée	Défaut d'activation d'IL10	Oui
- Souris A20$^{-/-}$	Colite spontanée	Défaut d'inhibition de NF-κB	?
3) Modèles touchant le système immunitaire adaptatif			
- Souris TNF$^{\Delta ARE}$ Tg	Inflammation chronique de l'iléon avec granulomatose	Augmentation de l'expression de TNF	?
- Souris T-bet Tg	Aggravation de la colite	Augmentation de la réponse Th1	?
- Transfert de cellules T CD4^{+}CD45RB^{hi} chez souris SCID	Inflammation transmurale débutant dans le côlon	Diminution du nombre de cellules T-régulatrices	Oui
- Souris STAT4 Tg	Colite transmurale sévère	Augmentation de la réponse Th1	?
- Souris IL10$^{-/-}$ / CRF2-4$^{-/-}$	Entérocolite chronique spontanée	Défaut d'inhibition de la voie Th1	Oui
- Souris TCRα chain$^{-/-}$	Colite spontanée	Réponse Th2 exacerbée (↑ IL-4)	Oui
- Souris Gαi2$^{-/-}$	Colite spontanée	Augmentation de la réponse Th1	Oui
4) Autres modèles ne présentant pas d'inflammation spontanée			
- Souris NOD2$^{-/-}$	Défaut de résistance aux infections bactériennes		Oui
- Souris ATG16L1$^{-/-}$	Défaut des cellules de Paneth		Oui
- Souris OCTN1$^{-/-}$	Augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales		?
- Souris IL-23R$^{-/-}$	Défaut des cellules Th17		?

PARTIE 2

INFLUENCE DE LA MUTATION NOD2 ET D'UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE SUR LA COLONISATION INTESTINALE DES SOURIS PAR *E. COLI* AIEC

I) INTRODUCTION

Les MICI représentent un enjeu thérapeutique majeur dans les sociétés industrialisées. La recherche sur les modèles animaux a permis une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie et la découverte de nouvelles voies thérapeutiques. Néanmoins, les modèles animaux actuels de MICI ne permettent pas de reproduire fidèlement les caractéristiques d'une inflammation chronique spécifique à la maladie de Crohn (MC). La physiopathologie de la MC rassemble des facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux, conduisant à une perturbation de la barrière intestinale en général, et de la flore microbienne en particulier. En effet, des études sur la flore intestinale ont révélé une dysbiose chez les patients atteints de MC par rapport aux contrôles sains, avec une diminution des bactéries bénéfiques, notamment *Faecalibacterium prausnitzii*, au profit de bactéries potentiellement pathogènes comme les *Escherichia coli*. La présence d'*E. coli* adhérent et invasif (AIEC) en particulier, a été associée à la colonisation de l'iléon des patients atteints de MC. Les AIEC sont une famille de souches génétiquement hétérogènes [149, 173, 231]. La souche type LF82 est la plus étudiée des souches d'AIEC, mais d'autres souches d'*E. coli* ont montré un pouvoir invasif similaire, comme la souche 06362. Les AIEC possèdent des propriétés d'adhésion et d'invasion de l'épithélium intestinal *in-vitro*, ainsi que la capacité à survivre et se multiplier dans les macrophages, provoquant la sécrétion de TNF [161, 165]. De plus, des protéines surexprimées à la surface des cellules épithéliales intestinales dans la MC ont été identifiées comme des récepteurs pour AIEC [175].

Parmi les facteurs génétiques, *NOD2* est le gène de susceptibilité le plus fortement associé à la MC. Les mutations de NOD2 sont retrouvées chez 30 à 40% des patients atteints de MC. Le récepteur NOD2 joue un rôle essentiel en préservant l'intégrité de la barrière intestinale vis-à-vis des bactéries invasives. En effet, les mutations de *NOD2* sont responsables d'un défaut de clairance bactérienne et des monocytes de patients porteurs de mutations du gène *NOD2* et infectés par une souche d'AIEC présentent une altération de la réponse immunitaire précoce conduisant à une diminution de la clairance bactérienne [184].
Ces données suggèrent un lien entre un gène de susceptibilité et un facteur environnemental, que sont les bactéries invasives. Néanmoins, quelques arguments contre un rôle primaire de NOD2 et d'AIEC dans le développement précoce de la MC sont avancés [232]. D'une part, les souris mutées pour le gène *NOD2*, qu'elles soient knock-out ou porteuses de la mutation frameshift (L1007fsinsC), ne développent pas de colite spontanée, et d'autre part, une colonisation intestinale par AIEC peut avoir lieu sans signe de maladie [62, 64, 162].
De plus, il est bien connu que la flore intestinale joue un rôle protecteur vis-à-vis de l'invasion par des pathogènes, et un déséquilibre de la flore est un argument reconnu dans le

déclenchement et la persistance de la MC [140, 141]. Les propriétés protectrices de la flore intestinale ont été démontrées *in vitro* en recouvrant des cellules épithéliales par *Lactobacillus casei*, empêchant ainsi AIEC LF82 d'adhérer aux cellules [181]. La consommation d'antibiotiques participe au déséquilibre de la flore intestinale, non seulement en perturbant la flore protectrice associée à la muqueuse, mais aussi par un effet rebond avec une augmentation de la flore à l'arrêt du traitement, augmentant le risque d'infection intestinale [202]. En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont montré une fréquence plus élevée de MC chez les adultes ayant reçus de fréquents traitements antibiotiques dans l'enfance [206].

Le but de cette étude est donc d'évaluer l'action des AIEC par l'analyse des flores iléale et colique adhérentes et par l'exploration de la translocation mésentérique chez des souris invalidées pour le gène NOD2, afin de définir un lien entre facteurs génétiques et environnementaux. Notre hypothèse est qu'une perturbation momentanée de la flore intestinale normale, entraînant une diminution de la fonction barrière de l'épithélium intestinal, permettrait l'invasion de la muqueuse intestinale par AIEC, chez les patients génétiquement prédisposés (Figure 19).

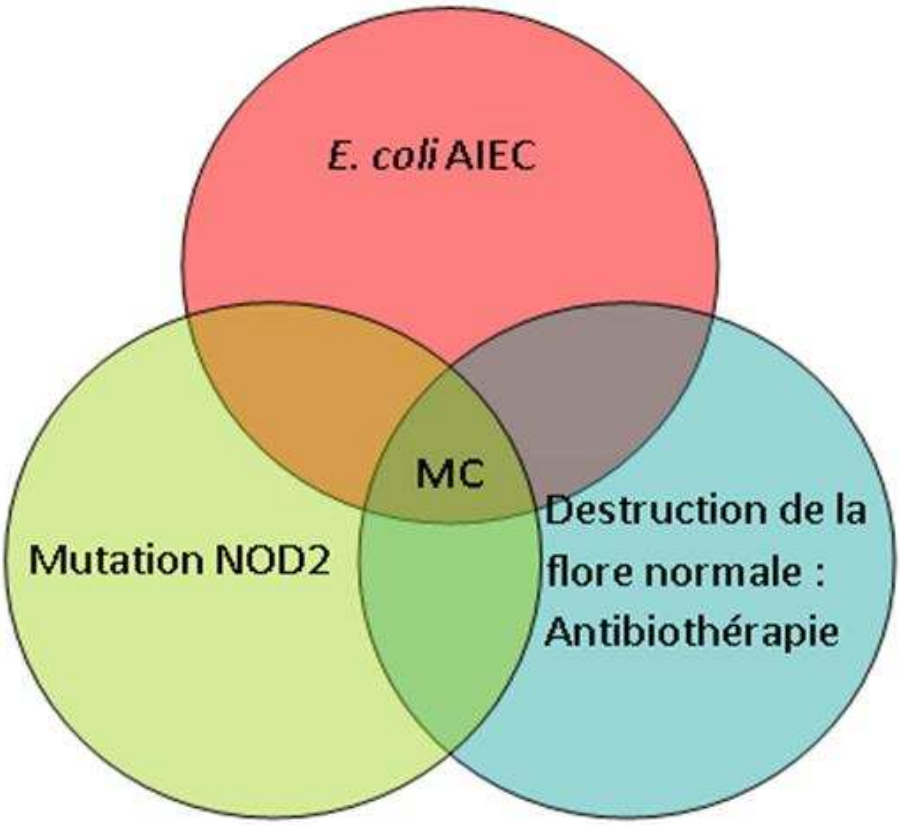


Figure 19 : Facteurs choisis dans notre modèle de pathogénèse de la MC.

II) MATERIELS ET METHODES

Notre étude se base sur l'exploration de la colonisation et de l'invasion de l'épithélium intestinal par AIEC chez des souris C57/Bl6 sauvages (WT) et NOD2 knock-out (NOD2KO), ainsi que sur l'étude de la translocation bactérienne chez ces souris, suite à un traitement par des antibiotiques à large spectre, suivi d'une infection par *E. coli* AIEC. Les souris de fond génétique C57/Bl6 montrent un profil immunitaire de type Th1 en cas d'inflammation intestinale, ce qui correspond au profil inflammatoire de la MC.

1) Souches bactériennes :

Les souches d'*Escherichia coli* AIEC utilisées ont été isolées de lésions iléales chroniques de patients atteints de MC. Nous avons choisi la souche d'AIEC 06362, que nous avons comparée à la souche de référence AIEC LF82. Ces deux souches ont montré un pouvoir d'invasion équivalent sur cellules I-407. Les bactéries sont mises en culture pendant une nuit dans du milieu Luria-Bertani (LB) à 37℃. Les cultures sont centrifugées à 3000g pendant 15min. Les culots bactériens sont repris dans du NaCl à 0,9% pour une administration intra-gastrique.

2) Lignées cellulaires :

Les tests d'invasion sont réalisés sur des cellules Intestine-407 (I-407) (nomenclature ATCC CCL6, Manassas, USA) dérivées de cellules embryonnaires humaines de jéjunum et d'iléon. Les cellules I-407 sont cultivées dans une atmosphère contenant 5% de CO2 à 37℃ dans du milieu Basal Medium Eagle (Lifetechnologies, France) enrichi avec 10% (v/v) de sérum fœtal de veau inactivé (PAN biotech-GmbH, Germany), 1% de L-glutamine (Lifetechnologies, France), 100,000U/L de pénicilline, 100mg/L de streptomycine (Lifetechnologies, France). Ces cellules font parties des lignées cellulaires recommandées dans les protocoles d'invasion cellulaire par les AIEC.

3) Lignées murines :

Les souris sauvages (WT) proviennent des Centres d'Elevage Janvier (Le Genest-St. Isle, France). Les souris NOD2KO ont été obtenues en remplaçant l'exon codant pour *NOD2* par une casette neo, chez des souris de fond génétique C57/Bl6. Le génotype de ces souris ($NOD2^{-/-}$ / $néo^{+/+}$) est vérifié par PCR classique et électrophorèse sur gel d'agarose. Les souris NOD2KO sont élevées au sein de l'Institut de Transgenose, Centre National de la Recherche Scientifique d'Orléans (France).

Toutes les souris sont maintenues dans des conditions SPF (Specific Pathogen Free) à l'Institut Pasteur de Lille (France). Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées selon les règles d'éthique et de régulation des expérimentations animales du gouvernement français.

4) Antibiotiques :

Afin de déstabiliser la flore intestinale commensale sans la détruire, nous avons utilisé un cocktail de deux antibiotiques à large spectre, la vancomycine et la gentamicine [233, 234]. Ces antibiotiques ont la particularité de ne pas être résorbés par la muqueuse intestinale, et ne sont donc pas retrouvés dans la circulation sanguine et dans des organes autres que l'intestin, afin de ne pas influer sur la translocation bactérienne. Les doses sont celles couramment utilisées en thérapeutique humaine :

- La gentamicine est un antibiotique bactéricide de la famille des aminoglycosides, qui agit en inhibant la synthèse protéique des bactéries par fixation sur l'unité ribosomale 30S. La gentamicine n'est pratiquement pas résorbée *per os*. La gentamicine est active sur les entérobactéries, *Listeria*, *Corynebacterium diphtheriae*, ainsi que sur les *Proteus*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas*. La gentamicine est administrée aux souris à la dose de 3mg/kg/j.

- La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides, qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Cet antibiotique n'est pas résorbé par la muqueuse intestinale. La vancomycine est active sur les coques à Gram positif (staphylocoques, streptocoques, entérocoques), ainsi que sur les bacilles anaérobies à Gram positif (*Clostridium…*). La vancomycine est administrée aux souris à la dose de 40mg/kg/j.

5) Protocole d'infection des souris :

Des souris sauvages (WT) et NOD2KO, âgées de 8 à 12 semaines, sont traitées par un cocktail de gentamicine et vancomycine, par gavage pendant trois jours. A la fin du 3ème jour de traitement antibiotique, 10^9 UFC *Escherichia coli* AIEC (souche LF82 ou 06362), sont inoculées par gavage aux souris une fois par jour pendant deux jours. Les contrôles sont constitués de souris non traitées (NT), de souris infectées par AIEC sans traitement préalable aux antibiotiques, et de souris uniquement traitées par antibiotiques (ATB), élevées dans le même environnement. Les animaux sont sacrifiés à 1, 5 et 60 jours après la fin du traitement infectieux (Figure 20). Des échantillons de côlon et d'iléon, sont prélevés pour identifier et quantifier les bactéries adhérentes à la muqueuse intestinale, ainsi que pour l'évaluation de l'inflammation intestinale par des analyses histologiques et moléculaires. Les

ganglions et la graisse mésentériques sont prélevés pour mesurer la translocation bactérienne.

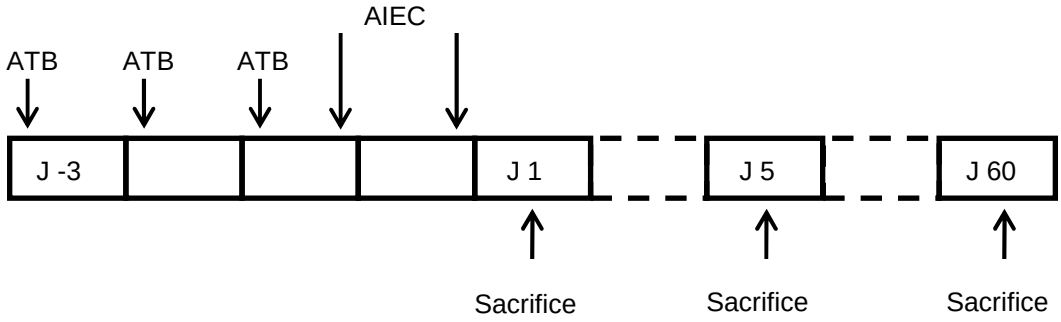


Figure 20 : Protocole expérimental d'infection des souris par AIEC.

6) Analyses bactériologiques :

Les échantillons de côlon, d'iléon, de ganglions et de graisse mésentériques sont prélevés en conditions stériles dans 1,5ml de Ringer cystéiné (RC) (tube taré).

Après pesée, le côlon et l'iléon sont broyés dans le milieu RC, puis les broyats sont dilués (dilutions décimales de 10^{-2} à 10^{-5}) et ensemencés sur différentes géloses (Annexe) [147] :

- Des géloses Columbia au sang non sélectives, incubées à 37°C en anaérobiose pendant 7 jours, pour le dénombrement et l'identification de la flore anaérobie cultivable ;
- Des géloses McConkey (BioMerieux) incubées à 37°C en aérobiose pendant 48 heures. Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore à Gram positif, ainsi qu'un indicateur coloré, le rouge neutre, révélant l'utilisation du lactose. Il s'agit d'un milieu sélectif pour le dénombrement des entérobactéries;
- Des géloses MRS (Man Rogosa Sharpe), incubées à 37°C sous CO_2 pendant 48 heures. Le pH acide de ce milieu permet une sélection des *Lactobacillus sp.*

Les colonies sont dénombrées et les différents types de bactéries sont repiqués et identifiés selon des critères morphologiques et biochimiques établis.

- *E. coli* fait partie de la famille des entérobactéries. Ce sont des petits bacilles aéro-anaérobies facultatifs à Gram négatif à bouts ronds. Les colonies d'*E. coli* sont identifiées par galeries API 20E (BioMérieux, France) pour les différencier des autres entérobactéries (*Enterobacter, Klebsiella*, …). Les *E. coli* identifiés sont ensuite soumis à un test d'invasion sur cellules I-407 pour déterminer leur pouvoir invasif (Figure 21).

- Les Lactobacilles sont des bacilles aéro-anaérobies facultatifs à Gram positif et de morphologie variable. Les lactobacilles ne possèdent pas de catalase.
- Les coques à Gram positif aéro-anaérobies facultatifs sont soumis au test au peroxyde d'hydrogène. Les entérocoques et streptocoques sont différenciés des staphylocoques par l'absence de catalase. L'étalement sur un milieu D-Coccosel (BioMerieux, France) permet ensuite d'identifier les *Enterococcus* (colonies noires) des *Streptococcus* (colonies blanches ou absence de culture).
- Les colonies anaérobies strictes sont identifiées par coloration de Gram, puis par identification phénotypique.

Les résultats sont exprimés en fonction de la dilution et du poids de tissu selon la formule suivante :

$$N = \frac{n}{P * 10^{d} * V}$$

où N : dénombrement en UFC/g de tissu

n : nombre de colonie à la dilution d

P : poids du tissu en g/ml

V : 0,1mL (volume ensemencé)

Les résultats quantitatifs sont exprimés en log UFC/g de tissu.

Le seuil de détection est exprimé selon la formule suivante : $N < \frac{1}{P * 10^{-2} * V}$

Après broyage des ganglions et de la graisse mésentériques dans le RC, 1 ml du broyat est ensemencé dans un bouillon d'enrichissement BH (Brain-Heart) et 0,1 ml est ensemencé sur une gélose au sang incubée à 37℃ pendant 48 à 72 heures en condition anaérobie. Si l'on observe une culture dans le milieu d'enrichissement, 0,1 ml du milieu est ensemencé sur une gélose au sang et incubé à 37℃ pendant 48 heur es en condition anaérobie.

Le seuil de détection est exprimé selon la formule suivante : $N < \frac{1}{P * V}$

Le seuil de détection des bactéries dans le côlon et l'iléon est situé aux environs de 4 log UFC/g de tissu. Le seuil de détection des bactéries dans les ganglions et la graisse mésentériques est situé aux environs de 2 log UFC/g de tissu.

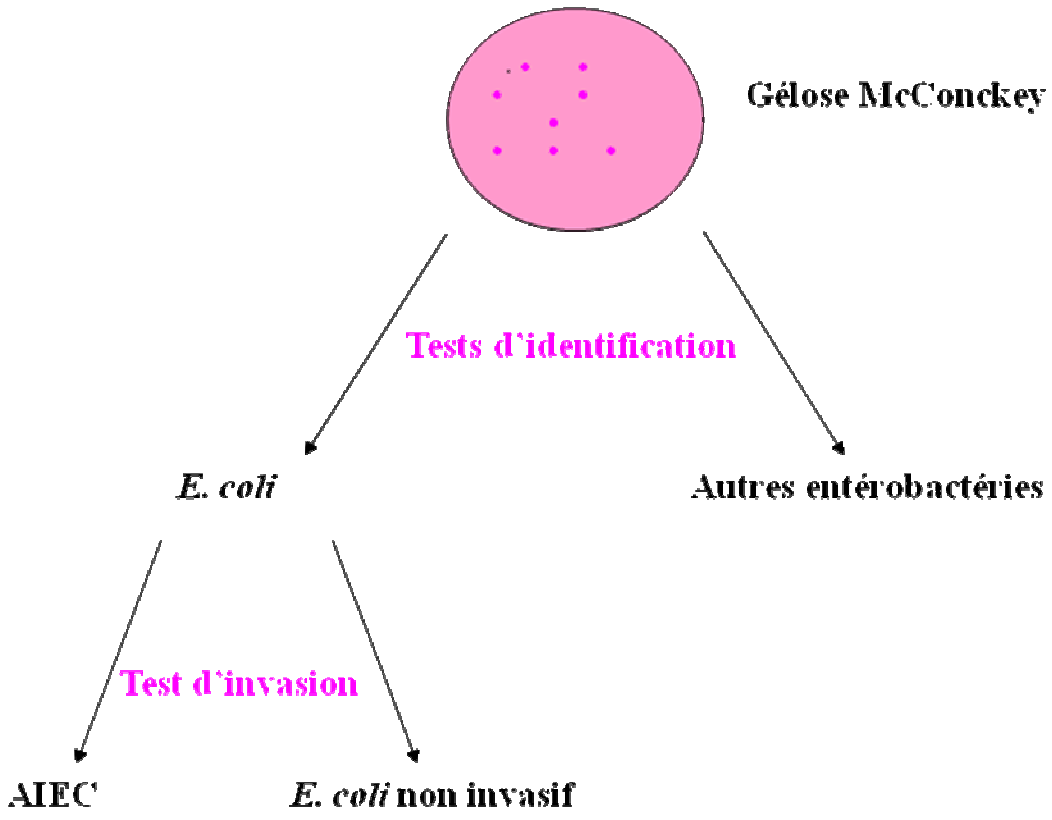


Figure 21 : Protocole d'identification des AIEC.

7) Tests d'invasion :

Pour différencier les AIEC des souches d'*E. coli* non invasives, des tests d'invasions sont réalisés. Le pouvoir invasif des souches d'*E. coli* sur les cellules épithéliales est mesuré grâce au test de protection contre la gentamicine sur cellules I-407 (ATCC CCL-6) [161].

Les cellules I-407 sont ensemencées en plaques de 24 puits à la concentration de 4.10^5 cellules par puits et incubées 20h à 37℃ sous 5% de CO_2. Les cellules sont ensuite rincées deux fois au PBS (Phosphate Buffer Saline). Chaque puits est ensemencé avec 1mL de milieu BME non enrichi et sans antibiotique contenant 4.10^6 bactéries (Multiplicity Of Infection : 10 bactéries par cellules). Les bactéries sont dénombrées sur gélose afin de mesurer exactement la quantité ensemencée. Après 3 heures d'incubation à 37℃ sous 5% de CO_2, les cellules infectées sont rincées au PBS. Pour mesurer le pouvoir invasif, 1 ml de milieu de culture (BME) contenant 100µg/ml de gentamicine (Invitrogen, France) est déposé dans chaque puits. La gentamicine est un antibiotique extracellulaire qui va éliminer uniquement les bactéries adhérant à la surface des cellules. Après incubation pendant une

heure supplémentaire, les cellules sont rincées deux fois au PBS. Un millilitre de Triton X-100 (Sigma Chemical Compagny) dilué à 1% dans de l'eau stérile est ensuite déposé dans les puits pendant 5 min, afin de lyser les cellules et de libérer les bactéries intracellulaires. Enfin le contenu des puits est dilué et ensemencé sur des géloses LB incubées à 37℃ pendant 24 heures, afin de déterminer le nombre d'UFC ayant pénétré dans les cellules. Le pouvoir invasif est exprimé comme le pourcentage de l'inoculum original ayant envahi les cellules. La souche bactérienne est considérée comme invasive ce pourcentage est supérieur ou égal à 0,1% [163].

8) Analyse moléculaire du TNF :

Les ARN totaux des échantillons de côlon, d'iléon sont extraits à l'aide du kit « Nucleospin RNA II » (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Après quantification, la rétro-transcription (RT) de l'ARN est réalisée sur un volume final de 10 µL contenant une quantité de 1 µg d'ARN à l'aide du kit « High Capacity DNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystems, France). L'ADNc synthétisé est ensuite analysé par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel à l'aide du kit « Power SYBRGreen PCR Master Mix » (Applied Biosystems France), sur appareil ABIprism 7100, selon les recommandations du fournisseur. Les oligonucléotides sens et anti-sens (Eurogentec, France) utilisés sont les suivants :

β-actine (S) 5'- GAATGGGTCAGAAGGACTCCTATGT-3' ;

β-actine (AS) 5'- CCATGTCGTCCCAGTTGGTAA-3' ;

TNF(S) 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3' ;

TNF (AS) 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACA A-3'.

Tous les résultats sont normalisés par rapport au gène constitutif β-actine et analysés selon la méthode des ΔCt.

9) Analyse histologique de l'inflammation :

Après le sacrifice, le côlon et l'iléon proximal sont excisés et des rouleaux de côlon et d'iléon sont fixés dans du paraformaldéhyde 4% tamponné, puis inclus en paraffine. Des coupes de 4µm sont réalisées, puis colorées au May-Grünwald Giemsa (MGG). La sévérité de l'inflammation est mesurée en aveugle. Le score histologique est fonction de l'intensité de l'infiltrat inflammatoire et de l'intensité et l'étendue des dommages épithéliaux. Le score histologique est échelonné de 0 (sain) à 6 (très forte inflammation).

10) Tests statistiques :

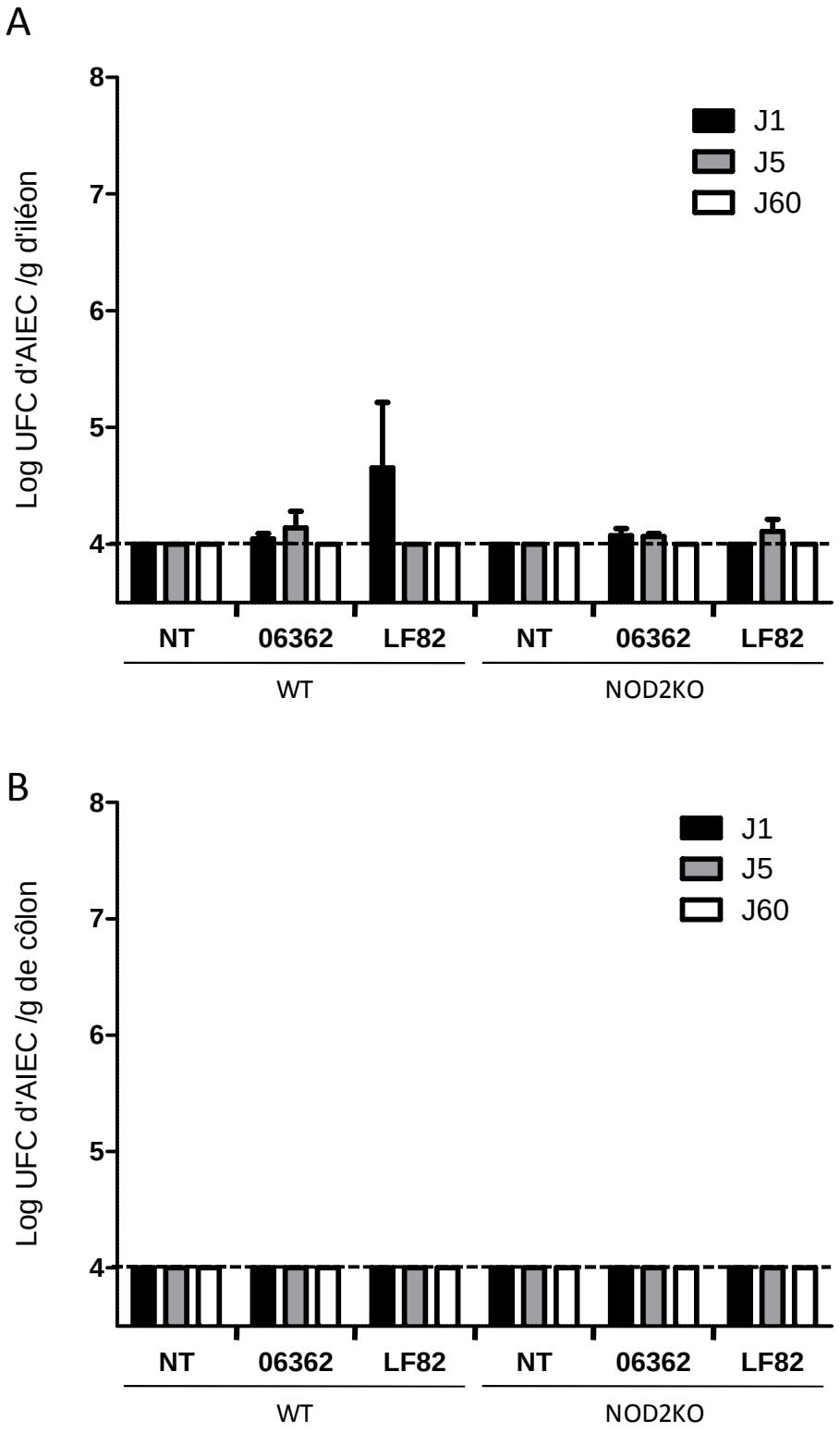
Les analyses statistiques sont réalisées avec le test exact de Wilcoxon-Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism5. Les résultats sont considérés comme significatifs au seuil $p<0,05$.

III) RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les résultats suivants montrent la colonisation bactérienne adhérente du colon, de l'iléon et des tissus mésentériques des souris WT et NOD2KO suite à une infection par la bactérie AIEC avec ou sans traitement antibiotique préalable, ainsi que l'évaluation de l'inflammation intestinale dans les tissus.

1) Colonisation des souris WT et NOD2KO par AIEC :

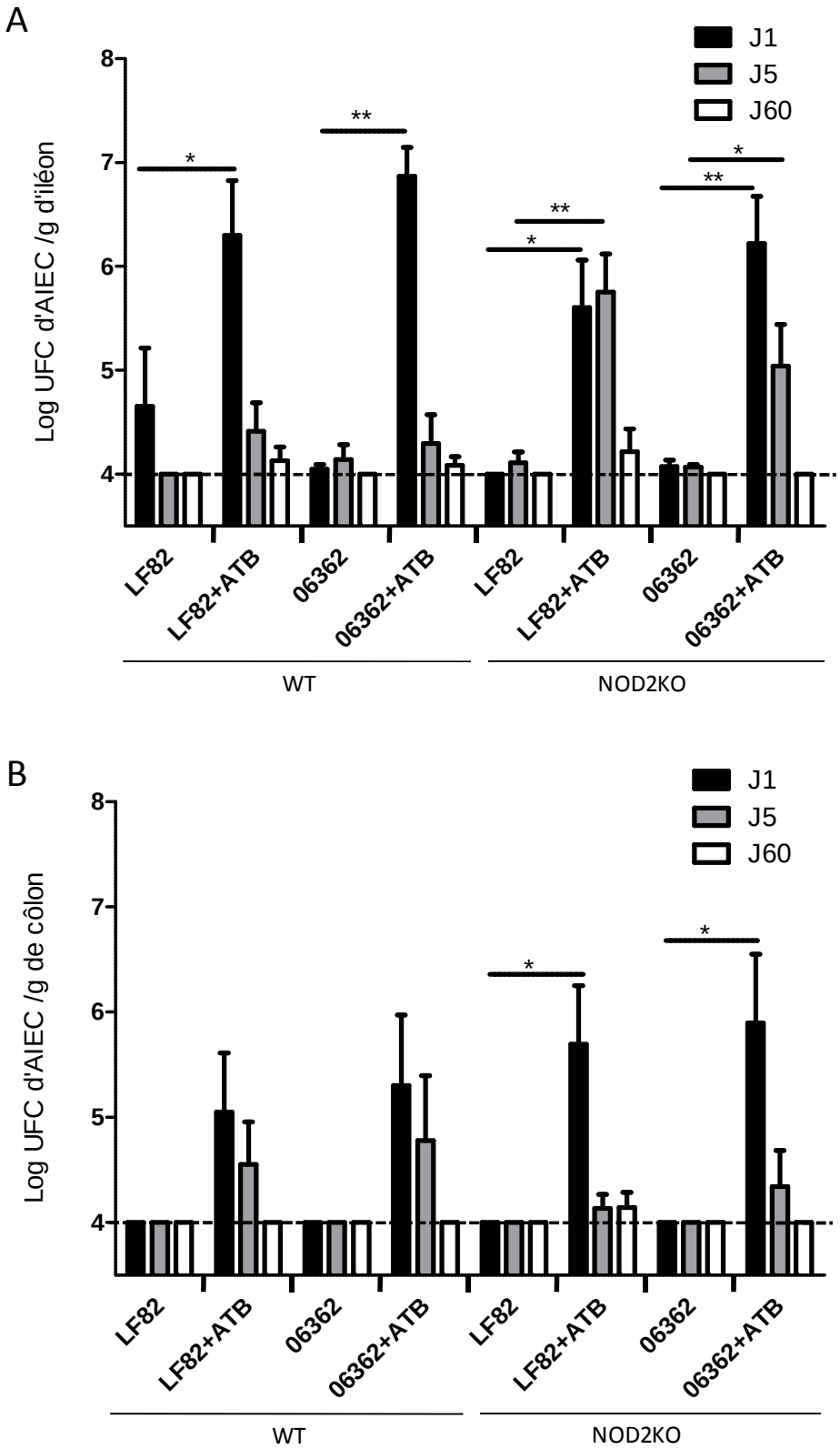
Afin d'analyser la capacité des souches d'AIEC à coloniser la muqueuse intestinale, des souris WT et NOD2KO ont été infectées par voie orale par la souche d'AIEC 06362 et le nombre d'UFC d'AIEC adhérents aux muqueuses colique et iléale a été mesuré 1 jour, 5 jours et 60 jours après la fin de l'infection. Nous avons observé que AIEC 06362 n'était pas capable de coloniser les souris, puisque qu'aucune bactérie n'était détectée à un niveau significatif aussi bien dans le colon que dans l'iléon des souris WT et NOD2KO durant toute l'expérience (Figure 22 A et B). Afin d'éviter une spécificité de souche, le même protocole de colonisation a été mené avec la souche AIEC de référence LF82, et un profil similaire à la souche 06362 a été observé (Figure 22 A et B). Ces résultats indiquent que les AIEC ne colonisent pas spontanément les souris WT et NOD2KO.



<u>Figure 22 :</u> Colonisation et persistance des AIEC 06362 et LF82 dans l'iléon et le côlon. Quantification des AIEC adhérents aux muqueuses iléale (A) et colique (B) chez les souris WT et NOD2KO à J1, J5 et J60 après une infection orale par 10^9 UFC d'AIEC 06362 ou LF82. Nombre de souris par groupe : n=4 à 7 dans le groupe NT WT, n=5 à 6 dans les autres groupes. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 4 log UFC/g. Les barres d'erreur représentent le SEM.

2) Colonisation des souris WT et NOD2KO par les souches d'AIEC après un traitement antibiotique :

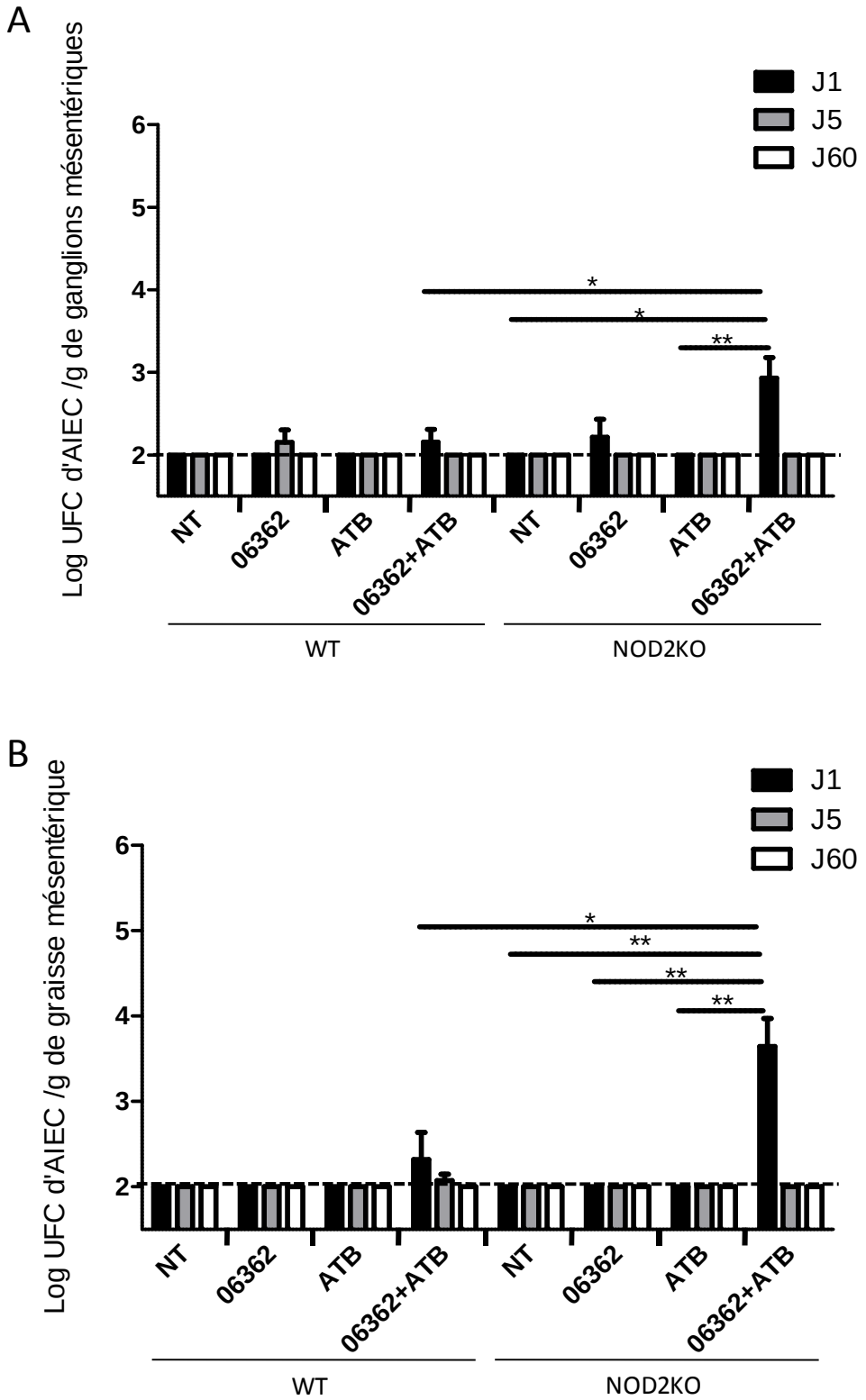
Afin de mesurer l'effet du traitement antibiotique sur la colonisation par AIEC, les souris WT et NOD2KO ont été infectées par AIEC 06362 ou LF82 après le traitement antibiotique et la bactérie AIEC a été quantifiée dans les muqueuses iléale et colique. Le traitement antibiotique a significativement augmenté la colonisation de l'iléon par AIEC à J1 après l'infection, chez les souris WT et NOD2KO (Figure 23 A). Une persistance de la colonisation par AIEC a été observée uniquement dans l'iléon des souris NOD2KO à J5. Dans le côlon, le traitement antibiotique a significativement augmenté la colonisation par AIEC chez les souris NOD2KO, mais pas chez les souris WT à J1, mais sans persistance à J5 (Figure 23 B). À J60, AIEC n'était plus détectée dans l'iléon et le colon des souris. Les deux souches d'AIEC montrent un comportement similaire. Ces résultats indiquent que la modification de la flore intestinale induite par les antibiotiques a augmenté la colonisation et la persistance d'AIEC préférentiellement dans l'iléon et chez les souris NOD2KO. Néanmoins, AIEC n'était pas capable de persister à J60 dans l'intestin des souris WT et NOD2KO.



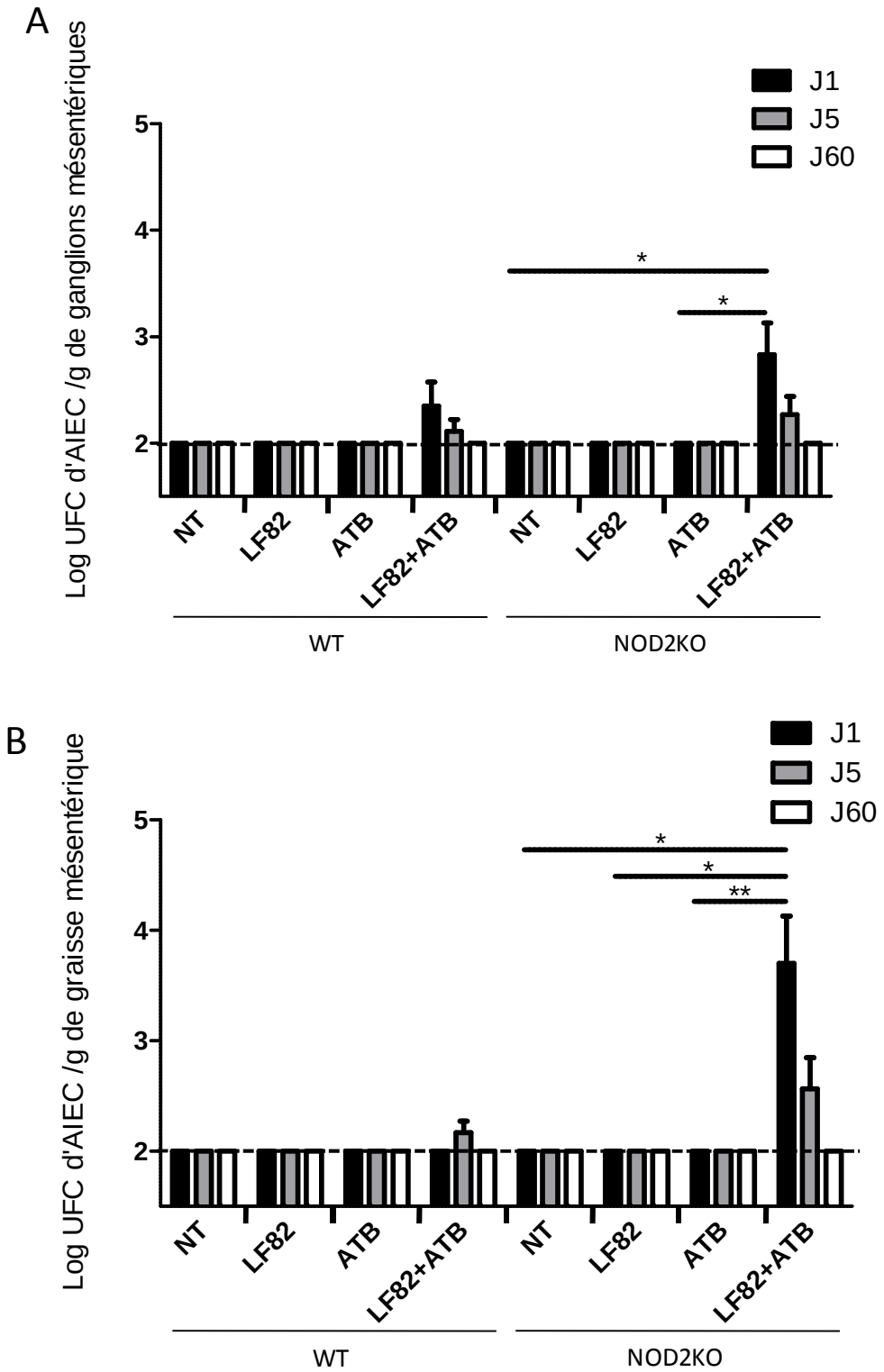
<u>Figure 23 :</u> Colonisation et persistance des AIEC 06362 et LF82 dans l'iléon et le côlon après traitement antibiotique. Quantification des AIEC adhérents aux muqueuses iléale (A) et colique (B) chez les souris WT et NOD2KO à J1, J5 et J60 après un traitement antibiotique et une infection orale par 10^9 UFC d'AIEC 06362 ou LF82. Nombre de souris par groupe : n=5 à 6. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 4 log UFC/g. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

3) Translocation mésentérique d'AIEC chez les souris WT et NOD2KO :

En parallèle de la colonisation colique et iléale par AIEC, nous avons mesuré la translocation bactérienne d'AIEC dans les ganglions et la graisse mésentériques. Le profil de colonisation dans les tissus mésentériques était le même que dans l'intestin. En effet, comme le montre les figures 24 et 25, AIEC n'était pas détecté à un niveau significatif chez les souris WT, avec ou sans traitement antibiotique. Néanmoins, chez les souris NOD2KO, le traitement antibiotique induisait une colonisation des tissus mésentériques par AIEC à J1, mais la bactérie ne persistait pas à J5 et J60. Nous avons aussi observé une plus grande colonisation de la graisse mésentérique par AIEC par rapport aux ganglions (environ 5 fois plus) chez les souris NOD2KO à J1 (Figue 24 et 25 B). Comme précédemment les souches 06362 et LF82 montrent un comportement similaire. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent une augmentation de la colonisation des tissus mésentériques par AIEC induite par les antibiotiques, dépendant du statut NOD2.



<u>Figure 24 :</u> Colonisation et persistance d'AIEC 06362 dans les ganglions et la graisse mésentériques après traitement antibiotique. Quantification d'AIEC dans les ganglions mésentériques (A) et la graisse mésentérique (B) chez les souris WT et NOD2KO à J1, J5 et J60 après un traitement antibiotique et une infection orale par 10^9 UFC d'AIEC 06362. Nombre de souris par groupe : n=4 à 7 dans le groupe WT NT et n=5 à 6 dans les autres groupes. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 2 log UFC/g. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.



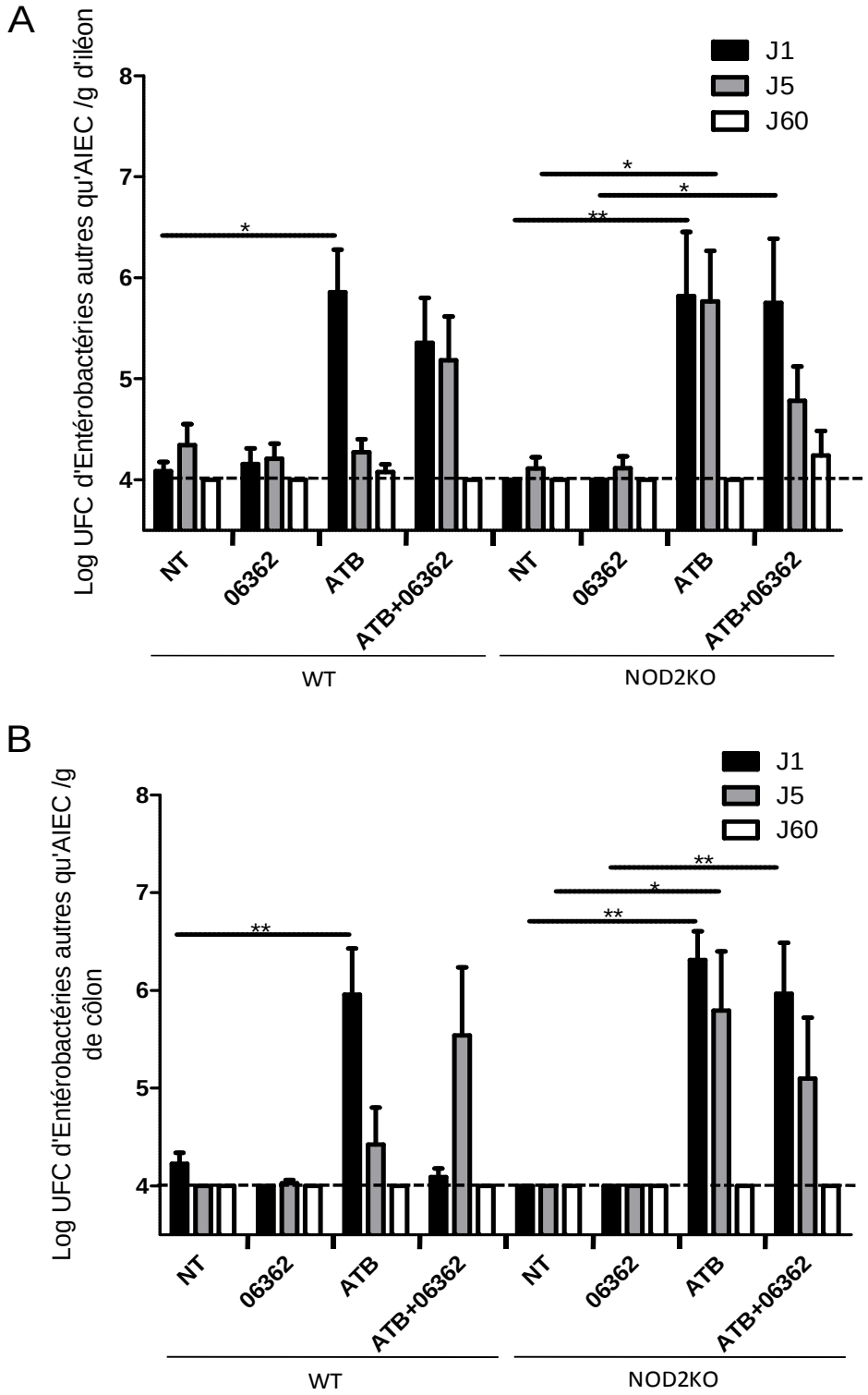
<u>Figure 25 :</u> Colonisation et persistance d'AIEC LF82 dans les ganglions et la graisse mésentériques après traitement antibiotique. Quantification d'AIEC dans les ganglions mésentériques (A) et la graisse mésentérique (B) chez les souris WT et NOD2KO à J1, J5 et J60 après un traitement antibiotique et une infection orale par 109 UFC d'AIEC LF82. Nombre de souris par groupe : n=4 à 7 dans le groupe WT NT, n=4 à 6 dans les groupes infectés par AIEC LF82 et n=6 dans les autres groupes. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 2 log UFC/g. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

4) Colonisation des souris NOD2KO par des bactéries opportunistes après le traitement antibiotique :

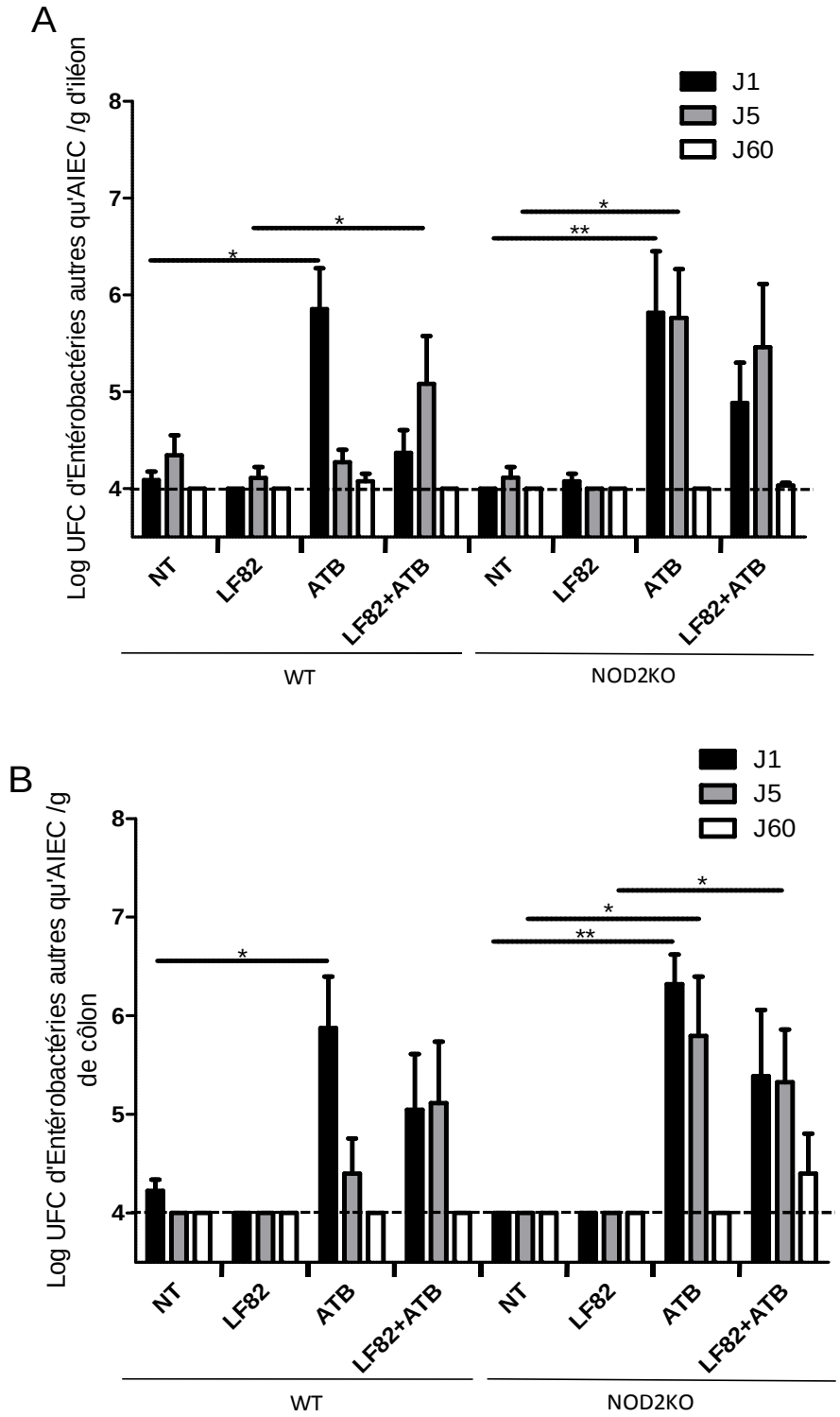
Pour évaluer l'effet du traitement antibiotique et de la colonisation par AIEC sur la flore intestinale des souris, nous avons analysé la flore cultivable totale dans l'intestin et les tissus mésentériques au cours de l'expérience. Nous avons observé que deux jours après la fin du traitement antibiotique, correspondant à J1 après la fin de l'infection, le microbiote intestinal était perturbé par l'émergence d'entérobactéries autres qu'AIEC (*E. coli* non-invasif*, Enterobacter cloacae, Serratia odorifera, Klebsiella oxytoca*) dans l'iléon et le côlon des souris WT et NOD2KO (Figure 26 et 27 A et B). Les souris NOD2KO semblaient être plus affectées par le traitement antibiotique. En effet, alors que les entérobactéries étaient diminuées chez les souris WT traitées par antibiotique seul à J5, les souris NOD2KO n'ont pas été capables de réguler leur flore et les entérobactéries ont été retrouvées à un niveau élevé dans le côlon et l'iléon à J5.

Un effet de la colonisation par AIEC a été observé seulement chez les souris WT avec une augmentation des entérobactéries autres qu'AIEC à J5 dans l'iléon et le côlon. Chez les souris NOD2KO, la colonisation par AIEC n'a pas augmenté la colonisation par les entérobactéries, déjà augmentée par le traitement antibiotique seul.

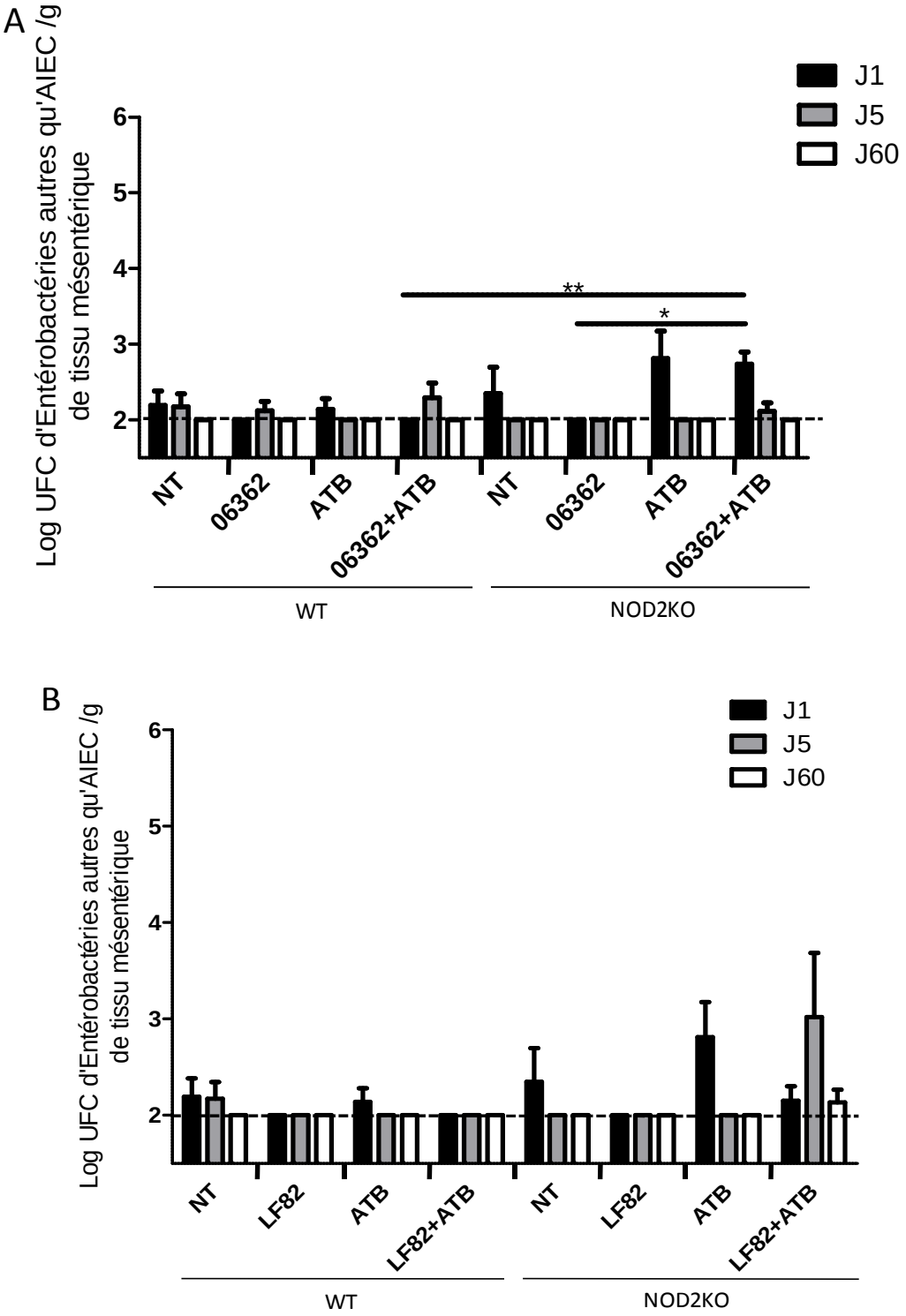
De même, nous avons observé une translocation des entérobactéries autres qu'AIEC uniquement dans les tissus mésentériques des souris NOD2KO (Figure 28). Nos résultats démontrent une plus grande susceptibilité des souris NOD2KO à la colonisation et à la persistance de bactéries potentiellement pathogènes, indépendamment de la présence d'AIEC.



<u>Figure 26 :</u> Colonisation par les Entérobactéries autres qu'AIEC dans l'iléon et le côlon après traitement antibiotique. Quantification des Entérobactéries autre qu'AIEC (*E. coli* non-invasif*, Enterobacter cloacae, Serratia odorifera, Klebsiella oxytoca*) adhérents aux muqueuses iléale (A) et colique (B) chez les souris WT et NOD2KO à J1, J5 et J60 après un traitement antibiotique et une infection orale par 10^9 UFC d'AIEC 06362. Nombre de souris par groupe : n=5 dans les groupes NT WT et NOD2KO, et dans les groupes infectés par AIEC 06362 WT et NOD2KO, et n=6 dans les autres groupes. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 4 log UFC/g. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.



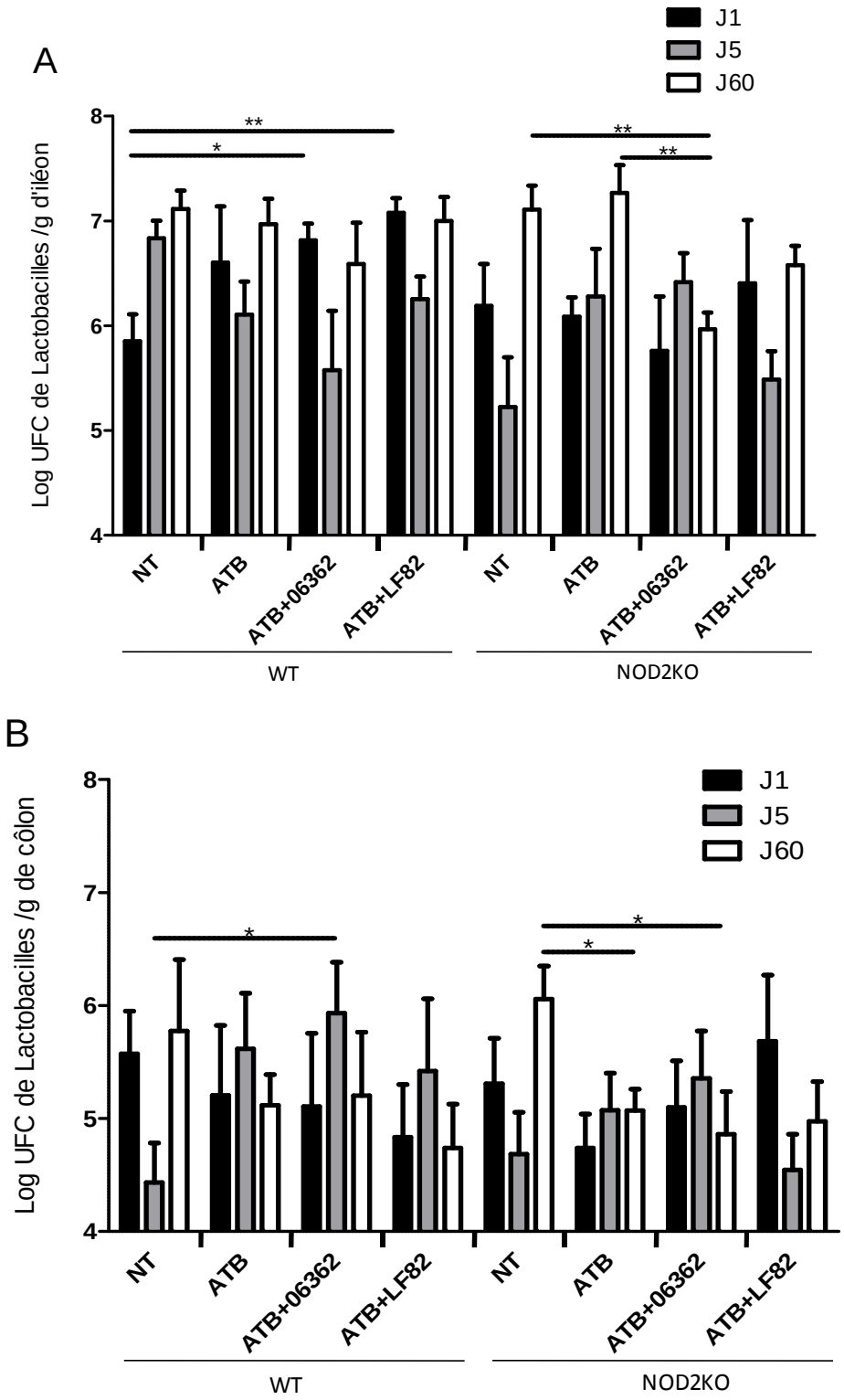
<u>Figure 27 :</u> Colonisation par les Entérobactéries autres qu'AIEC dans l'iléon et le côlon après traitement antibiotique. Quantification des Entérobactéries autre qu'AIEC (*E. coli* non-invasif*, Enterobacter cloacae, Serratia odorifera, Klebsiella oxytoca*) adhérents aux muqueuses iléale (A) et colique (B) chez les souris WT et NOD2KO à J1, J5 et J60 après un traitement antibiotique et une infection orale par 10^9 UFC d'AIEC LF82. Nombre de souris par groupe : n=4 à 7 dans le groupe WT NT, n=4 à 6 dans les groupes infectés par AIEC LF82 et n=6 dans les autres groupes. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 4 log UFC/g. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.



<u>Figure 28 :</u> Colonisation par les Entérobactéries autres qu'AIEC dans les tissus mésentériques après traitement antibiotique. Quantification des Entérobactéries autres qu'AIEC (*E. coli* non-invasif, *Enterobacter cloacae, Serratia odorifera, Klebsiella oxytoca*) dans les tissus mésentériques (ganglions et graisse mésentériques) chez les souris WT et NOD2KO à J1, J5 et J60 après un traitement antibiotique et une infection orale par 10^9 UFC d'AIEC 06362 (A) ou AIEC LF82 (B). Nombre de souris par groupe : n=4 à 7 dans le groupe WT NT, n=4 à 6 dans les groupes infectés par AIEC, et n=6 dans les autres groupes. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 2 log UFC/g. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

5) Perturbation de la flore lactobacillaire chez les souris WT et NOD2KO suite au traitement antibiotique :

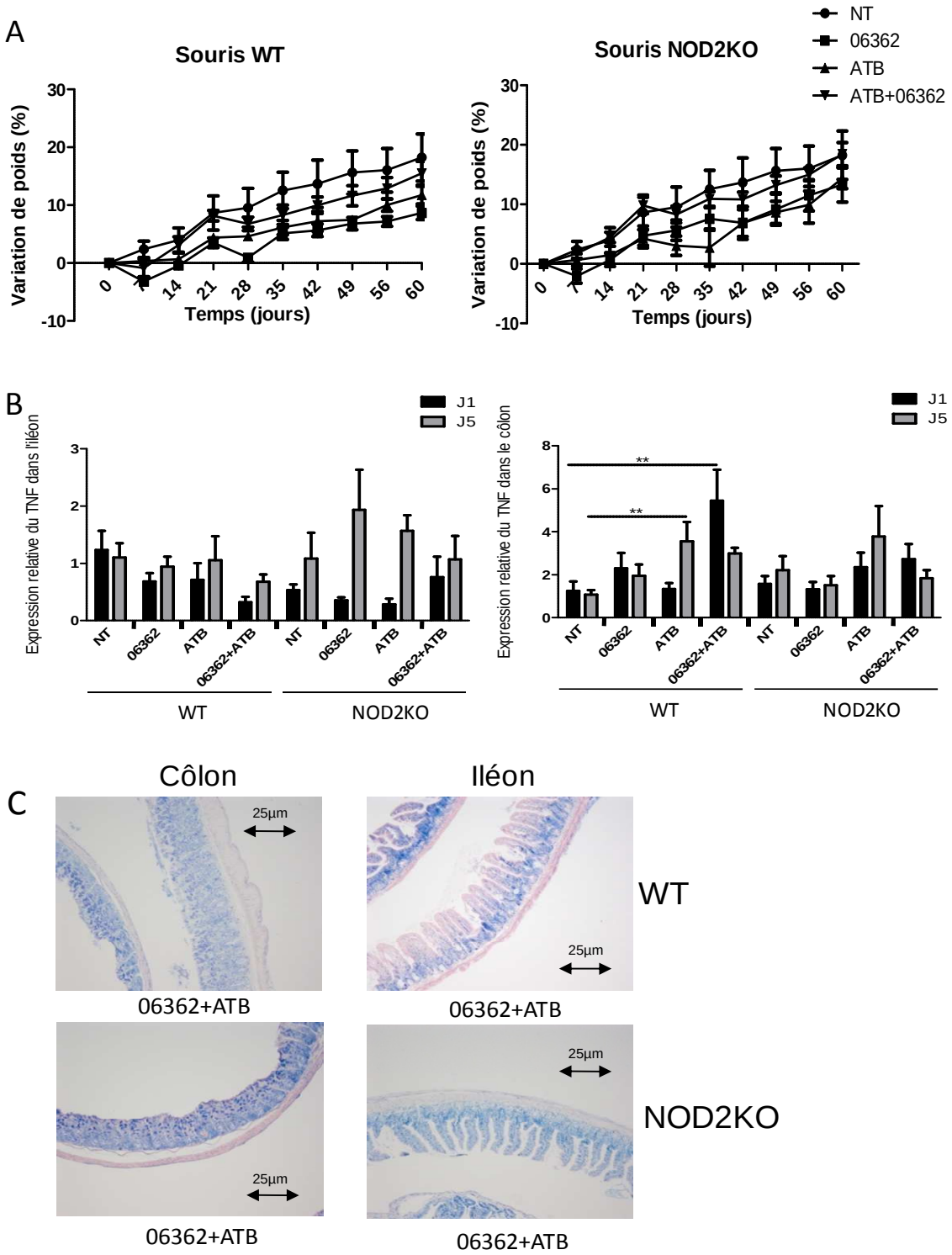
Nous avons analysé l'effet du traitement antibiotique et de la colonisation par AIEC sur la flore lactobacillaire, majoritaire chez les souris. Nous avons observé une augmentation des lactobacilles dans l'iléon et le côlon des souris WT traitées par antibiotique et infectées par AIEC, respectivement à J1 et J5 après la fin de l'infection, correspondant à 5 et 7 jours après la fin du traitement antibiotique (Figure 29 A et B). Cette augmentation était transitoire et la flore lactobacillaire retrouvait son état initial 2 mois après la fin du traitement chez les souris WT. Chez les souris NOD2KO, le traitement antibiotique et la colonisation par AIEC induisaient une perturbation plus durable de la flore avec une diminution des lactobacilles à J60 après l'infection. Nos résultats montrent qu'un traitement antibiotique associé à la colonisation par AIEC a induit une perturbation de la flore lactobacillaire, transitoire chez les souris WT, plus durable chez les souris NOD2KO.



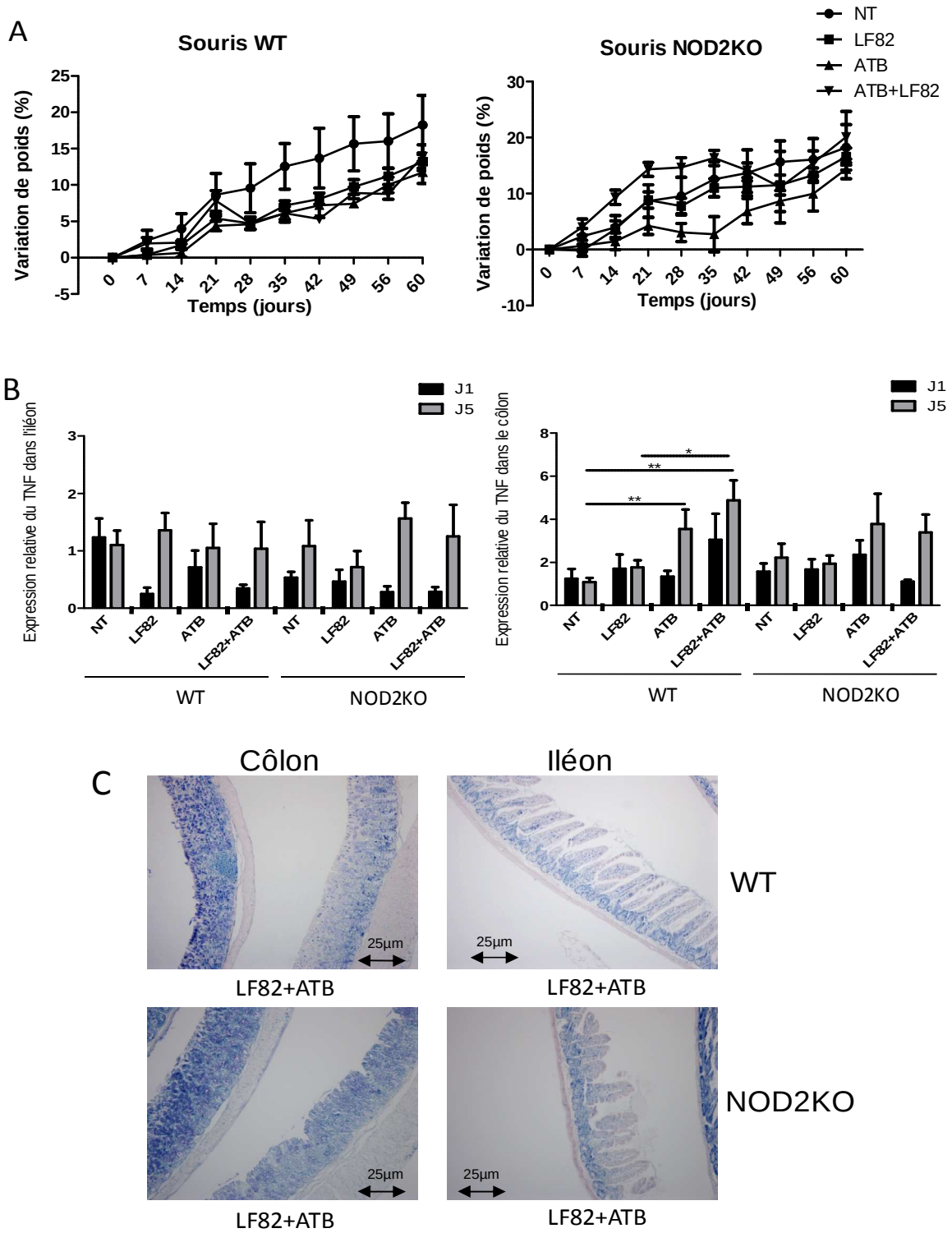
<u>Figure 29 :</u> Colonisation par les Lactobacilles dans l'iléon et le côlon après traitement antibiotique. Quantification des *Lactobacillus sp.* adhérents aux muqueuses iléale (A) et colique (B) chez les souris WT et NOD2KO à J1, J5 et J60 après un traitement antibiotique et une infection orale par 10^9 UFC d'AIEC 06362 ou LF82. Le nombre de souris par groupe : n=5 dans les groupes NT, et n=4 à 6 dans les autres groupes. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 4 log UFC/g. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

6) Inflammation intestinale chez les souris WT et NOD2KO colonisées par AIEC :

L'effet de la colonisation par AIEC sur l'inflammation intestinale a été mesuré à l'aide de paramètres clinique, histologique et moléculaire de J1 à J60. Le poids des souris a augmenté chez tous les animaux et aucune différence de variation de poids n'a été observée entre les souris WT et NOD2KO non traitées et les souris infectées par AIEC 06362 (Figure 30 A). De même, l'expression de TNF a été évaluée à J1 et J5 et elle ne montrait pas d'augmentation chez les souris WT et NOD2KO colonisées par AIEC 06362, comparée aux souris traitées par les antibiotiques seuls (Figure 30 B). Enfin, nous avons observé l'inflammation par histologie à J1, J5 et J60 post-infection et aucune modification de l'architecture intestinale à J1 (Figure 30 C), correspondant au taux le plus élevé d'AIEC retrouvé dans l'intestin et le mésentère, n'a été observée, de même qu'à J5 et J60. De la même façon que pour AIEC 06362, la colonisation de l'intestin et des tissus mésentériques par LF82 n'a induit aucun signe d'inflammation intestinale (Figure 31 A, B et C). Dans l'ensemble, nos résultats ne sont pas en faveur d'une inflammation intestinale induite par la colonisation de l'intestin et des tissus mésentériques par AIEC.



<u>Figure 30 :</u> Evaluation des paramètres clinique, moléculaire et histologique de l'inflammation intestinale après traitement antibiotique. (A) Evolution du poids exprimée en pourcentage de variation chez les souris WT et NOD2KO ; (B) Expression du TNF ARNm par real-time PCR dans l'iléon et le côlon des souris WT et NOD2KO à J1 et J5. Les taux d'ARNm sont normalisés par rapport à la β-actine ; (C) Observations microscopiques montrant des sections représentatives de l'iléon et du colon des souris WT et NOD2KO traitées par antibiotiques et infectées par AIEC 06362 à J1. Nombre de souris par groupe : n=4 dans le groupe WT NT, n=5 dans le groupe NOD2KO NT et n=6 dans les autres groupes. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.



<u>Figure 31 :</u> Evaluation des paramètres clinique, moléculaire et histologique de l'inflammation intestinale après traitement antibiotique. (A) Evolution du poids exprimée en pourcentage de variation chez les souris WT et NOD2KO ; (B) Expression du TNF ARNm par real-time PCR dans l'iléon et le côlon des souris WT et NOD2KO à J1 et J5. Les taux d'ARNm sont normalisés par rapport à la β-actine ; (C) Observations microscopiques montrant des sections représentatives de l'iléon et du colon des souris WT et NOD2KO traitées par antibiotiques et infectées par AIEC LF82 à J1. Nombre de souris par groupe : n=4 à 7 dans le groupe WT NT, n=4 à 6 dans les groupes infectés par AIEC LF82 et n=6 dans les autres groupes. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

CONCLUSION

Notre hypothèse était qu'une perturbation momentanée de la flore intestinale normale par un traitement antibiotique de courte durée, permettrait l'invasion de la muqueuse intestinale par AIEC, en présence d'une prédisposition génétique. Pour cela nous avons montré qu'un déséquilibre de la fonction barrière intestinale, induit par les antibiotiques, était nécessaire à la colonisation de l'intestin par la bactérie AIEC. De plus, les souris NOD2KO ont montré une perturbation plus profonde de la flore par les antibiotiques, puisque AIEC ne se contentait pas de coloniser l'intestin de ces souris, mais pouvait y persister plusieurs jours et coloniser les tissus mésentériques. De même, la plus grande sensibilité des souris NOD2KO aux infections bactériennes a aussi été montrée par l'émergence d'entérobactéries opportunistes dans l'intestin et les tissus mésentériques de ces souris traitées aux antibiotiques.

Ces résultats valident donc notre hypothèse de départ. Malgré tout, la colonisation des souris NOD2KO par AIEC n'a pas induit de signe d'inflammation intestinale à court et moyen terme. La colonisation par AIEC ne semble pas induire d'inflammation précoce, mais allonge le temps de colonisation et augmente la perméabilité intestinale pour les bactéries opportunistes. Nous avons donc décidé d'explorer la colonisation intestinale par AIEC dans un contexte d'inflammation préexistante.

PARTIE 3

INFLUENCE D’UN TRAITEMENT AU DSS SUR LE MODELE DE COLONISATON PAR AIEC

I) INTRODUCTION

Comme nous l'avons démontré précédemment, la colonisation et la persistance d'AIEC dans l'intestin et les tissus mésentériques des souris NOD2KO ne sont pas suffisantes pour induire une inflammation intestinale. Il manque à notre modèle animal un facteur permettant à la bactérie AIEC d'exercer son pouvoir pro-inflammatoire. L'existence d'un terrain affaibli et d'une inflammation préexistante a été avancée pour expliquer le pouvoir pathogène d'AIEC chez les patients atteints de MC [225]. L'existence de porteurs sains de souches d'AIEC va dans ce sens [158, 163]. De plus, la physiopathologie de la MC implique de nombreux facteurs environnementaux responsables du développement et de la persistance d'une inflammation intestinale, certains reconnus, comme le tabac, d'autres seulement suspectés, comme le stress ou certains médicaments [189, 210, 212].

Il existe plusieurs modèles animaux d'inflammation intestinale utilisés dans l'exploration de la MC, notamment le modèle de colite au DSS. Le DSS agit comme un perturbateur de la barrière intestinale. Il induit une colite très reproductible pouvant être chronique ou aigüe suivant la dose, la durée de traitement et le fond génétique des animaux [222]. Une étude de Carvalho *et al.* a associé une inflammation aiguë induite par du DSS et une infection par la souche d'AIEC LF82 aux signes de la MC [225]. Nous avons donc décidé d'ajouter un facteur d'inflammation aiguë à notre protocole afin de permettre à AIEC d'exprimer son pouvoir pathogène.

Notre second but est donc de mesurer l'effet d'une inflammation préexistante sur l'expression de la pathogénicité d'AIEC. Notre hypothèse est qu'une déstabilisation de la flore intestinale sur un terrain déjà inflammé permettrait à AIEC, non seulement de coloniser la muqueuse et les tissus mésentériques, mais aussi d'exercer son pouvoir pro-inflammatoire en aggravant l'inflammation aiguë et en la faisant persister.

II) MATERIELS ET METHODES

1) Souches bactériennes :

La souche d'AIEC 06362, isolée de lésions iléales chroniques de patients atteints de MC, a été comparée à la souche commensale *Escherichia coli* K12, utilisée comme référence non pathogène. Les bactéries sont mises en culture pendant la nuit dans du milieu Luria-Bertani (LB) à 37℃. Les cultures sont centrifugées à 3000g pendant 15min. Les culots bactériens sont repris dans du NaCl à 0,9% pour l'administration intra-gastrique.

2) Protocole de colite induite par le DSS :

Des souris sauvages et NOD2KO (C57/Bl6), âgées de 8 à 12 semaines, ont reçu 2% (pds/vol) de DSS (masse moléculaire = 40kDa, TdB, Uppsala, Suède) dans l'eau de boisson, à partir du début du traitement antibiotique précédemment décrit, et sont inoculées avec la souche bactérienne AIEC comme décrit précédemment (Figure 31). Les contrôles sont constitués de souris recevant le DSS et le traitement antibiotique sans infection bactérienne par AIEC (DSS+ATB). Les animaux sont sacrifiés après 9 jours de traitement au DSS. Des échantillons d'iléon, de colon, de ganglions mésentériques et de graisse mésentériques sont prélevés et traités comme décrit précédemment.

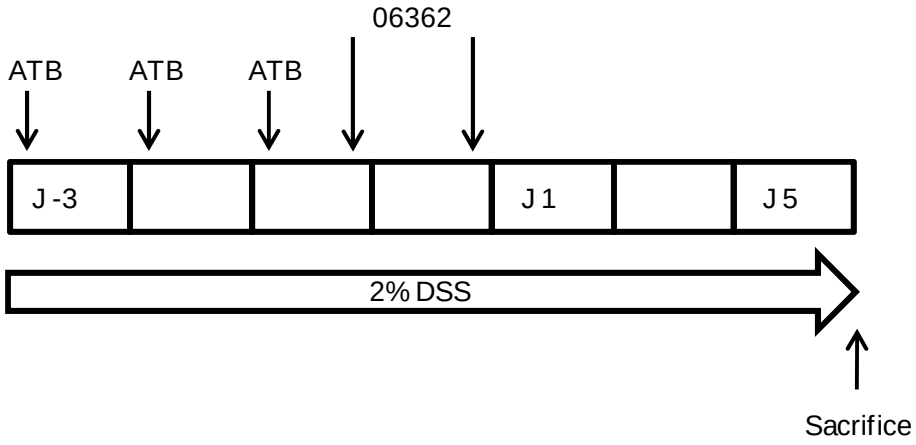


Figure 32 : Protocole expérimental de colite au DSS.

3) Evaluation de la colite et analyse des dommages histologiques :

Le Disease activity index (DAI) et le score histologique sont déterminés comme décrit précédemment [224]. Le DAI rassemble les scores de la perte de poids, de la présence d'un saignement rectal et de la consistance des selles. Le saignement rectal est mesuré à l'aide du test Hemoccult II (SKD SARL). Le score DAI est échelonné de 0 (sain) à 12 (très forte

activité de la colite). Après le sacrifice, le côlon et l'iléon proximal sont excisés et des rouleaux de côlon et d'iléon sont fixés dans du paraformaldéhyde 4% tamponné, puis inclus en paraffine. Des coupes de 4µm sont réalisées, puis colorées au May-Grünwald Giemsa (MGG). La sévérité de l'inflammation est mesurée en aveugle. Le score histologique est fonction de l'intensité de l'infiltrat inflammatoire et de l'intensité et l'étendue des dommages épithéliaux. Le score histologique est échelonné de 0 (sain) à 6 (très forte inflammation).

4) Tests statistiques :

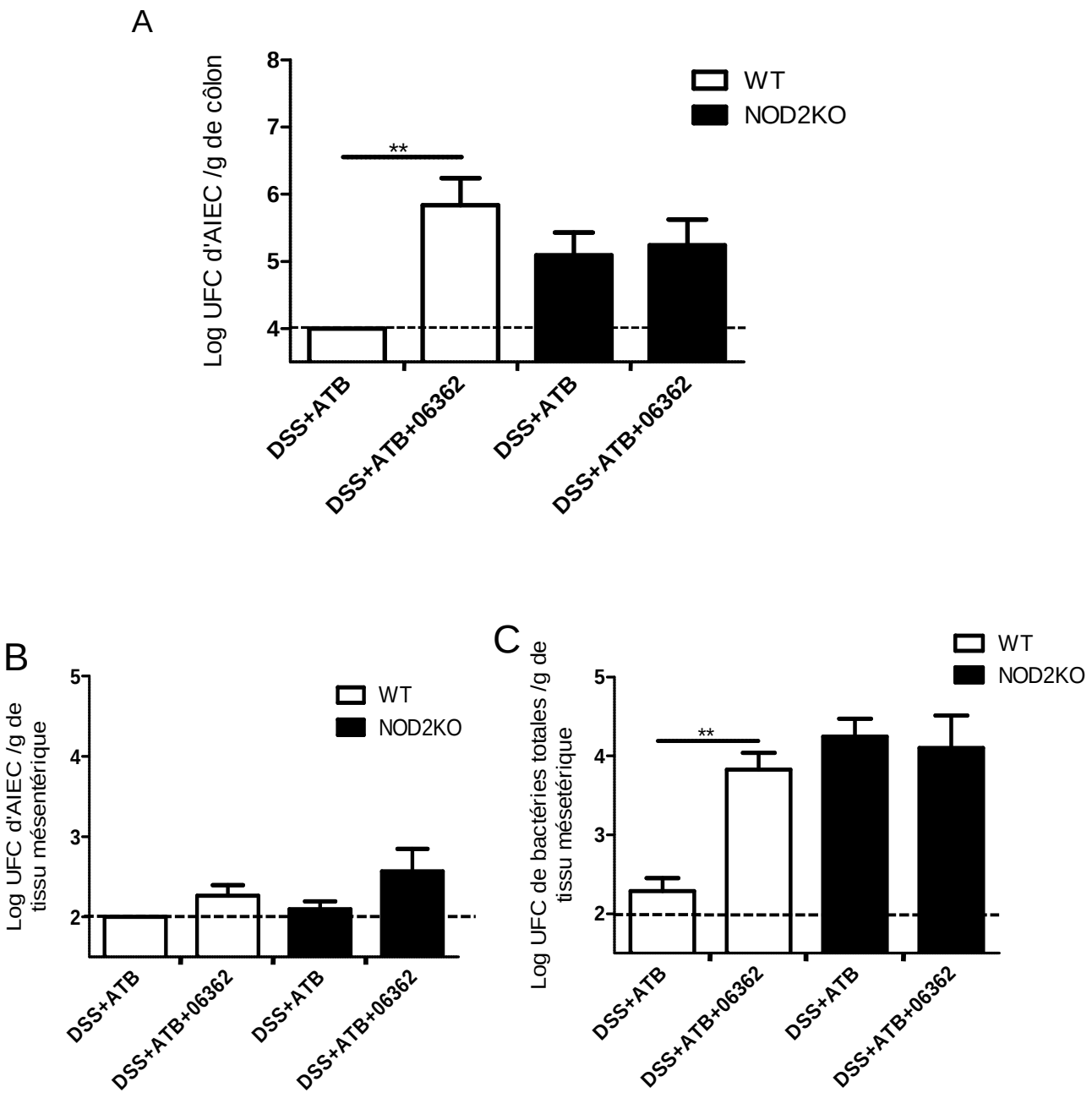
Les analyses statistiques sont réalisées avec le test exact de Wilcoxon-Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism5. Les résultats sont considérés comme significatifs au seuil $p<0,05$.

Les analyses bactériologiques, les tests d'invasion et les tests moléculaires ont été réalisés selon les protocoles précédemment décrits.

III) RESULTATS EXPERIMENTAUX

1) Colonisation des souris WT et NOD2KO après traitement par le DSS :

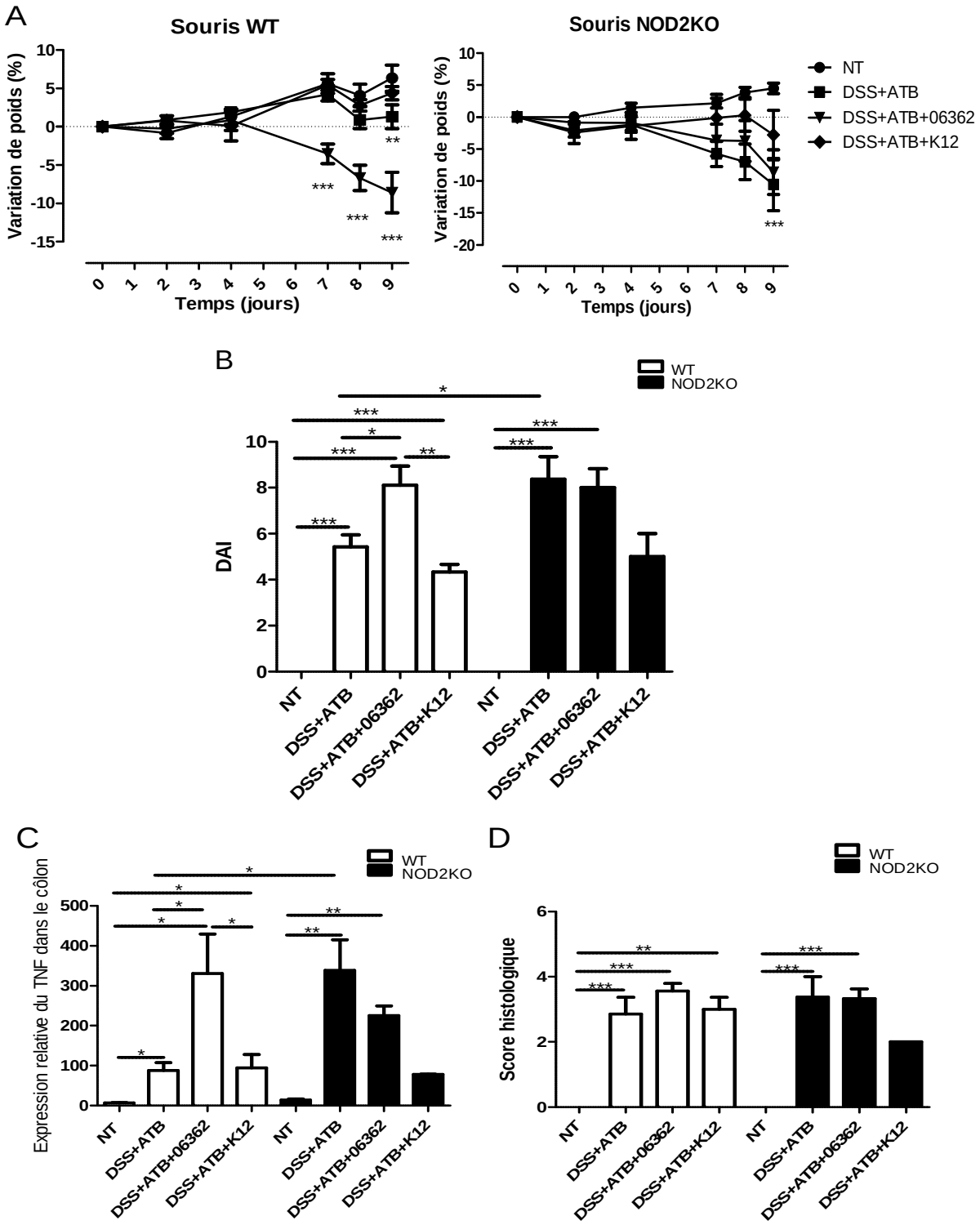
Nous avons analysé la colonisation de l'intestin et des tissus mésentériques après le traitement par le DSS et l'infection par AIEC 06362. A la fin du traitement par le DSS, correspondant à 5 jours après la fin de l'infection, nous avons observé une colonisation significative de l'intestin des souris WT et NOD2KO par AIEC ; néanmoins, aucune différence n'a été observée entre les souris WT et NOD2KO (Figure 33 A). De plus, chez les souris NOD2, le traitement antibiotique associé au DSS induit une forte colonisation par AIEC, supposant l'émergence d'*E. coli* invasifs chez ces souris. Par comparaison avec le traitement antibiotique seul, où AIEC n'était plus détecté 5 jours après l'infection (Figure 23), nous avons montré que le DSS induisait une persistance des AIEC dans le côlon. En ce qui concerne la translocation mésentérique, le traitement par le DSS n'a pas induit une colonisation significative des tissus mésentériques des souris WT et NOD2KO par AIEC (Figure 33 B). Néanmoins, une augmentation de la translocation de bactéries opportunistes (AIEC, *E. coli* non invasifs*, Cronobacter sakazakii, Enterobacter cloacae, Enterococcus sp, Clostridium clostridioforme, Prevotella, Ruminococcus*) a été observée chez les souris WT et NOD2KO suite au traitement par le DSS (Figure 33 C).



<u>Figure 33 :</u> Colonisation du côlon et des tissus mésentériques après traitement par le DSS et les antibiotiques. Quantification des AIEC associées à la muqueuse colique (A) et aux tissus mésentériques (B), et quantification de la flore totale associée aux tissus mésentériques (AIEC, *E.coli* non invasifs*, Cronobacter sakazakii, Enterobacter cloacae, Lactobacillus sp, Enterococcus sp, Clostridium clostridioforme, Prevotella, Ruminococcus*) (C) chez les souris WT et NOD2KO recevant 2% DSS et le traitement antibiotique, 5 jours après une infection orale par 10^9 UFC d'AIEC 06362. Nombre de souris par groupe : n=9 dans les groupes infectés par AIEC 06362, et n=7 dans les autres groupes. Les résultats sont exprimés en log UFC/g de tissu avec un seuil de détection de 4 log UFC/g pour le côlon et 2 log UFC/g pour les tissus mésentériques. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

2) Inflammation chez les souris WT et NOD2KO colonisées par AIEC 06362 après le traitement par le DSS :

Nous avons mesuré la sévérité de l'inflammation suite au traitement par le DSS sur les paramètres cliniques (poids corporel et DAI), l'expression du TNF et l'analyse histologique des tissus. Les variations de poids étaient en faveur d'une persistance de l'inflammation chez les souris sauvages infectées par AIEC 06362. L'infection par AIEC 06362 a induit une perte de poids très significative comparée aux souris non infectées et aux souris infectées par la souche commensale d'*E. coli* K12 (Figure 34 A). Le DAI, l'expression du TNF et le score histologique, mesurés à 5 jours, étaient significativement augmentés chez les souris WT infectées par AIEC 06362 comparés aux autres groupes (Figures 34 B, C et D). Nous avons aussi observé un effet dramatique du traitement par le DSS sur la perte de poids des souris NOD2KO avec ou sans infection par AIEC 06362. Chez les souris NOD2KO, l'infection par AIEC 06362 n'a pas aggravé le DAI, l'expression de TNF et le score histologique déjà très augmentés suite au traitement par le DSS et aucune différence n'est observée entre les souris infectées et non infectées par AIEC (Figure 34 B, C et D).



<u>Figure 34 :</u> Evaluation des paramètres cliniques et moléculaires de la colite. (A) L'évolution du poids corporel est exprimé en pourcentage de variation ; (B) L'index d'activité de la maladie (DAI) reflète les paramètres cliniques (perte de poids, consistance des selles et saignement rectal) à J5 après l'infection ; (C) L'expression du TNF mRNA est mesurée par real-time PCR dans le colon à J5 après l'infection. Le niveau de mRNA a été normalisé par rapport à la βactine ; (D) Le score histologique reflète l'intensité de l'inflammation de la muqueuse et de la sous-muqueuse à J5 après l'infection. Nombre de souris par groupe : n=9 dans les groupes infectés par AIEC 06362, et n=7 dans les autres groupes. Les barres d'erreur représentent le SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p<0,001$.

IV) CONCLUSION

Notre hypothèse était qu'une déstabilisation de la flore intestinale sur un terrain déjà inflammé permettrait à AIEC, non seulement de coloniser la muqueuse et les tissus mésentériques, mais aussi d'exercer son pouvoir pro-inflammatoire en aggravant l'inflammation aiguë et en la faisant persister. Nos résultats montrent que le traitement par le DSS a induit une colonisation persistante d'AIEC dans le côlon, indépendante du statut de NOD2. De plus, nous avons observé une augmentation des paramètres inflammatoires de la colite induite par le DSS chez les souris WT infectées par AIEC 06362, non observée après un traitement antibiotique seul. Enfin, les souris NOD2KO étant déjà très sensibles à une colite induite par le DSS, aucune détérioration supplémentaire n'a été observée suite à l'infection par AIEC 06362.

Le pouvoir pro-inflammatoire d'AIEC s'exprime donc davantage en présence d'une inflammation préexistante. Malheureusement, la trop forte réactivité des souris NOD2KO au DSS n'a pas permis de constater de différence entre les groupes infectés et non infectés par AIEC 06362. L'utilisation d'un DSS moins dosé pourrait permettre d'observer une différence entre ces groupes. De même l'étude de la persistance de la colonisation et/ou de l'inflammation intestinale après l'arrêt du traitement au DSS nous permettrait peut-être d'observer des différences entre les souris WT et NOD2KO quant à la capacité de rémission intestinale des souris.

PARTIE 4

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

I) DISCUSSION

L'augmentation de la prévalence de la MC au cours des dernières années en France et dans le monde a fait de cette maladie un enjeu thérapeutique majeur. La découverte du polymorphisme du gène *NOD2,* lié à une augmentation de la susceptibilité à la MC, a considérablement enrichi la réflexion sur l'origine de la maladie en orientant les recherches vers une interaction du système immunitaire muqueux avec la flore intestinale en général et des bactéries invasives en particulier [31, 41]. Bien que le rôle exact de la protéine mutée NOD2 dans le déclenchement de la MC soit encore mal expliqué, son implication dans la régulation de la flore intestinale, *via* notamment la sécrétion des peptides antibactériens ou la régulation de l'autophagie, est maintenant largement reconnue [43, 66]. Parmi les nombreuses bactéries mises en cause dans le déclenchement ou l'entretien de l'inflammation intestinale, *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC) est décrit comme colonisant préférentiellement la muqueuse intestinale des patients atteints de MC, comparés aux contrôles sains, supposant un rôle d'AIEC au cours de la MC [162]. Le développement de nouveaux animaux est essentiel à une meilleure compréhension des mécanismes de l'inflammation intestinale conduisant à la MC. Notre but était donc de comprendre les mécanismes associant un facteur génétique, la mutation du gène *NOD2*, à des facteurs environnementaux influant sur l'organisation et la composition de la flore intestinale et permettant la colonisation par la bactérie AIEC.

Dans cette étude, nous avons analysé la colonisation de souris NOD2KO par AIEC, après un traitement antibiotique dont le but était de déséquilibrer la flore intestinale commensale. Une des fonctions clés de la flore intestinale est la protection de la muqueuse vis-à-vis des pathogènes intestinaux, notamment par la stratégie d'occupation de l'espace et la sécrétion de divers composés bactéricides. Nous avons supposé que la barrière intestinale pourrait empêcher les bactéries AIEC d'adhérer à la muqueuse intestinale et de pénétrer dans les cellules. Pour contrecarrer ce phénomène, nous avons utilisé des antibiotiques non absorbables par la muqueuse, la gentamicine et la vancomycine, décrits comme induisant une profonde rupture dans la résistance à la colonisation [235, 236], sans influer sur la translocation bactérienne. En effet, alors qu'AIEC n'est pas capable de coloniser l'intestin des souris en l'absence de traitement antibiotique, nous avons observé un taux élevé de cette bactérie dans les muqueuses colique et iléale des souris WT et NOD2KO immédiatement après la perturbation de la microflore et l'inoculation d'AIEC. Le tropisme préférentiellement iléal d'AIEC est confirmé ici avec une absence de colonisation dans le côlon des souris WT traitées ou non par antibiotiques [158]. Ces résultats sont en adéquation avec les observations montrant qu'AIEC adhère préférentiellement à une muqueuse affaiblie de patients atteint de MC qu'à une couche de cellules épithéliales intactes de patients contrôles sains [237]. Afin d'éviter la spécificité de souche, nous avons

testé deux souches d'AIEC différentes (06362 et LF82) et avons observé le même comportement.

Chez les souris invalidées pour le gène *NOD2*, l'antibiothérapie potentialise la colonisation iléale et colique d'AIEC. Contrairement aux souris WT, la colonisation par AIEC a persisté plus longtemps chez les souris NOD2KO et la translocation bactérienne était augmentée chez ces souris montrant un défaut d'élimination des bactéries pénétrant dans les tissus mésentériques lié aux mutations du gène *NOD2*. La translocation bactérienne consiste en un passage de bactéries vivantes de la flore intestinale à travers la muqueuse vers les ganglions mésentériques, puis vers la circulation sanguine. La perméabilité intestinale et la translocation bactérienne sont augmentées au cours de la MC [238, 239] et sont corrélées aux risques de rechute et à l'entretien de l'inflammation chronique [128]. Une étude montre une corrélation entre la présence d'ADN bactérien dans la circulation sanguine et le polymorphisme du gène *NOD2* [240]. Nous avons étudié la translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques, mais aussi vers la graisse mésentérique. En effet, il a été décrit que la graisse mésentérique montrait un plus haut niveau de colonisation que les ganglions mésentériques chez les patients atteints de MC [112]. Nos résultats confirment cette observation en révélant un niveau de translocation bactérienne supérieur dans la graisse mésentérique. Chez les patients atteints de MC, des modifications de la graisse mésentérique, notamment l'apparition d'un phénotype inflammatoire [110], pourraient s'expliquer par la présence de bactéries qui participeraient à la persistance de l'inflammation, comme le suggère Behr *et al.* dans son modèle « inside-out » [111, 112]. L'étude de la graisse mésentérique chez les patients atteints de MC pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes conduisant au développement de la maladie.

L'augmentation de la translocation bactérienne chez les souris NOD2KO n'était pas spécifique d'AIEC mais apparaissait aussi pour les autres entérobactéries, comme *E. coli* non-invasif, *Enterobacter*, *Serratia* ou *Klebsiella*, absentes sans traitement antibiotique. Ces mêmes bactéries étaient augmentées dans les muqueuses colique et iléale des souris traitées aux antibiotiques, avec une persistance plus longue chez les souris NOD2KO par rapport aux WT. Les souris NOD2KO montrent donc une plus grande permissivité de la muqueuse intestinale et une plus grande sensibilité à une déstabilisation de la flore intestinale en général. En effet, une étude de Kobayashi *et al.* a montré une plus grande sensibilité des souris NOD2KO à une infection bactérienne par voie orale [62], et un modèle de souris NOD2KO soumises à une infection par *Helicobacter hepaticus* a montré le développement d'une inflammation iléale granulomateuse, non observée en absence d'infection [241]. Les entérobactéries retrouvées dans l'intestin et les tissus mésentériques de nos souris sont des pathogènes opportunistes, ce qui permet de supposer que les antibiotiques seraient responsables, chez les patients porteurs de mutations *NOD2*, de la

colonisation par des pathogènes digestifs. Il serait intéressant d'analyser si les patients atteints de MC et porteurs de mutations *NOD2* sont plus sensibles aux infections opportunistes que les patients non porteurs.

Le traitement antibiotique associé à une infection par AIEC 06362 conduit à une forte colonisation intestinale et mésentérique par AIEC, mais n'induit qu'une faible perturbation de la flore lactobacillaire des souris WT et NOD2KO. En effet, l'augmentation des Lactobacilles constatée dans l'iléon et dans le côlon des souris WT, respectivement deux et sept jours après la fin du traitement antibiotique, peut s'expliquer par l'effet rebond de la flore intestinale consécutif au traitement antibiotique [202]. Ces résultats peuvent sembler en contradiction avec des données antérieures montrant un effet protecteur des Lactobacilles sur la colonisation par des pathogènes intestinaux [181]. Nous pouvons donc supposer que les Lactobacilles ne joueraient leur rôle de barrière que s'ils sont capables de former un biofilm stable à la surface des cellules épithéliales. La stabilité de la flore commensale est un facteur essentiel dans la défense vis-à-vis des pathogènes intestinaux. En effet, on observe des périodes d'instabilité de flore entre poussée et rémission chez les patients atteints de MC [148]. Enfin, les souris NOD2KO semblent avoir plus de difficultés à rétablir leur flore intestinale puisque la flore lactobacillaire était encore perturbée deux mois après la fin du traitement chez les souris traitées par antibiotiques et infectées par AIEC 06362, alors que ce déséquilibre était transitoire chez les souris WT. Un traitement antibiotique de courte durée suffirait à modifier durablement l'équilibre hôte/flore intestinale en favorisant l'implantation de bactéries pathogènes chez les patients génétiquement prédisposés. L'utilisation répétée d'antibiotiques durant l'enfance et la grossesse est par ailleurs récriée par de nombreux spécialistes qui pointent les modifications permanentes de la flore intestinale protectrice [242].

Ces résultats montrent qu'une perturbation du biofilm protecteur intestinal est nécessaire pour permettre à AIEC d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales. Un biofilm perméable pourrait être un facteur de risque conduisant au développement d'une MICI. Des études cliniques ont montré une plus grande consommation d'antibiotiques dans les 2 à 5 ans précédant le diagnostic de la maladie chez des patients atteints de MC comparés à des contrôles [204], ainsi qu'un risque augmenté de MC pédiatrique dû à l'utilisation d'antibiotiques avant l'âge de 5 ans, et particulièrement durant la première année de vie [205, 206]. Ces données rétrospectives ont été confirmées par une étude prospective récente montrant que la consommation d'antibiotiques durant l'enfance prédisposait au risque de MC pédiatrique [207]. Il existe aussi d'autres mécanismes déséquilibrant la flore intestinale normale, notamment les infections aiguës par des entéropathogènes comme *Salmonella* ou *Campylobacter,* qui apparaissent comme des facteurs de risque au développement de MICI [200, 201].

Néanmoins, les animaux ont été suivis pendant deux mois et la colonisation par AIEC ne persistait pas chez les souris WT et NOD2KO. De plus, bien que les souches d'AIEC aient été capables de coloniser et de persister dans la muqueuse intestinale et dans les tissus mésentériques des souris NOD2KO, aucun signe clinique, histologique ou biologique d'inflammation n'a été observé chez les animaux sauvages ou invalidés pour le gène *NOD2*. La colonisation et la persistance d'AIEC dans les muqueuses intestinales et les tissus mésentériques ne sont pas suffisantes pour perturber l'architecture intestinale et induire une inflammation chez les souris NOD2KO.

Il existe de nombreux facteurs environnementaux, auxquels sont exposés les patients atteints de MC, connus pour aggraver l'inflammation ou augmenter le risque de rechute, notamment l'alimentation, le tabac, les médicaments ou encore le stress [189, 210, 212]. En effet, l'existence d'un terrain affaibli et d'une inflammation préexistante a été avancée pour expliquer le pouvoir pathogène d'AIEC chez les patients atteints de MC [225].

Afin de mieux comprendre le rôle de la colonisation par AIEC comme agent inducteur de l'inflammation ou comme simple contributeur dans la physiopathologie de la MC, nous avons mis en place un modèle d'inflammation induit par le DSS associé à une colonisation par AIEC. Nous avons observé un niveau de colonisation par AIEC presque dix fois supérieur au traitement antibiotique seul, avec une persistance plus longue dans les tissus coliques. Cette plus forte colonisation par AIEC était associée à une augmentation dramatique des paramètres mesurés de l'inflammation chez les souris WT. Chez les souris NOD2KO, nous avons observé une plus grande sensibilité au DSS que chez les souris WT, créant un environnement tellement inflammatoire que la colonisation par AIEC n'engendrait aucune détérioration supplémentaire. Ces observations sont en concordance avec les données publiées par *Carvahlo et al.*, qui ont montré qu'un gavage quotidien par la souche LF82 aggravait une colite induite par un DSS à 2% chez des souris WT [175]. Nos résultats montrent une colonisation persistante de la muqueuse colique par AIEC cinq jours après la fin de l'infection, dans notre modèle de colite induite par le DSS. De plus, la translocation bactérienne de nombreuses bactéries opportunistes est augmentée chez les souris WT colonisées par AIEC, renforçant le risque de persistance de l'inflammation. Que cette colonisation persistante soit une cause ou une conséquence de l'inflammation intestinale reste encore à déterminer. Le début d'une réponse réside dans le fait qu'AIEC est aussi retrouvé dans l'intestin de sujets sains [158, 163]. Au cours de cette étude, nous avons démontré qu'une persistance de la colonisation bactérienne n'était pas possible en l'absence d'inflammation chez les souris WT et NOD2KO. Nous pensons donc que la persistance bactérienne est plus une conséquence de l'inflammation, *via* une augmentation de la perméabilité intestinale permettant une translocation bactérienne non spécifique. Nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle AIEC a besoin d'un contexte particulier pour

participer au processus inflammatoire, comme la surexpression de CEACAM, du DSS ou un traitement antibiotique [232, 237].

II) CONCLUSION

L'augmentation de la prévalence de la MC en France et dans le monde au cours du siècle dernier a fait de cette maladie un enjeu thérapeutique majeur. La découverte de nouveaux mécanismes est primordiale pour l'exploration de nouvelles voies de traitement. Le but de notre étude était donc d'associer un facteur génétique, la mutation du gène *NOD2*, à un facteur environnemental, le déséquilibre de la flore intestinale, afin de mieux comprendre leur influence sur la colonisation par la bactérie AIEC et sur le déclenchement d'une inflammation intestinale. Nous avons montré que les antibiotiques favorisaient la perméabilité intestinale d'une manière dépendante de NOD2, en permettant la colonisation de l'intestin et des tissus mésentériques par AIEC. Ces données confirment que la mutation du gène *NOD2* peut influer sur la perméabilité de la paroi intestinale et est potentialisée par l'action des antibiotiques. Nos résultats indiquent également que la mutation *NOD2* induisait une susceptibilité à la colonisation par des bactéries opportunistes, ainsi qu'à la colite. Enfin, nous avons montré qu'AIEC, en dehors d'une inflammation préexistante n'était pas capable d'induire une inflammation intestinale. Ces résultats laissent entrevoir un rôle mineur de cette bactérie dans le développement d'une inflammation intestinale primaire. Nous pensons que la pathogénicité d'AIEC est plus une conséquence d'une inflammation déjà installée, *via* une augmentation de la perméabilité intestinale.

Le pouvoir pro-inflammatoire d'AIEC s'exprime donc davantage en présence d'une inflammation préexistante. Au cours de notre étude, les souris NOD2KO ont montré une très forte réactivité au traitement par le DSS. Il serait intéressant de reproduire l'expérience en utilisant un DSS moins dosé (1%), ce qui pourrait permettre d'observer une différence entre les souris NOD2KO infectées et non infectées par AIEC 06362. De même, les souris NOD2KO, de part leur plus grande perméabilité intestinale, sont susceptibles de montrer une capacité de rémission intestinale post-DSS inférieure à celle des souris WT. Pour cela, il serait nécessaire d'étudier la persistance de la colonisation et/ou de l'inflammation intestinale après l'arrêt du traitement au DSS chez ces souris. L'étude de la perméabilité intestinale des souris NOD2KO avant et après traitement par les antibiotiques pourrait aussi contribuer à montrer l'effet néfaste des traitements antibiotiques sur l'homéostasie intestinale. L'utilisation de souris porteuses de la double mutation *NOD2* et *ATG16L1* pourrait aussi s'avérer intéressante pour mieux comprendre comment ces deux mutations interagissent sur la régulation de la flore intestinale.

Notre étude a aussi permis de comparer la souche AIEC LF82 de référence à une autre souche d'AIEC et de démontrer un comportement similaire de ces souches vis-à-vis d'un déséquilibre de la flore intestinale. L'étude d'autres souches d'AIEC par spectrométrie de masse pourrait élargir nos connaissances en déterminant un profil génétique commun à

ce groupe bactérien. Enfin, la mise au point de phages dirigés contre les AIEC ou l'utilisation de probiotiques destinés à empêcher l'adhésion des AIEC à la muqueuse intestinale pourraient être des alternatives thérapeutiques pour éviter les récidives chez les patients atteints de MC. Il serait intéressant de tester l'efficacité de ces traitements à empêcher la colonisation par AIEC dans notre modèle animal.

BIBLIOGRAPHIE

1. Crohn, B.B., L. Ginzburg, and G.D. Oppenheimer, *Regional ileitis; a pathologic and clinical entity.* Am J Med, 1952. **13**(5): p. 583-90.
2. Zholudev, A., et al., *Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype.* Am J Gastroenterol, 2004. **99**(11): p. 2235-41.
3. Lewis, J.D., *The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2011. **140**(6): p. 1817-1826 e2.
4. *Atlas d'endoscopie : www.endoatlas.com/atlas_1.html.*
5. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease.* N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
6. *Association Francois Aupetit : http://www.afa.asso.fr/.* [cited.
7. Louis, E. and P. Marteau, *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*. Doin ed. 2009.
8. Nerich, V., et al., *Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data.* Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(3): p. 218-26.
9. Pearson, D.C., et al., *Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis.* Ann Intern Med, 1995. **123**(2): p. 132-42.
10. Feagan, B.G., et al., *Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators.* N Engl J Med, 1995. **332**(5): p. 292-7.
11. Baert, F., et al., *Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease.* N Engl J Med, 2003. **348**(7): p. 601-8.
12. Monteleone, G., et al., *Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells.* Gastroenterology, 1997. **112**(4): p. 1169-78.
13. Schmidt, C., et al., *Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis.* Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(1): p. 16-23.
14. Sandborn, W.J., et al., *A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease.* Gastroenterology, 2008. **135**(4): p. 1130-41.
15. van Montfrans, C., et al., *Inflammatory signal transduction in Crohn's disease and novel therapeutic approaches.* Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 789-95.
16. Roulis, M., et al., *Intestinal epithelial cells as producers but not targets of chronic TNF suffice to cause murine Crohn-like pathology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5396-401.
17. Neurath, M.F., et al., *Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice.* Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1743-50.
18. Atreya, R., et al., *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo.* Nat Med, 2000. **6**(5): p. 583-8.
19. Brandt, E., et al., *Enhanced production of IL-8 in chronic but not in early ileal lesions of Crohn's disease (CD).* Clin Exp Immunol, 2000. **122**(2): p. 180-5.
20. Strober, W. and I.J. Fuss, *Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.* Gastroenterology, 2011. **140**(6): p. 1756-67.
21. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes.* Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
22. Romagnani, S., *Biology of human TH1 and TH2 cells.* J Clin Immunol, 1995. **15**(3): p. 121-9.
23. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.* J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
24. Sartor, R.B., *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis.* Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(7): p. 390-407.
25. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
26. Kaser, A., S. Zeissig, and R.S. Blumberg, *Inflammatory bowel disease.* Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 573-621.

27. Cooney, R. and D. Jewell, *The genetic basis of inflammatory bowel disease.* Dig Dis, 2009. **27**(4): p. 428-42.
28. Binder, V., *Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease.* Dig Dis, 1998. **16**(6): p. 351-5.
29. Tysk, C., et al., *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, 1988. **29**(7): p. 990-6.
30. Hugot, J.P., *CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 9-18.
31. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.* Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
32. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.* Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
33. Lamoril, J., Deybach, J.-C., Bouizegarène, P., *Genetic aspects of Crohn's disease: a review.* Immuno-analyse et Biologie Spécialisée, 2007. **22**: p. 137-150.
34. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.* J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
35. Inohara, N., et al., *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease.* J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
36. Tanabe, T., et al., *Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition.* Embo J, 2004. **23**(7): p. 1587-97.
37. Ogura, Y., et al., *Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis.* Gut, 2003. **52**(11): p. 1591-7.
38. Magalhaes, J.G., et al., *Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity.* J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7925-35.
39. Geddes, K., et al., *Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens.* Nat Med, 2011. **17**(7): p. 837-44.
40. Perez, L.H., et al., *Direct bacterial killing in vitro by recombinant Nod2 is compromised by Crohn's disease-associated mutations.* PLoS One, 2010. **5**(6): p. e10915.
41. Sirard, J.C., et al., *Nod-like receptors: cytosolic watchdogs for immunity against pathogens.* PLoS Pathog, 2007. **3**(12): p. e152.
42. Strober, W. and T. Watanabe, *NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease.* Mucosal Immunol, 2011. **4**(5): p. 484-95.
43. Cooney, R., et al., *NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation.* Nat Med, 2010. **16**(1): p. 90-7.
44. Travassos, L.H., et al., *Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry.* Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 55-62.
45. Hsu, L.C., et al., *A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7803-8.
46. Netea, M.G., et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release.* J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6518-23.
47. Tsai, W.H., et al., *Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages.* Cell Microbiol, 2011. **13**(5): p. 717-30.
48. Watanabe, T., et al., *NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses.* Nat Immunol, 2004. **5**(8): p. 800-8.
49. Hedl, M. and C. Abraham, *Secretory mediators regulate Nod2-induced tolerance in human macrophages.* Gastroenterology, 2010. **140**(1): p. 231-41.
50. Petnicki-Ocwieja, T., et al., *Nod2 suppresses Borrelia burgdorferi mediated murine Lyme arthritis and carditis through the induction of tolerance.* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17414.
51. Rehman, A., et al., *Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities.* Gut, 2011. **60**(10): p. 1354-62.

52. Cruickshank, S.M., et al., *Evidence for the involvement of NOD2 in regulating colonic epithelial cell growth and survival.* World J Gastroenterol, 2008. **14**(38): p. 5834-41.
53. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease.* Nature, 2011. **474**(7351): p. 298-306.
54. Lesage, S., et al., *CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease.* Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 845-57.
55. Desreumaux, P., *[NOD2/CARD15 and Crohn's disease].* Gastroenterol Clin Biol, 2005. **29**(6-7): p. 696-700.
56. Riis, L., et al., *The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients.* Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(1): p. 24-32.
57. Hugot, J.P., et al., *Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people.* Am J Gastroenterol, 2007. **102**(6): p. 1259-67.
58. Pascoe, L., et al., *Estimating the odds ratios of Crohn disease for the main CARD15/NOD2 mutations using a conditional maximum likelihood method in pedigrees collected via affected family members.* Eur J Hum Genet, 2007. **15**(8): p. 864-71.
59. Cuthbert, A.P., et al., *The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2002. **122**(4): p. 867-74.
60. Lacher, M., et al., *NOD2 mutations predict the risk for surgery in pediatric-onset Crohn's disease.* J Pediatr Surg, 2010. **45**(8): p. 1591-7.
61. Niess, J.H., et al., *NOD2 Polymorphism Predicts Response to Treatment in Crohn's Disease-First Steps to a Personalized Therapy.* Dig Dis Sci, 2011.
62. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract.* Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
63. Yamamoto-Furusho, J.K. and D.K. Podolsky, *Innate immunity in inflammatory bowel disease.* World J Gastroenterol, 2007. **13**(42): p. 5577-80.
64. Maeda, S., et al., *Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing.* Science, 2005. **307**(5710): p. 734-8.
65. Philpott, D.J. and S.E. Girardin, *Crohn's disease-associated Nod2 mutants reduce IL10 transcription.* Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 455-7.
66. Wehkamp, J., et al., *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression.* Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
67. Wehkamp, J., et al., *Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(7): p. 745-52.
68. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., *MDP-NOD2 stimulation induces HNP-1 secretion, which contributes to NOD2 antibacterial function.* Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(5): p. 736-42.
69. Simms, L.A., et al., *Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease.* Gut, 2008. **57**(7): p. 903-10.
70. Bruns, T., et al., *NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis.* Liver Int, 2011.
71. Schreiber, S., et al., *Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease.* Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 376-88.
72. Richardson, W.M., et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain-2 inhibits toll-like receptor-4 signaling in the intestinal epithelium.* Gastroenterology, 2010. **139**(3): p. 904-17, 917 e1-6.
73. Noguchi, E., et al., *A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1.* Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 471-9.
74. Miceli-Richard, C., et al., *CARD15 mutations in Blau syndrome.* Nat Genet, 2001. **29**(1): p. 19-20.
75. Risch, N. and K. Merikangas, *The future of genetic studies of complex human diseases.* Science, 1996. **273**(5281): p. 1516-7.

76. Rioux, J.D., et al., *Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease.* Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 223-8.
77. Kaser, A., et al., *XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease.* Cell, 2008. **134**(5): p. 743-56.
78. Villani, A.C., et al., *Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility.* Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 71-6.
79. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene.* Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
80. Stappenbeck, T.S., et al., *Crohn disease: a current perspective on genetics, autophagy and immunity.* Autophagy. **7**(4): p. 355-74.
81. Saitoh, T., et al., *Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production.* Nature, 2008. **456**(7219): p. 264-8.
82. Plantinga, T.S., et al., *Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2.* Gut, 2011. **60**(9): p. 1229-35.
83. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells.* Nature, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
84. Homer, C.R., et al., *ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent, anti-bacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis.* Gastroenterology, 2010.
85. Brest, P., et al., *A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease.* Nat Genet, 2011. **43**(3): p. 242-5.
86. Rosenstiel, P., et al., *Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease.* Semin Immunol, 2009. **21**(6): p. 334-45.
87. Salim, S.Y. and J.D. Soderholm, *Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases.* Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 362-81.
88. Midtvedt, A.C. and T. Midtvedt, *Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life.* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1992. **15**(4): p. 395-403.
89. Adlerberth, I., et al., *Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle?* Pediatr Res, 2006. **59**(1): p. 96-101.
90. Bisgaard, H., et al., *Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 646-52 e1-5.
91. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora.* Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
92. Sghir, A., et al., *Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization.* Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(5): p. 2263-6.
93. Rigottier-Gois, L., et al., *Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes.* FEMS Microbiol Ecol, 2003. **43**(2): p. 237-45.
94. Rawls, J.F., et al., *Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection.* Cell, 2006. **127**(2): p. 423-33.
95. Lepage, P., et al., *Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD.* Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(5): p. 473-80.
96. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome.* Nature, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
97. Dethlefsen, L., et al., *The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing.* PLoS Biol, 2008. **6**(11): p. e280.
98. Skurnik, D., et al., *Characteristics of human intestinal Escherichia coli with changing environments.* Environ Microbiol, 2008. **10**(8): p. 2132-7.

99. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.
100. Strauch, U.G., et al., *Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis.* Gut, 2005. **54**(11): p. 1546-52.
101. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
102. Schultsz, C., et al., *The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls.* Gastroenterology, 1999. **117**(5): p. 1089-97.
103. Lal-Nag, M. and P.J. Morin, *The claudins.* Genome Biol, 2009. **10**(8): p. 235.
104. Van Itallie, C.M., et al., *Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers.* J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 16): p. 2844-52.
105. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease.* Gut, 2007. **56**(1): p. 61-72.
106. Spahn, T.W. and T. Kucharzik, *Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs.* Gut, 2004. **53**(3): p. 456-65.
107. Jung, C., J.P. Hugot, and F. Barreau, *Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine.* Int J Inflam, 2010. **2010**: p. 823710.
108. Barreau, F., et al., *Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches.* Gut, 2010. **59**(2): p. 207-17.
109. Bertin, B., P. Desreumaux, and L. Dubuquoy, *Obesity, visceral fat and Crohn's disease.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **13**(5): p. 574-80.
110. Olivier, I., et al., *Is Crohn's creeping fat an adipose tissue?* Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(3): p. 747-57.
111. Behr, M.A., *The path to Crohn's disease: is mucosal pathology a secondary event?* Inflamm Bowel Dis, 2009. **16**(5): p. 896-902.
112. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander?* Gut, 2007. **56**(4): p. 577-83.
113. Katz, K.D., et al., *Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives.* Gastroenterology, 1989. **97**(4): p. 927-31.
114. Arnott, I.D., K. Kingstone, and S. Ghosh, *Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease.* Scand J Gastroenterol, 2000. **35**(11): p. 1163-9.
115. Ramasundara, M., et al., *Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease.* J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(2): p. 202-8.
116. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
117. Harper, P.H., et al., *Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis.* Gut, 1985. **26**(3): p. 279-84.
118. Rutgeerts, P., et al., *Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum.* Lancet, 1991. **338**(8770): p. 771-4.
119. Guslandi, M., et al., *Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease.* Dig Dis Sci, 2000. **45**(7): p. 1462-4.
120. Kruis, W., et al., *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine.* Gut, 2004. **53**(11): p. 1617-23.
121. Sellon, R.K., et al., *Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice.* Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5224-31.
122. Llopis, M., et al., *Mucosal colonisation with Lactobacillus casei mitigates barrier injury induced by exposure to trinitronbenzene sulphonic acid.* Gut, 2005. **54**(7): p. 955-9.
123. Kim, S.C., et al., *Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria.* Gastroenterology, 2005. **128**(4): p. 891-906.

124. Madsen, K.L., et al., *Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice.* Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1107-14.
125. Duchmann, R., et al., *Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD).* Clin Exp Immunol, 1995. **102**(3): p. 448-55.
126. Macpherson, A., et al., *Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria.* Gut, 1996. **38**(3): p. 365-75.
127. Chiba, M., et al., *Presence of bacterial 16S ribosomal RNA gene segments in human intestinal lymph follicles.* Scand J Gastroenterol, 2000. **35**(8): p. 824-31.
128. Takesue, Y., et al., *Bacterial translocation in patients with Crohn's disease undergoing surgery.* Dis Colon Rectum, 2002. **45**(12): p. 1665-71.
129. Kosovac, K., et al., *Association of the NOD2 genotype with bacterial translocation via altered cell-cell contacts in Crohn's disease patients.* Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(8): p. 1311-21.
130. Kleessen, B., et al., *Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls.* Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(9): p. 1034-41.
131. Cadwell, K., et al., *Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine.* Cell, 2010. **141**(7): p. 1135-45.
132. Hansen, R., et al., *The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease.* J Gastroenterol, 2010. **45**(3): p. 266-76.
133. Hugot, J.P., et al., *Crohn's disease: the cold chain hypothesis.* Lancet, 2003. **362**(9400): p. 2012-5.
134. Sartor, R.B., *Does Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease?* Gut, 2005. **54**(7): p. 896-8.
135. Naser, S.A., et al., *Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease.* Lancet, 2004. **364**(9439): p. 1039-44.
136. Kassinen, A., et al., *The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects.* Gastroenterology, 2007. **133**(1): p. 24-33.
137. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
138. Wen, L., et al., *Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes.* Nature, 2008. **455**(7216): p. 1109-13.
139. Bjorksten, B., *Disease outcomes as a consequence of environmental influences on the development of the immune system.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2009. **9**(3): p. 185-9.
140. Sartor, R.B., *Microbial influences in inflammatory bowel diseases.* Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 577-94.
141. Guarner, F., *The intestinal flora in inflammatory bowel disease: normal or abnormal?* Curr Opin Gastroenterol, 2005. **21**(4): p. 414-8.
142. Hansen, J., A. Gulati, and R.B. Sartor, *The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria.* Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(6): p. 564-71.
143. Martinez-Medina, M., et al., *Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis.* Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(12): p. 1136-45.
144. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice.* World J Gastroenterol, 2005. **11**(8): p. 1131-40.
145. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
146. Tamboli, C.P., et al., *Dysbiosis in inflammatory bowel disease.* Gut, 2004. **53**(1): p. 1-4.
147. Neut, C., et al., *Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease.* Am J Gastroenterol, 2002. **97**(4): p. 939-46.
148. Seksik, P., et al., *Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon.* Gut, 2003. **52**(2): p. 237-42.

149. Kotlowski, R., et al., *High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease.* Gut, 2007. **56**(5): p. 669-75.
150. Manichanh, C., et al., *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach.* Gut, 2006. **55**(2): p. 205-11.
151. Ott, S.J. and S. Schreiber, *Reduced microbial diversity in inflammatory bowel diseases.* Gut, 2006. **55**(8): p. 1207.
152. Gophna, U., et al., *Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(11): p. 4136-41.
153. Sokol, H., et al., *Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(2): p. 106-11.
154. Petnicki-Ocwieja, T., et al., *Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15813-8.
155. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases.* Inflamm Bowel Dis, 2010. **17**(1): p. 179-84.
156. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli.* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 123-40.
157. Steiner, T.S., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells.* J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1769-77.
158. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease.* Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
159. Baumgart, M., et al., *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, 2007. **1**(5): p. 403-18.
160. Sasaki, M., et al., *Invasive Escherichia coli are a feature of Crohn's disease.* Lab Invest, 2007. **87**(10): p. 1042-54.
161. Boudeau, J., et al., *Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease.* Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4499-509.
162. Darfeuille-Michaud, A., et al., *High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease.* Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 412-21.
163. Martinez-Medina, M., et al., *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, 2009. **15**(6): p. 872-82.
164. Negroni, A., et al., *Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2011.
165. Glasser, A.L., et al., *Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death.* Infect Immun, 2001. **69**(9): p. 5529-37.
166. Eaves-Pyles, T., et al., *Escherichia coli isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells.* Int J Med Microbiol, 2008. **298**(5-6): p. 397-409.
167. Bringer, M.A., et al., *The Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages.* Cell Microbiol, 2006. **8**(3): p. 471-84.
168. Bringer, M.A., et al., *Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF-alpha secretion.* Lab Invest, 2011.
169. Meconi, S., et al., *Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro.* Cell Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1252-61.
170. Wine, E., et al., *Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia.* BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 180.
171. Darfeuille-Michaud, A., *Adherent-invasive Escherichia coli: a putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease.* Int J Med Microbiol, 2002. **292**(3-4): p. 185-93.

172. Krause, D.O., et al., *Complete genome sequence of adherent invasive Escherichia coli UM146 isolated from Ileal Crohn's disease biopsy tissue.* J Bacteriol, 2011. **193**(2): p. 583.
173. Miquel, S., et al., *Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli strain LF82.* PLoS One, 2010. **5**(9).
174. Martinez-Medina, M., et al., *Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli (AIEC).* BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 202.
175. Carvalho, F.A., et al., *Crohn's disease adherent-invasive Escherichia coli colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM.* J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2179-89.
176. Barnich, N. and A. Darfeuille-Michaud, *Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive E. coli.* Virulence, 2010. **1**(4): p. 281-2.
177. Rolhion, N., et al., *Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive Escherichia coli invasion.* Gut, 2010. **59**(10): p. 1355-62.
178. Chassaing, B., et al., *Crohn disease--associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae.* J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 966-75.
179. Jensen, S.R., et al., *Ex vivo intestinal adhesion of Escherichia coli LF82 in Crohn's disease.* Microb Pathog, 2011. **51**(6): p. 426-31.
180. Simonsen, K.T., et al., *A role for the RNA chaperone Hfq in controlling adherent-invasive Escherichia coli colonization and virulence.* PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16387.
181. Ingrassia, I., A. Leplingard, and A. Darfeuille-Michaud, *Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells.* Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(6): p. 2880-7.
182. Boudeau, J., et al., *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, 2003. **18**(1): p. 45-56.
183. Huebner, C., et al., *The probiotic Escherichia coli Nissle 1917 reduces pathogen invasion and modulates cytokine expression in Caco-2 cells infected with Crohn's disease-associated E. coli LF82.* Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(7): p. 2541-4.
184. Peeters, H., et al., *CARD15 variants determine a disturbed early response of monocytes to adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 in Crohn's disease.* Int J Immunogenet, 2007. **34**(3): p. 181-91.
185. Lapaquette, P., M.A. Bringer, and A. Darfeuille-Michaud, *Defects in autophagy favour adherent-invasive Escherichia coli persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response.* Cell Microbiol, 2012.
186. Soderholm, J.D., et al., *Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence?* Gut, 1999. **44**(1): p. 96-100.
187. Van de Merwe, J.P., et al., *The obligate anaerobic faecal flora of patients with Crohn's disease and their first-degree relatives.* Scand J Gastroenterol, 1988. **23**(9): p. 1125-31.
188. Pinsk, V., et al., *Inflammatory bowel disease in the South Asian pediatric population of British Columbia.* Am J Gastroenterol, 2007. **102**(5): p. 1077-83.
189. Lindberg, E., G. Jarnerot, and B. Huitfeldt, *Smoking in Crohn's disease: effect on localisation and clinical course.* Gut, 1992. **33**(6): p. 779-82.
190. Andersson, R.E., et al., *Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease.* Gastroenterology, 2003. **124**(1): p. 40-6.
191. Bernstein, C.N. and F. Shanahan, *Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases.* Gut, 2008. **57**(9): p. 1185-91.
192. Chiba, M., et al., *Lifestyle-related disease in Crohn's disease: relapse prevention by a semi-vegetarian diet.* World J Gastroenterol, 2010. **16**(20): p. 2484-95.

193. Amre, D.K., et al., *Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children.* Am J Gastroenterol, 2007. **102**(9): p. 2016-25.
194. Kau, A.L., et al., *Human nutrition, the gut microbiome and the immune system.* Nature, 2011. **474**(7351): p. 327-36.
195. Bernstein, J.A., et al., *Health effects of air pollution.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(5): p. 1116-23.
196. Koloski, N.A., L. Bret, and G. Radford-Smith, *Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature.* World J Gastroenterol, 2008. **14**(2): p. 165-73.
197. Klement, E., et al., *Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study.* Am J Gastroenterol, 2008. **103**(7): p. 1775-82.
198. Wurzelmann, J.I., C.M. Lyles, and R.S. Sandler, *Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease.* Dig Dis Sci, 1994. **39**(3): p. 555-60.
199. Ekbom, A., et al., *Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study.* Am J Epidemiol, 1990. **132**(6): p. 1111-9.
200. Porter, C.K., et al., *Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2008. **135**(3): p. 781-6.
201. Gradel, K.O., et al., *Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis.* Gastroenterology, 2009. **137**(2): p. 495-501.
202. Swidsinski, A., et al., *Bacterial biofilm suppression with antibiotics for ulcerative and indeterminate colitis: consequences of aggressive treatment.* Arch Med Res, 2008. **39**(2): p. 198-204.
203. Dethlefsen, L. and D.A. Relman, *Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4554-61.
204. Card, T., et al., *Antibiotic use and the development of Crohn's disease.* Gut, 2004. **53**(2): p. 246-50.
205. Hildebrand, H., et al., *Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease.* Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(8): p. 961-6.
206. Shaw, S.Y., J.F. Blanchard, and C.N. Bernstein, *Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease.* Am J Gastroenterol, 2010. **105**(12): p. 2687-92.
207. Hviid, A., H. Svanstrom, and M. Frisch, *Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood.* Gut, 2011. **60**(1): p. 49-54.
208. Sekirov, I., et al., *Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection.* Infect Immun, 2008. **76**(10): p. 4726-36.
209. Wlodarska, M., et al., *Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated Citrobacter rodentium-induced colitis.* Infect Immun, 2011. **79**(4): p. 1536-45.
210. Garcia Rodriguez, L.A. and H. Jick, *Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs.* Lancet, 1994. **343**(8900): p. 769-72.
211. Chan, S.S., et al., *Aspirin in the aetiology of Crohn's disease and ulcerative colitis: a European prospective cohort study.* Aliment Pharmacol Ther, 2011. **34**(6): p. 649-55.
212. Bailey, M.T., et al., *Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation.* Brain Behav Immun, 2011. **25**(3): p. 397-407.
213. Hart, A. and M.A. Kamm, *Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress.* Aliment Pharmacol Ther, 2002. **16**(12): p. 2017-28.
214. Friswell, M., B. Campbell, and J. Rhodes, *The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Gut Liver, 2010. **4**(3): p. 295-306.
215. Matsumoto, S., et al., *Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain.* Gut, 1998. **43**(1): p. 71-8.

216. Strober, W., I.J. Fuss, and R.S. Blumberg, *The immunology of mucosal models of inflammation.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 495-549.
217. Eugster, H.P., et al., *Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha double-deficient mice.* Int Immunol, 1996. **8**(1): p. 23-36.
218. Ladel, C.H., et al., *Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice.* Infect Immun, 1997. **65**(11): p. 4843-9.
219. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.* Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
220. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection.* Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 117-29.
221. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice.* Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
222. Johansson, M.E., et al., *Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model.* PLoS One, 2011. **5**(8): p. e12238.
223. Alex, P., et al., *Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis.* Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(3): p. 341-52.
224. Cooper, H.S., et al., *Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation.* Carcinogenesis, 2000. **21**(4): p. 757-68.
225. Carvalho, F.A., et al., *Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin.* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(8): p. 1051-60.
226. te Velde, A.A., M.I. Verstege, and D.W. Hommes, *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis.* Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(10): p. 995-9.
227. Borenshtein, D., M.E. McBee, and D.B. Schauer, *Utility of the Citrobacter rodentium infection model in laboratory mice.* Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(1): p. 32-7.
228. Hapfelmeier, S. and W.D. Hardt, *A mouse model for S. typhimurium-induced enterocolitis.* Trends Microbiol, 2005. **13**(10): p. 497-503.
229. Fox, J.G., et al., *Helicobacter hepaticus infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer.* Mucosal Immunol, 2011. **4**(1): p. 22-30.
230. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Mouse models of inflammatory bowel disease.* Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(11): p. 1073-83.
231. Nash, J.H., et al., *Genome sequence of adherent-invasive Escherichia coli and comparative genomic analysis with other E. coli pathotypes.* BMC Genomics, 2010. **11**: p. 667.
232. Strober, W., *Adherent-invasive E. coli in Crohn disease: bacterial "agent provocateur".* J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 841-4.
233. Willing, B.P., S.L. Russell, and B.B. Finlay, *Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism.* Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 233-43.
234. Robinson, C.J. and V.B. Young, *Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal micobiota.* Gut Microbes, 2010. **1**(4): p. 279-284.
235. Wardwell, L.H., C. Huttenhower, and W.S. Garrett, *Current concepts of the intestinal microbiota and the pathogenesis of infection.* Curr Infect Dis Rep, 2011. **13**(1): p. 28-34.
236. Robinson, C.J. and V.B. Young, *Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal micobiota.* Gut Microbes, 2011. **1**(4): p. 279-284.
237. Barnich, N., et al., *CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease.* J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1566-74.
238. Wyatt, J., et al., *Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease.* Lancet, 1993. **341**(8858): p. 1437-9.
239. Keita, A.V., et al., *Increased uptake of non-pathogenic E. coli via the follicle-associated epithelium in longstanding ileal Crohn's disease.* J Pathol, 2008. **215**(2): p. 135-44.
240. Gutierrez, A., et al., *Antimicrobial peptide response to blood translocation of bacterial DNA in Crohn's disease is affected by NOD2/CARD15 genotype.* Inflamm Bowel Dis, 2010.
241. Biswas, A., et al., *Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14739-44.

242. Blaser, M., *Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria.* Nature, 2011. **476**(7361): p. 393-4.

ANNEXES

I) COMPOSITION DES DIFFERENTS MILIEUX BACTERIOLOGIQUES

- Brain-Heart (BH) :

  Base cœur-cervelle 37g

  Extrait de levure 5g

  Chlorhydrate de cystéine 0,5g

  Qsp 1L d'eau osmosée

  Ph 7,4

- Mac Conkey :

  Bio-Gelytone 17g

  Bio-Polytone 3g

  Lactose 10g

  Sels biliaires 1,5g

  Chlorure de sodium 5g

  Agar 13,5g

  Rouge neutre 0,03g

  Cristal violet 0,001g

  Qsp 1L d'eau osmosée

  Ph 7,4

- Dcoccosel :

  Bio-Tryptase 17g

  Bio-Thione 3g

  Extrait de levure 5g

  Bile de bœuf 10g

  Chlorure de sodium 5g

  Citrate de sodium 1g

  Esculine 1g

  Citrate de fer ammoniacal 0,5g

  Azide de sodium 0,25g

  Agar 13,5g

  Qsp 1L d'eau osmosée

  Ph 7,1

- Gélose Columbia cystéinée :

  Base Columbia (Bio-mérieux) 42,5g

  Glucose 5g

  Chlorhydrate de cystéine 0,3g

  Agar 5g

  Qsp 1L d'eau osmosée

  Sang frais de cheval 5%

  Ph 6,8

- Man-Rogosa-Sharpe (MRS) :

  Base MRS-agar (Oxoid) 62g

  Qsp 1L d'eau osmosée

  Ph 5,4

II) PUBLICATIONS

1) Article :

Drouet M., Vignal C., Singer E., Djouina M., Dubreuil L., Cortot A., Desreumaux P., Neut C.: « *AIEC colonization and pathogenicity: influence of previous antibiotic treatment and pre-existing inflammation* », *Inflammatory Bowel Disease*, In press.

2) Revue :

Drouet M., Dubuquoy L., Desreumaux P., Bertin B.: « *Visceral fat and gut inflammation* », *Nutrition*, Feb. 2012, vol. 28, issue 2, pp 113-117.

3) Communications :

- Digestive Disease Week, Chicago, USA, mai 2011 :
  Drouet M., Vignal C., Singer E., Dubreuil L., Desreumaux P., Neut C.: "*Antibiotics induced commensal flora disruption favours* Escherichia coli *AIEC (LF82) colonization in wild type and NOD2 knock-out mice.*" Poster

- 6th European Workshop on Immune-Mediated Inflammatory Diseases, Nice, France, Novembre 2011 :
  Drouet M., Vignal C., Singer E., Dubreuil L., Desreumaux P., Neut C.: *"Antibiotics induced commensal flora disruption favours* E. coli *AIEC colonization and mesenteric translocation in NOD2KO mice"*, Abstract in Supp. of The Journal of Translational Medicine, vol. 9, supp. 2, Nov. 2011.